ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคา ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

Antiproliferative Effects of Protein Hydrolysate from Sacha Inchi on Colorectal Cancer HCT116 Cells

สุมิตรา สุขพิทักษ์ (Sumitra Sukpitak)* ดามรัศมน สุรางกูร (Damratsamon Surangkul)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยในการหาสารหรือยาในการต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ในปัจจุบันมีความสำคัญเป็นอย่างมาก และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากอาหารถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น รวมถึงโปรตีนจากถั่วดาวอินคา (Sacha inchi) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคาและศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 โดยจะใช้เอนไซม์ Alcalase และ Papain ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท จากนั้นจึงศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ โดยหาค่า IC50 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 985, 645 และ 465 ug/ml ตามลำดับ ส่วนโปรตีนย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase กลับพบว่ามีฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

ABSTRACT

The research in finding a substance or drug in colorectal cancer is also important. Protein hydrolysate derived from food is increasingly applied in the food industry including protein from Sacha inchi. The aim of this study was to produce protein hydrolysates from sacha inchi protein powder by Alcalase and Papain, and then study antiproliferative activity in colorectal cancer HCT116 cell lines by MTT reduction assay. The results, found that the protein digested by Papain enzyme showed antiproliferation with an IC50 at 24, 48 and 72 hours were 985, 645 and 465 ug/ml respectively. On the other hand, Protein digested by Alcalase enzyme promoted cell proliferation on HCT116 cell line. This research shows that digested proteins from Sacha inchi by Papain enzyme have biological activity by the antiproliferative effect on HCT116 cells.

คำสำคัญ: ถั่วดาวอินคา โปรตีนไฮโดรไลเสท ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Keywords: Sacha inchi, Protein hydrolysates, Anticancer

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากการเจริญที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อบุลำไส้ใหญ่ มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จนไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งในระยะแรกอาจเป็นติ่งเนื้อและพัฒนาไปเป็นมะเร็งในที่สุด (วีรวุฒิ, 2562) ซึ่งแนวทางการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่มีหลายวิธีที่สำคัญ เช่น การผ่าตัด การใช้รังสีรักษา และการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งพบว่ามีผลข้างเคียงจากการใช้ยา มีการดื้อต่อการรักษา และพบการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังได้รับการรักษา (Chalamaiah et al., 2018) ดังนั้นงานวิจัยในการหาสารหรือยาต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็น สารอาหารจากโปรตีนนั้นมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพ เมื่อรับประทานอาหารประเภทโปรตีนจะเกิดการย่อยในระบบทางเดินอาหารทำให้ได้เปปไทด์ (peptide) และกรดอะมิโน สามารถดูดซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดีเนื่องจากมีโมเลกุลขนาดเล็ก ปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ในอาหารมีเพิ่มขึ้น ซึ่งเปปไทด์นั้นได้จากการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ หรือสารเคมีทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสท (Protein hydrolysate) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากโปรตีนในอาหารหลายชนิดได้รับการรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายรวมถึงฤทธิ์ทางด้านภูมิคุ้มกัน, ต้านมะเร็ง, ลดความดันโลหิต, ต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบ, และต้านแบคทีเรีย (Bhat et al., 2015) จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากอาหารได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร รวมทั้งโปรตีนจากถั่วดาวอินคา (Sacha inchi) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Plukenetia volubilis* Linneo ซึ่งจัดเป็นพืชที่ให้น้ำมัน จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดถั่วดาวอินคา โดยเทคนิค DPPH assay พบว่าสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งมีค่า 241 umol TE/100 g (Šterbová et al., 2017) และการศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย โดยการใช้น้ำมันที่สกัดจากเมล็ดถั่วดาวอินคา พบว่าสามารถป้องกันการ attachment ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่บริเวณผิวหนังของมนุษย์ได้ (Gonzalez et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นแหล่งของธาตุอาหารหลัก และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ (Nascimento et al., 2013) ดังนั้นเมล็ดถั่วดาวอินคาจึงถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงการนำเมล็ดมาสกัดน้ำมัน ส่งผลให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากขึ้น ซึ่งกากโปรตีนถั่วดาวอินคาที่สกัดน้ำมันออกแล้วพบว่ามีปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด (Rawdkuen et al., 2018) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการเพิ่มมูลค่าให้กับกากโปรตีนที่เหลือจากกระบวนการแปรรูป โดยนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสทและศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับต้านโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคา ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

