# Evaluation of cell migration of *Curcuma longa Linn* extract on oral squamous carcinoma cell line

**Supaporn Mala, Suwanna Korsuwannawong, Ratchaporn Srichan, Puvanai Poosit**
Faculty of Dentistry, Mahidol University

## Abstract

**Objective:** To evaluate the *in vitro* cytotoxicity of the *Curcuma longa Linn* extract and to assess the inhibition of migration of HSC-4 cell treated with the extract.

**Materials and methods:** Human oral squamous cell carcinoma (HSC-4) was seed $1x10^4$ cell/well for a 96-well plate and incubated at 37°C in 5% $CO_2$ incubator for 24 hours. HSC-4 cell were treated with the herbal extracts at concentrations of 0.01, 0.05, 0.10 and 0.5% (W/V). MTT assay was used to evaluate cell cytotoxicity. The scratch motility assay was used to assess inhibition of HSC-4 Cell migration. The cell was seeded $1.5x10^5$ cell/well for a 24-well plate (3 well/sample/concentration). After treatment with various concentrations of herbal extracts. Gap closure cell migration assay was calculated using Image Pro Plus program (version 7.0).

**Results:** The *Curcuma longa Linn* extract showed no toxicity to HSC-4 cell cultures in all tested concentrations (114.84±3.94, 110.03±3.13, 108.11±1.47, and 102.52±3.94 %, respectively) in comparison to the negative and positive controls (96.87±1.45 and 12.51±2.12, respectively). The migration of oral cancer cell line was inhibited by 0.01% (w/v) of the *curcuma longa Linn* extract (93.18% VS. 55.26%) control group ($P<0.05$), while 100% migration inhibition were observed with the rest of the concentrations.

**Conclusion:** *The Curcuma longa Linn* extract showed no toxicity to HSC-4 cell cultures were treated with the herbal extracts at concentrations of 0.01, 0.05, 0.10 and 0.5% (W/V) and as a supplement compound for inhibition of oral cancer cell migration. *Curcuma longa Linn* can be useful as supplement to enhance development of dental product and treatment of diseases such as oral cancer.

**Key words:** *Curcuma longa Linn*, Cytotoxicity, HSC-4 cell line, MTT assay, The scratch motility assay

**How to cite:** Mala S, Korsuwannawong S, Srichan R, Poosit P. Evaluation of cell migration of *Curcuma longa Linn extract* on oral squamous carcinoma cell line. M Dent J 2016; 36: 393-402.

**Correspondence author:**
Suwanna Korsuwannawong
Research office
Faculty of Dentistry, Mahidol University
No.6 Yothi Road, Rajthawee District
Bangkok 10400, Thailand.
Tel: 02-200-7620
Fax: 02-200-7698
E-mail: Suwanna.aut@mahidol.ac.th
Research grant: -
**Received:** 10 August 2016
**Accepted:** 5 October 2016

# ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4)

**สุภาพร มาลา สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์ ราชพร สีจันทร์ ภูวนัย ภูษิต**
สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันในด้านความเป็นพิษและฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส

**วิธีการ:** นำเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสมาเพาะเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37°ซ ร้อยละ 5 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 จนได้เซลล์ชั้นเดียว นำมาย่อยด้วยทริปซินอีดีทีเอร้อยละ 0.25 ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ นำเซลล์มาใส่เพลทชนิด 96 หลุมๆละ $1x10^4$ เซลล์ นำเพลทมาบ่มในตู้อบ เป็นเวลา 24 ชม. และนำสารทดสอบสมุนไพร มาศึกษาประเมินความเป็นพิษ โดยวิธี MTT และนำเซลล์มาใส่เพลทชนิด 24 หลุมๆละ $1.5x10^5$ เซลล์ต่อหลุม จำนวน 3 หลุม/ความเข้มข้น/สมุนไพร ภายหลังจากใส่สารทดสอบสมุนไพรนำเพลทมาบ่มในตู้ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส โดยการกรีดเซลล์ให้เป็นช่องว่างด้วยทิปขนาด 1000 ไมโครลิตร โดยให้สารทดสอบสมุนไพรมีความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.5 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ส่วนกลุ่มควบคุมใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอย่างเดียว วัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยโปรแกรมอิมเมจโปรพลัส รุ่น 7.0 โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

**ผลการทดลอง:** ด้านประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.5 (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันเท่ากับ 114.84±3.94, 110.03±3.13, 108.11±1.47 และ 102.52±3.94 เรียงตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 มีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับร้อยละ 93.18 ขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และร้อยละ 0.1 มีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ร้อยละ 100 โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เท่ากับร้อยละ 55.26

