**การทดลอง:** การทดสอบความเป็นพิษของ Apigenin 7-glucuronide (สารประกอบในผลิตภัณฑ์ Kerra) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยวิธี MTT assay

| **ชื่อตัวอย่าง**  | : Apigenin 7-glucuronide ≥95% (LC/MS-ELSD) “Sigma-Aldrich” 1MG |
| --- | --- |
| **รูปแบบผลิตภัณฑ์** | : ผงอยู่ขวดสีทึบ |
| **ลักษณะทางกายภาพ**  | : ผง  |
| **ผู้ทำการทดลอง** | : สิทธินันท์ สมควร |

**วิธีการทดลอง**

1. **การเพาะเลี้ยงเซลล์**

 เซลล์มะเร็งปอด (A549) ถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum)ในปริมาณ 10% และ 1% ยาปฏิชีวนะ(Pen-step) ที่สภาวะ 5% CO2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1. **การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์**

การทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย Apigenin 7-glucuronide ต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยง (25 cm2 cell culture flasks) ที่สภาวะ 5% CO2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์มีปริมาณมากพอ ทำการแยกเซลล์ให้หลุดออกจากกันและหลุดจากพื้นผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) ที่มีกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระแอซีติก (trypsin-EDTA) และนับเซลล์ให้ได้ปริมาณ 7,000 เซลล์ต่อหลุม เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในถาด 96 หลุม เปลี่ยนเป็นอาหารที่มีสารละลาย Apigenin 7-glucuronide ความเข้มข้น 1.77-226 µM ตามลำดับ แล้วนำเซลล์ไว้ในสภาวะเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร MTT ปริมาตร 10 µL และเซลล์ไว้ในสภาวะเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารละลาย MTT ให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาซานสีม่วง ซึ่งจะละลายด้วยไดเมททิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 100% และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570-630 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าความมีชีวิตของเซลล์ และ ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้

**% Cell viability = (A sample) x 100**

 **A control (without extract)**

เมื่อ A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีสารละลาย Apigenin 7-glucuronide

 A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่มีสารละลาย Apigenin 7-glucuronide

 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด ที่ได้รับสารละลาย Apigenin 7-glucuronide จะถูกวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50% (IC50)

**ผลการทดลอง**

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ของ Apigenin 7-glucuronide ด้วยวิธี MTT assay หลังจากเซลล์ได้รับสารละลาย Apigenin 7-glucuronide เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 93.53 ± 5.71 µM ของสารละลาย Apigenin 7-glucuronide มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด A549 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) แสดงข้อมูลดังภาพที่1

![](data:None;base64...)

**ภาพที่ 1** ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบ Apigenin 7-glucuronide ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และสารละลาย Apigenin 7-glucuronide 8 ความเข้มข้น (1.77, 3.53, 7.06, 14.13, 28.25, 56.50, 113, และ 226 µM) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SD จากโปรแกรม GraphPadPrism 8

**สรุปผลการทดลอง**

Apigenin 7-glucuronide มียับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด A549 ซึ่งมีค่า IC50  เท่ากับ 93.53 ± 5.71 µM