วิธีการวิจัย

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) เป็นเซลล์ที่สั่งซื้อมาจากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium) ที่เติม 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic-antimycotic (100 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 0.25 µg/mL of amphotericin B) ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO2

สารเคมี

ผงโปรตีนถั่วดาวอินคา ได้รับจากบริษัท โอเมกา 3.6.9 แอนด์ ไลโคปีน จำกัด เอนไซม์ Alcalase เอนไซม์ Papain ตัวทำละลาย Hexane สารละลาย 1M NaOH สารละลาย OPA (o-phthalaldehyde) Beta-2-mercaptoethanaol Ethanol สารละลาย 50 mM sodium borate buffer pH8.5 สาร MTT ((3-4,5-Dimethylthaizol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) และ DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

การสกัดโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคา

เตรียมผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคาสำเร็จรูป (crude protein powder) มาละลายในตัวทำละลาย Hexane ในอัตราส่วน 1:6 โดยใช้เครื่อง stirrer กวนสารเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm 10 นาที แล้วนำส่วนตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาละลายใน 1M NaOH ในอัตราส่วน 1:10 โดยใช้เครื่อง stirrer กวนสารเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm 30 นาที แล้วจึงนำส่วน supernatant มาปรับ pH 4.5 แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ 3000 rpm 15 นาที แล้วจึงนำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น และปรับ pH ให้เป็น 7 จากนั้นจึงนำไป Freeze dry และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยใช้เอนไซม์

นำผงโปรตีนที่สกัดได้ผสมกับสารละลาย phosphate buffer pH 7.4 อัตราส่วน 2:100 w/v จากนั้นเติมเอนไซม์ Alcalase ที่มีความเข้มข้น 2% w/v และ Papain ที่มีความเข้มข้น 1:100 w/v แล้วทำการย่อยโปรตีนเป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาจึงหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm ระยะเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant ไปศึกษา pattern ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE และหาค่า Degree of hydrolysate (%DH) ด้วยเทคนิค OPA assay

การหาค่า Degree of hydrolysate (%DH) ด้วยเทคนิค OPA assay

เตรียมสารละลาย OPA ปริมาตร 30 ml (o-phthalaldehyde 15 mg, beta-2-mercaptoethanaol 15 ul, ethanol 300 ul และ 50 mM sodium borate buffer pH8.5 29.685 ml) จากนั้นนำ supernatant ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A), Papain (PH-P) และผงโปรตีนที่ไม่ได้ย่อย (uncut) ปริมาตร 5 ul ผสมกับสารละลาย OPA 195 ul แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง Fluorescence ที่ค่า emission 460 นาโนเมตร และค่า excited 360 นาโนเมตร

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay

นำเซลล์ HCT116 เพาะเลี้ยงใน 96-well plate โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ $5x10^3$ cells/well เพาะเลี้ยงใน 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยแบ่งกลุ่ม การทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรตีน (1% DMSO) กลุ่มที่ 2 เซลล์ได้รับสารละลายผงโปรตีน (Uncut) กลุ่มที่ 3 คือเซลล์ได้รับสารละลายผงโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และกลุ่มที่ 4 คือเซลล์ได้รับสารละลายผงโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) โดยกลุ่มที่ 2-4 จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายที่ 100-1500 ug/ml แล้วบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในตู้ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสาร MTT ((3-4,5-Dimethylthaizol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำไปบ่มในตู้ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายผลึก formazan ด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