**สรุปผลการทดลอง:** สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.50 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส และมีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับรักษาโรคมะเร็งในช่องปากได้

**รหัสคำ:** การต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์, ขมิ้นชัน, ความมีชีวิตของเซลล์, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส, รอยขีดทดสอบการเคลื่อนที่

**วิธีอ้างอิงบทความนี้:** สุภาพร มาลา, สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์, ราชพร สีจันทร์, ภูวนัย ภูษิต. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4). ว ทันต มหิดล 2559; 36: 393-402.

**ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:**
สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์
สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
เลขที่ 6 ถนนโยธี เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
หมายเลขโทรศัพท์ : 02-200-7620
หมายเลขโทรสาร : 02-200-7698
หมายเลขโทรศัพท์มือถือ : 081-340-5694
อีเมล์ : Suwanna.aut@mahidol.ac.th
แหล่งเงินทุน : -
**วันรับเรื่อง:** 10 สิงหาคม 2559
**วันยอมรับการตีพิมพ์:** 5 ตุลาคม 2559

## บทนำ

มะเร็งช่องปากเป็นส่วนหนึ่งของโรคมะเร็งในกลุ่มโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ ซึ่งประมาณ 90-95% ของมะเร็งช่องปากจะเป็นชนิดสแควมัส (Squamous Cell Carcinoma; SCC) บริเวณที่พบมากที่สุดคือ ลิ้น ริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม เหงือก และเพดานปาก ตามลำดับ[1] มะเร็งช่องปากก็ยังเป็นปัญหาสำคัญในกลุ่มโรคมะเร็งเป็นหนึ่งในสิบของโรคมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย[2] ในประเทศไทย อุบัติการณ์การเกิดของโรคมะเร็งปี พ.ศ. 2552 จากสถิติพบว่ามะเร็งช่องปาก เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับ 6 ในเพศชาย จำนวน 4.8 คน ต่อประชากรแสนคนต่อปี และในเพศหญิง จำนวน 4.3 คนต่อประชากรแสนคนต่อปี ประเทศที่พบผู้ป่วยมะเร็งโดยรวมสูงสุด 5 อันดับ ได้แก่ ไต้หวัน เกาหลี ญี่ปุ่น มองโกเลีย และจีน ตามลำดับ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ได้แก่ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ การกินและเคี้ยวหมากพลู ยาฉุน และการระคายเคืองของเนื้อเยื่อเมือกช่องปาก ปัจจุบันนักวิจัยหลายสถาบันได้ทำการศึกษาโรคมะเร็งช่องปาก โดยศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคมะเร็งช่องปากทำให้ทราบสถานการณ์การเกิดมะเร็งในช่องปาก และสาเหตุการเกิดมะเร็ง[3] นอกจากนี้นักวิจัยยังมีความสนใจที่จะนำพืชสมุนไพรในประเทศไทยซึ่งมีอยู่มากมายหลายชนิด ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและจากการเพาะปลูก อีกทั้งส่วนประกอบต่างๆของต้นพืชสมุนไพรไม่ว่าจะเป็น ราก ใบ ดอก เปลือก ผล เมล็ด ก็นำมาใช้ประโยชน์ในการทำเป็นยาได้ทั้งสิ้น แต่จะมีฤทธิ์ไม่เท่ากัน ขั้นตอนและช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพรก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพของตัวยาที่จะนำมาใช้ประโยชน์ พบว่าสมุนไพรไทยหลายชนิดมีสรรพคุณที่ดีต่อการดูแลสุขภาพช่องปาก[4] เช่น ข่อย มังคุด ใบฝรั่ง ใบพลู ฯลฯ พืชสมุนไพรเหล่านี้ มีสรรพคุณที่ดีต่อการดูแลสุขภาพช่องปาก และยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้รักษาดูแลเหงือกและฟันได้ เช่น ขมิ้นชัน ขิง เปลือกทับทิม เหล่านี้ นิยมผสมในยาสีฟันเพื่อให้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ลดการอักเสบ ฤทธิ์สมานแผล ช่วยทำให้เหงือกแข็งแรงและช่วยรักษาแผลในช่องปากด้วย

ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยใช้กันมาแต่โบราณ ส่วนใหญ่จะใช้เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงอาหาร มีสารสำคัญสีเหลืองส้ม อยู่ในกลุ่ม เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma longa Linn.* และสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเหง้าของขมิ้นชันคือ เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารที่พบในพืชวงศ์ขิง ข่า ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยและเป็นวัตถุดิบที่หาได้ในจีน อินเดีย และประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประกอบด้วยสารหลัก 3 ตัว คือ เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นองค์ประกอบที่พบเป็นส่วนใหญ่

ดีเมท็อกซี่เคอร์คูมิน(demethoxycurcumin) และบิสดีเมท็อกซี่เคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) มีประวัติการใช้เป็นยาในการแพทย์พื้นบ้านของภูมิภาคเอเชียมาอย่างยาวนาน ใช้เพื่อการรักษากลุ่มอาการต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เคอร์คิวมินได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ต้านการอักเสบ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งหลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา และโรคทางเมทาบอลิซึม[5-7]

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้ เพื่อศึกษาด้านความเป็นพิษและฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4) นำมาเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 $cm^2$ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dubbecco's Modified Eagles Medium, Gibco, USA) ที่มีฟีทรัลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 (10% Fetal Bovine Serum) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°ซ ระดับก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 จนเซลล์โตเต็มพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว เมื่อนำมาทดลองโดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด ล้างด้วยฟอสเฟต บัพเฟอร์ซาไรด์ (phosphate buffer saline) จำนวน 5 มล. ล้างเซลล์จำนวน 1 ครั้ง และดูดฟอสเฟต บัพเฟอร์ซาไรด์ ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมทริปซินอีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 จำนวน 5 มล. ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นดูดทริปซินอีดีทีเอ ออกจากขวด นำขวดเลี้ยงเซลล์บ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เมื่อครบเวลานำขวดมาเคาะเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม ที่มีฟีทรัลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 จำนวน 10 มล. และทำการแยกเซลล์ออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้ปิเปต ดูดและปล่อยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ทั่วพื้นขวด 2-3 ครั้ง ดูดเซลล์จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครทิว จากนั้นเติมสีทริปแพนบลูร้อยละ 0.4 (0.4% trypan blue stain; Gibco, USA) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยดูดปล่อยขึ้นลงจำนวน 1-2 ครั้ง นำส่วนผสมมาจำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่เครื่องนับเซลล์ (Haemacytometer; Hausser Scientific Horham, USA) ปรับให้ได้เซลล์จำนวน 1x $10^5$ เซลล์/มล.

ประเภทของสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบด้านความเป็นพิษ และศึกษาฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4) ตามตารางที่ 1

## วิธีการทดสอบ

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน

เตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ตัวอย่างความเข้มข้นร้อยละ0.01, 0.05 และ 0.1 โดยมีอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มเป็นกลุ่มควบคุม

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Corning Inc., USA) จำนวน 5 มิลลิลิตร ภายใต้ตู้กรองอากาศให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นใส่เซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดูดเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้แยกจากกัน นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (Forma Direct Heat: $CO_2$ Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน โดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มเหลือง

การทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน

นำเซลล์จำนวน 1x$10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ให้ได้เซลล์จำนวน 1x$10^4$ เซลล์ต่อหลุม นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นนำมาทำการทดลอง นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ใน 96 หลุม ครบ 24 ชั่วโมง

**Table 1** Type, brands and manufacturers of two preservative solution used in this experiment

| Type | Brand name/ Cat. No./Lot No. | Manufacturers |
|---|---|---|
| DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium Powder | Gibco™ Cat. No. 12100-038 Lot No.1154412 | Grand Island, New York, USA. |
| สมุนไพรขมิ้นชัน | อภัยภูเบศร์ เลขทะเบียนที่ G 811/53 Lot. No. MB 01213106 | สำนักงานโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร์, จ.ปราจีนบุรี, ประเทศไทย |
| 0.1% ZDEC Polyurethane Film | RM-A, Lot no. A-138 | Hatano Research Institute (HRI), Japan |

ดูดสารตัวอย่างสมุนไพรขมิ้นชัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม โดยทำความเข้มข้นละ 10 หลุม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม จำนวน 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 หลุม เป็นกลุ่มควบคุม

## ผลการศึกษา

**การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส**

นำเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน ครบเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ออกจากตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วใส่สารละลายเอ็ม ที ที [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazoliumbromide, thiazolyl blue)[8] ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในแต่ละหลุม จำนวน 50 ไมโครลิตร/หลุม นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย MTT เททิ้งในภาชนะที่จัดเก็บของเสีย แล้วเติม ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลทรีดเดอร์ (Microtitre plate reader, Ceres UV 900 HDI, Bio- Tek Instrument Inc, Verment, USA) คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ด้วยสมการ