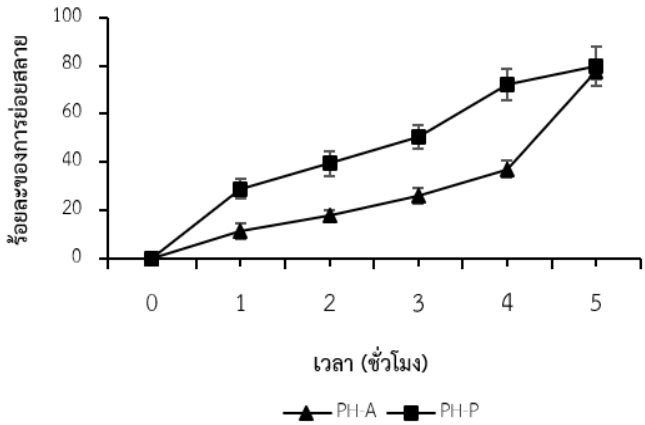
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ T-TEST และ one way analysis of variance (ANOVA) เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย $p<0.05$ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) (n=3)

ผลการวิจัย

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์

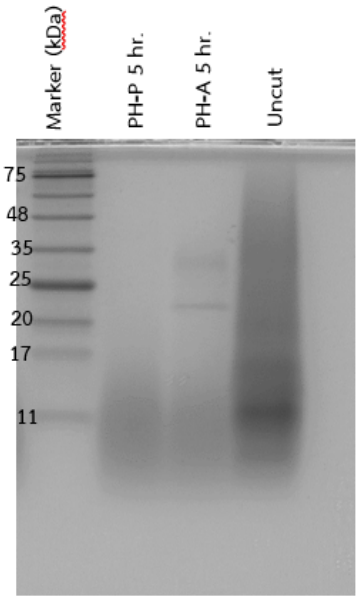
การศึกษาผลของระยะเวลาในการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ Alcalase และ Papain ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ พบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นโดยเอนไซม์ papain จะมีร้อยละของการย่อยสลายที่สูงกว่าเอนไซม์ Alcalase แต่ที่ 5 ชั่วโมงจะพบว่าร้อยละของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงระดับการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคา โดยใช้เอนไซม์ Alcalase (PH-A) และ Papain (PH-P)

การศึกษา pattern ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE

จากผลการศึกษารูปแบบของแถบแบนโปรตีนด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ได้แก่ Papain (PH-P) และ Alcalase (PH-A) ทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดลดลงอยู่ในช่วง 11-17 kDa เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ได้ตัด (Uncut) (ภาพที่ 2)

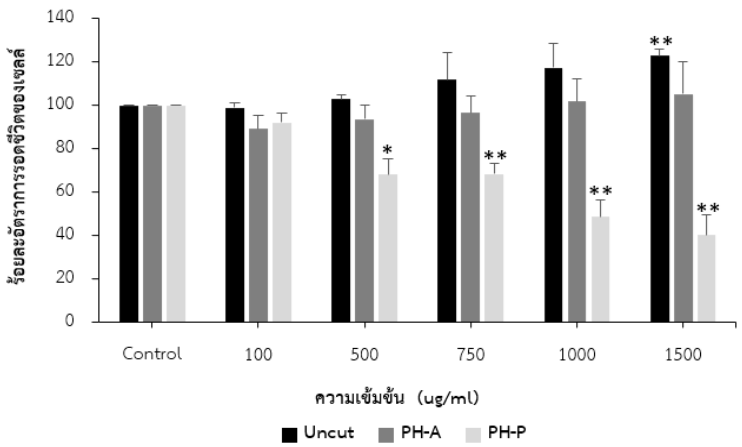


ภาพที่ 2 แสดง pattern ของผงโปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) และเอนไซม์ (PH-A) ด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE (16% gel separating)

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสารละลายโปรตีนจากผงโปรตีนถั่วดาวอินคาทั้ง 3 กลุ่ม ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งเซลล์ HCT116 จะได้รับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนจากผงโปรตีนถั่วดาวอินคาทั้ง 3 กลุ่ม คือ 100, 500, 750, 1000 และ 1500 ug/ml เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่มีความเข้มข้น 500 ug/ml ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นตั้งแต่ 750-1500 ug/ml ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) ที่ทุกความเข้มข้น ตั้งแต่ 100-1500 ug/ml ไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 แต่กลุ่มทดสอบที่ได้รับผงโปรตีน (Uncut) พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1500 ug/ml ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) (ภาพที่ 3)

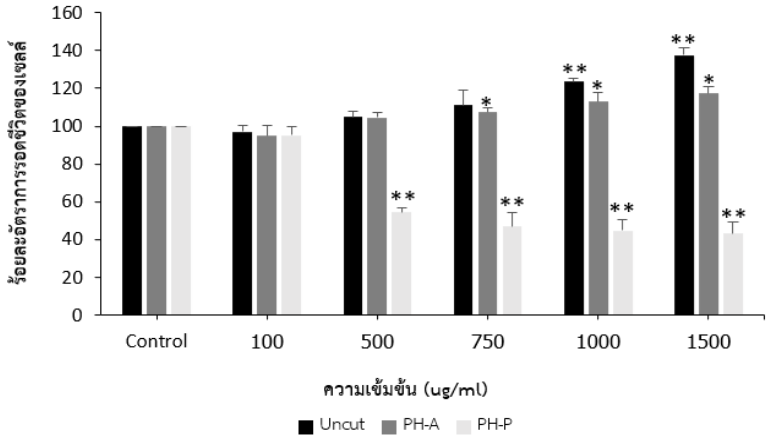


ภาพที่ 3 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับผงโปรตีน (Uncut) และโปรตีนไฮโดรไลทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (Mean±SD)

หมายเหตุ: *$p<0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

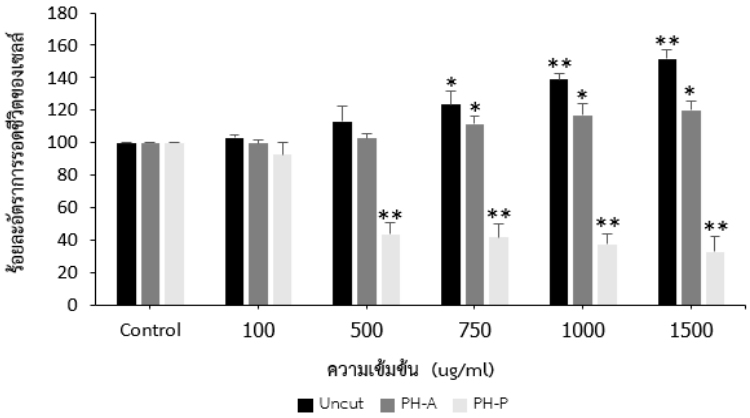
**$p<0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 48 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 500-1500 ug/ml ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) ที่มีความเข้มข้น 100 และ 500 ug/ml ไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 แต่ที่ระยะเวลานี้ส่งผลให้เซลล์ที่ได้รับความเข้มข้นตั้งแต่ 750-1500 ug/ml มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่กลุ่มทดสอบที่ได้รับผงโปรตีน (Uncut) พบว่าที่ความเข้มข้น 1000 และ 1500 ug/ml ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับผงโปรตีน (Uncut) และโปรตีนไฮโดรไลทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (Mean±SD)

หมายเหตุ: *p<0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
**p<0.01 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 5 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับผงโปรตีน (Uncut) และโปรตีนไฮโดรไลทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (Mean±SD)

หมายเหตุ: *p<0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
**p<0.01 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่ความเข้มข้น 500-1500 ug/ml ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) กลุ่มให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับที่เวลา 48 ชั่วโมง และกลุ่มทดสอบที่ได้รับผงโปรตีน (Uncut) ที่ความเข้มข้น 750 ug/ml

ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) และที่ความเข้มข้น 1000 และ 1500 ug/ml ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC50 ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P)

IC50 (24 ชั่วโมง)	IC50 (48 ชั่วโมง)	IC50 (72 ชั่วโมง)
985 µg/ml	645 µg/ml	465 µg/ml