% cell viability = ODs x 100/ODctrl

โดยที่ ODs คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มตัวอย่าง

ODctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ของกลุ่มควบคุม

ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ตามตารางที่ 2 และรูปที่ 1

**การทดสอบฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส**

นำเซลล์จำนวน $1.5x10^5$ เซลล์ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมๆละ 1000 ไมโครลิตร ให้ได้เซลล์จำนวน $1.5x10^5$ เซลล์ต่อหลุม นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชม. จนกระทั่งได้เซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นนำทิปขนาด 1000 ไมโครลิตรกรีดเซลล์ผ่านเส้นผ่านศูนย์กลางถาดให้มีช่องว่างขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟต บัพเฟอร์ซาไรด์ จำนวน 2 ครั้ง และดูดสารตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 จำนวน 1000 ไมโครลิตรใส่ในแต่ละหลุม โดยทำความเข้มข้นละ 3 หลุม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม จำนวน 1000 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลุม เป็นกลุ่มควบคุม นำถาดเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร้อยละ 5 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นย้อมสีเซลล์ด้วยโทลูดีน บลู โอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และวัดพื้นที่ต้านการเคลื่อนที่ของ

Table 2 Percentage of cell viability of HSC-4 cell treated with ***Curcuma longa Linn*** extract

| Concentrations of test samples (%) | % cells viability |
|---|---|
| Negative control | 96.87±1.45 |
| 0.01%(w/v) | 114.84±3.95 |
| 0.05%(w/v) | 110.0333±3.13 |
| 0.1%(w/v) | 108.1167±1.47 |
| 0.5%(w/v) | 102.5233±3.94 |
| Positive control | 12.51±2.12 |

เซลล์มะเร็งที่ระยะเวลา 24 ชม. ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้โปรแกรมอิมเมจ โปรพลัส รุ่นที่ 7.0 และวิเคราะห์ร้อยละของการต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส ตามตารางที่ 3 รูปที่ 2 และรูปที่ 3

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cells viability) และร้อยละการต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% cells inhibition) นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean)± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 10 ตัวอย่าง (n= 10) และแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cells viability) และร้อยละการต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% cells inhibition) ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยสถิติ One-Way ANOVA : Post Hoc Multiple Comparisons (Dunnett) ด้วยโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 18.0 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

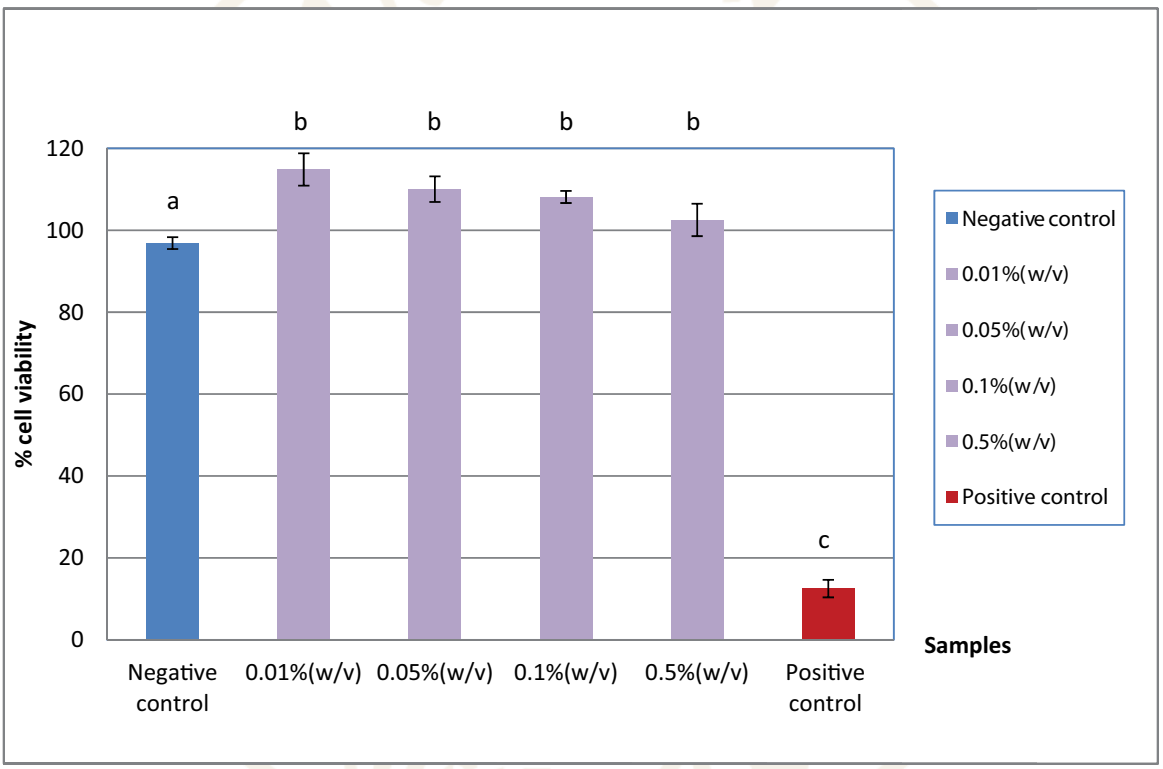


**Figure 1** Percentage of cell viability of HSC-4 cell treated with *Curcuma longa Linn* extract, the same letter indicates no significant difference.

**Table 3** Percentage of cells inhibition of migration of HSC-4 cell treated with *Curcuma longa Linn* extract

| Concentration of test samples (%) | % cells inhibition |
|---|---|
| Control | 55.26±1.237 |
| 0.01% (w/v) | 93.18±0.641 |
| 0.05% (w/v) | 100 |
| 0.1% (w/v) | 100 |

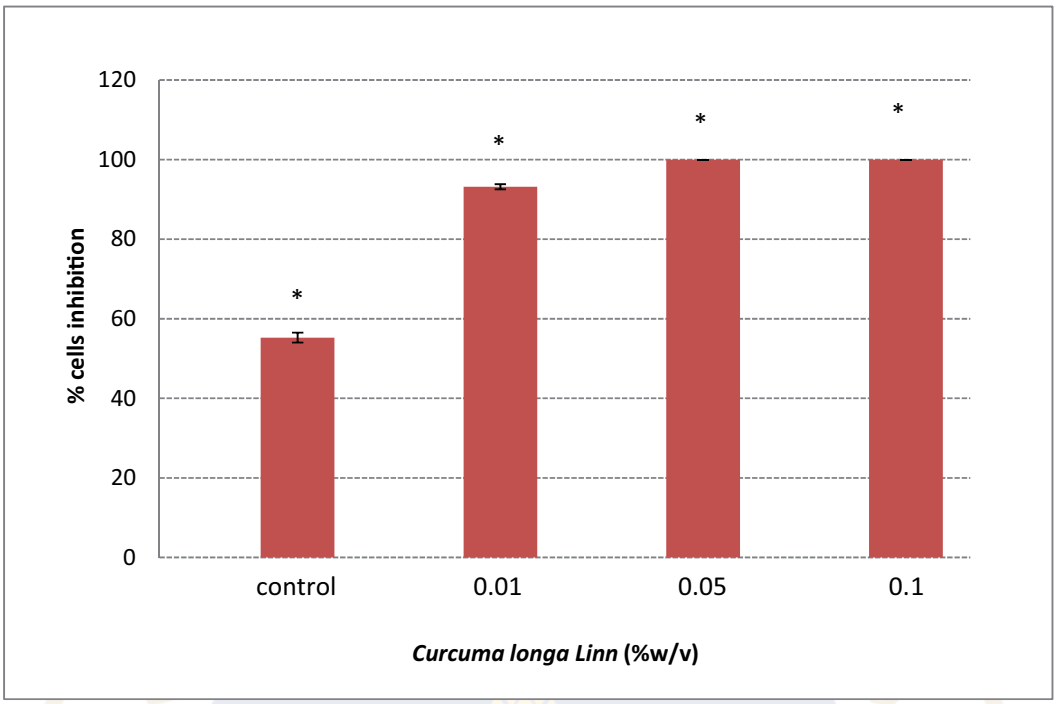


Figure 2 Percentage of cells inhibition of migration of HSC-4 cell treated with *Curcuma longa Linn* extract

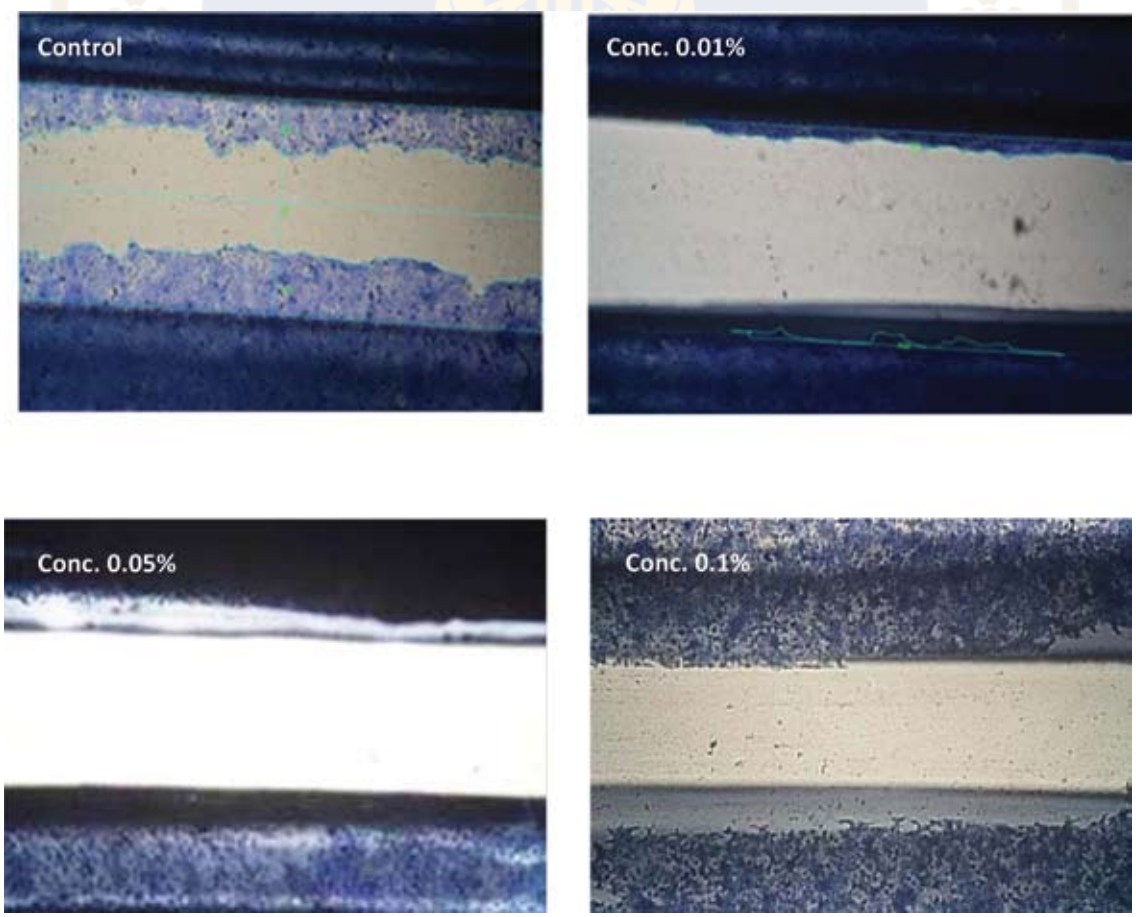


Figure 3 Migration Assay

## บทวิจารณ์

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส พบว่าสมุนไพรชนิดนี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.01-0.10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยที่ความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.01 มีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์เท่ากับร้อยละ 93.18 ในขณะที่ความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.05 และร้อยละ 0.1 มีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์เท่ากับร้อยละ 100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นั่นคือ สารสกัดสมุนไพรนี้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดสมุนไพรชนิดนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการศึกษามีผู้รายงานเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันมีสารสำคัญ คือ เคอร์คูมิน (Curcumin; Cur) ดีเมท็อกซี่เคอร์คูมิน (Demethoxy-curcumin; DMC) และบิสดีเมท็อกซี่เคอร์คูมิน (Bisdemethoxycurcumin; BDMC) [9] โดยศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เมทริกซ์เมทิลโลโปรทีนเนส (matrixmetalloproteinases; MMPS) และยูโรคิเนสพาสมิโนเจ้น แอคทิเวเตอร์; ยูพีเอ (Urokinase plasminogen activator; uPA) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ ได้แก่ เซลล์ HT 1080 Fibrosarcoma cells พบว่าสารสำคัญในขมิ้นชันชนิด BDMC และ DMC ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงกว่าสาร Curcumin และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ [9] จากการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ในกลุ่ม MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการแทรกซึมและแพร่กระจายของมะเร็งช่องปาก เมื่อใช้เซลล์ไลน์ชนิดสแควมัสเซลล์ของมนุษย์ทดสอบกับโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ นั่นคือ สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสำคัญ BDMC ในสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน ที่ระดับความเข้มข้นขนาด 10 ไมโครโมล สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 จากเซลล์ HT 1080 Fibrosarcoma Cells ได้ [9] ในขณะที่งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษากับเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4) โดยที่สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.01-0.1(น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยใช้เทคนิค scratch motility assay[10] และวิเคราะห์พื้นที่จากการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยโปรแกรมอิมเมจ โปรพลัส รุ่นที่ 7.0 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์หาพื้นที่จากการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ อนึ่งงานวิจัยนี้ต้องทำวิจัยศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ MMP และ uPA ของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันดังกล่าว อีกทั้งสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบไม่ได้แยกส่วนประกอบของสารสำคัญแต่ละชนิด ทำให้สารสำคัญดังกล่าวอาจมีฤทธิ์เสริมกันมีผลต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์และสารออกฤทธิ์เฉพาะที่กับเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์ HSC-4

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน[11-12] เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านมพบว่า สาร DMC ซึ่งเป็นสารสำคัญใน Curcumin และเป็นโครงสร้างหลักของสมุนไพรขมิ้นชัน ซึ่งมีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง (anti-metastatic) ทำการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและทดลองโดยใช้สัตว์ทดลอง โดยที่สาร DMC ในขมิ้นชันมีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยวิธี Wound healing motility assay เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด DMC จำนวน 0-15 ไมโครโมล ซึ่งสามารถลดจำนวนการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมดังกล่าวได้ สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในประเทศเขตร้อน โดยใช้ทั้งเหง้าสดและเหง้าแห้งในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและแผลภายนอก รวมทั้งลดการอักเสบในทางการแพทย์แผนไทย เมื่อกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าสดและ

เหง้าแห้งของขมิ้นชันจะได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 1.88 และ7.02 ตามลำดับ และเมื่อสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 จะได้ curcuminoids ร้อยละ 6.95 และได้ผลผลิตรวมร้อยละ 29.52 ซึ่งประกอบด้วย curcumin ร้อยละ 11.6, demethoxycurcumin ร้อยละ 10.32 และ bisdemethoxycurcumin ร้อยละ 10.77 และพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ส่วน curcuminoids ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา[13]

**การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน**

มีผู้รายงานการทดสอบความเป็นพิษในหนูขาว[14] พบว่าทั้งขมิ้น และ curcumin เมื่อใช้ในขนาดที่สูง โดยเฉพาะที่ใช้ในคน 1.25-125 เท่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในด้านการเจริญเติบโต และระดับสารเคมีในเลือด รวมทั้งการทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูเมื่อให้ขนาดต่างๆกัน ไม่พบความผิดปกติต่อหนู และเมื่อให้ Sodium curcuminate ในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางปาก ใต้ผิวหนัง หรือช่องท้อง ไม่พบอันตราย แต่ถ้าฉีดเข้าหลอดเลือดจะเป็นพิษ ทำให้สัตว์ทดลองตายได้ ส่วนการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันไม่พบพิษ และเมื่อติดตามคนไข้ที่ทดลองทางคลินิก 30 ราย ไม่พบอาการผิดปกติ ในประเทศอินเดียได้ทำการทดลองถึงความเป็นพิษของขมิ้นโดยผสมขมิ้น 1-2 ขีดในอาหารไก่ 1 กิโลกรัม แล้วนำไปให้ไก่กินเป็นเวลา 20 วัน ต่อมานำไก่ไปชั่งน้ำหนัก ปรากฏว่าน้ำหนักไก่ลดลง และมีอาการเบื่ออาหาร และเมื่อผสมหัวขมิ้น 4 ขีด ในอาหาร 1 กิโลกรัม ให้หนูที่อย่านมกินอาหารไก่นั้นจำนวน 4 ตัว ปรากฏว่าน้ำหนักหนูลดลงอย่างรวดเร็ว และหนู 2 ตัวตายภายในเวลา 4 วัน ถ้าให้หนูกินอาหารที่มีแป้งจากหัวขมิ้นมากๆ หนูจะตายภายในเวลา 6 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในหัวขมิ้นมีสารพิษอยู่ [15] นอกจากนี้ยังมีการประเมินความเป็นพิษของขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล โดยป้อนสารสกัดขมิ้นชันให้หนูเม้าส์ในปริมาณ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วันโดยป้อนให้หนูเม้าส์กินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 90 วัน พบว่า ขมิ้นชันไม่มีปฏิกิริยาต่อหนูเม้าส์ กล่าวคือไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว หัวใจและปอด แต่หนูมีระดับเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงลดลง[16]

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 เท่ากับร้อยละ 93.18, 100 และ100 เรียงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับร้อยละ 55.26 เนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ลดการแบ่งตัว, ยับยั้งการเจริญเติบโต, ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งช่องปาก สารสกัดขมิ้นชัน พบว่ามีสารเคอร์คิวมินอยด์และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ อีกทั้งลดปัจจัยที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งตายอย่างมีแบบแผน[17] ดังนั้นสารสกัดขมิ้นชันจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในทางทันตกรรมต่อไป

**Acknowledgement:** None

**Funding:** None

**Competing interests:** None

**Ethical approval:** No required

## References

1. Department of diagnostic and Therapeutic Radiology, The Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital. Oral cancer (2010). [Online]. Available from: ***http://ramaclinic.ra.mahidol.ac.th/cancer/cancer 0007***.
2. WHO International Agency for Research on Cancer. (2008). GLOBOCAN 2008 cancer incidence and mortality worldwide in 2008. Retrieved July 10, 2010, from ***http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900***
3. Lakkana Seenuanlae, Patarvoot Vatanasapt, Supannee Promthet and Supot Kamsa-Ard. Five years survival of oral cavity cancer squamous cell carcinoma type in Srinagarind Hospital, Khon Kaen. ***KKU Journal for Public Health Research Free E-Journal*** 6, 1(2013): 61-70.

4. Clinicalherbs.com [homepage on the Internet]. Thailand: Oral Health related herbal extracts in oral health care. [Online]. [Cited 2015 Dec 2]. Available from: ***http://clinicalherbs.com***.
5. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. ***Trends Pharmacol Sci*** 2009; 30: 85-94.
6. Li CJ, Zhan LJ, Dezube BJ, Crumpacker CS, Pardee AB. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1993; 90: 1839-1842.
7. Shehzad A, Khan S, Sup Lee Y. Curcumin molecular targets in obesity and obesity-related cancers. ***Future Oncol***. 2012; 8: 179-90. doi: 10.2217/fon.11.145
8. Bandopadhyaya S, Ramakrishnan M, Thylur RP and Shivanna Y. In-vitro evaluation of plant extracts against colorectal cancer using HCT116 cell line. ***International Journal of Plant research***. 2015; 1: 107-112.
9. Yodkeeree S, Chaiwangyen W, Garbisa S, Limtrakul P. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. ***The Journal of Nutritional Biochemistry***. 2009; 20: 87–95.
10. Esther LH Tang, Jayakumar Rajarajeswaran, Shin Yee Fung and MS Kanthimathi. Antioxidant activity of Coriandrum sativum and protection against DNA damage and cancer cell migration. ***BMC complementary and alternative medicine*** 2013: 13: 347.
11. Yodkeeree S, Ampasavate C, Sung B, Aggarwal BB, Limtrakul P. Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. ***European Journal of Pharmacology***. 2010; 627: 8–15.
12. Hong J H, Ahn K S, Bae E, Jeon S S, Choi H Y. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. ***Prostate Cancer Prostatic Dis***. 2006; 9: 147-152.
13. Wuthi-udomlert M, Grisanapan W, Luanratana O, Caichompoo W. Antifungal activity of Curcuma longa grown in Thailand. ***Southeast Asian J Trop Med Public Health***. 2000; 31: 178-82.
14. Chaweewan Prucksunand, Punjab Intarasuk Sri, Manit Lees-Toe-Chavalit, Nunthaporn Ninwiset, Amarin Preechawut and Suwat Wimolwatanapan. Effect of Turmeric to change gastric tissue and duodenal in peptic Ulcer patient_Case report 10 patients. ***Thai J of Pharma***. 2529; 8: 139-51.
15. Pravat Wa-sri. ***Herbal medicine in community pharmacy practice***. Phapunsartsana Ltd. Office. 1994; 84.
16. Qureshi S, Shah AH, Ageel AM. Toxicity studies on Alpinia galanga and Curcuma longa. ***Planta Med***. 1992; 58: 124-127.
17. Kim JY1, Cho TJ, Woo BH, Choi KU, Lee CH, Ryu MH, Park HR. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. ***Arch Oral Biol***. 2012; 57: 1018-25.