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์

ระดับการย่อยสลายโปรตีนเป็นดัชนีที่ใช้อธิบายปริมาณการทำลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้วิธี OPA assay กล่าวคือ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะสามารถทำให้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี Fluorometry ซึ่งวิธีนี้จะให้ความไวสูง (Churuch et al., 1985) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์ Alcalase และ Papain ที่ pH 7.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ Alcalase มีระดับการย่อยสลายที่ต่ำกว่า เอนไซม์ Papain ในช่วงแรก เนื่องจาก pH ที่ใช้ในการย่อยอาจจะไม่เหมาะสม ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ทำงานแตกต่างกัน โดยเอนไซม์ Alcalase จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรตีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่ pH 7-10 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส หากสูงเกินไปจะทำให้เกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์เนื่องจากความร้อนสูง จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase คือการย่อยสลายที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะระยะเวลา 5 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงถึง 70-80% ส่วนเอนไซม์ Papain เป็นเป็นเอนไซม์ที่ได้จากพืช จัดอยู่ในกลุ่ม Cysteine protease สามารถย่อยสลายได้ที่ pH 6-7.5 อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส การศึกษาในครั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยด้วยเอนไซม์ Papain คือการย่อยสลายที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะระยะเวลา 5 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงถึง 80% ดังนั้นจะเห็นได้ว่าที่เวลา 5 ชั่วโมงเอนไซม์ทั้งสองมีระดับเปอร์เซนต์การย่อยสูงสุดและอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทดลองถัดไปจะเลือกใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลา 5 ชั่วโมง

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay

จากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง HCT116 หลังได้รับสารละลายโปรตีนจากผงโปรตีนถั่วดาวอินคาทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผงโปรตีน (Uncut) กลุ่มโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ซึ่งความเข้มข้นในการศึกษา คือ 100-1500 ug/ml ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นของกลุ่มทดสอบที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) โดยสามารถหาค่า IC50 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 985, 645 และ 465 ug/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนกลุ่มทดสอบที่ได้รับผงโปรตีน (Uncut) และโปรตีนไฮโดรไลทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT 116 แต่กลับส่งเสริมให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่

เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 48 และ 72 จากการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางโภชนาการของถั่วดาวอินคา พบว่ามีกรดอะมิโนที่สำคัญ ได้แก่ Leucine ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด และมีกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ tyrosine, isoleucine, lysine, threonine และ valine นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนที่มี sulfur เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ methionine, cysteine (Wang et al., 2018) เมื่อนำไปผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสททำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก รวมไปถึงกรดอะมิโนอิสระที่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดี และกรดอะมิโนและเปปไทด์เหล่านั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้นำแหล่งโปรตีนจากถั่ววอลนัท มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ Papain แล้วศึกษาผลของการยับยั้งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 ซึ่งมีค่า IC50 เท่ากับ 650 ± 0.42 ug/ml ที่เวลา 48 ชั่วโมง (Ma et al., 2015) การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อได้รับผงโปรตีน (Uncut) และโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับผงโปรตีนที่ความเข้มข้นของสารที่เพิ่มสูงขึ้น โดยกลุ่มทดสอบที่ได้รับผงโปรตีน (Uncut) มีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) เนื่องจากกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ได้รับ serum-free media ดังนั้นในกลุ่มที่ได้รับผงโปรตีนที่ไม่มีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โปรตีนหรือเปปไทด์รวมทั้งกรดอะมิโนอิสระจึงเป็นแหล่งอาหารที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2008 ที่ได้นำถั่ว Chickpea มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase เพื่อใช้แทนซีรั่มในการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Girón-Calle et al., 2008) เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์สามารถส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ในขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่มและโปรตีน อย่างไรก็ตามอาจจะมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของอัตราการรอดชีวิตในเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติควบคู่ด้วย

จากการศึกษาของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงเปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain และ Alcalase มีความแตกต่างกันโดยเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ Papain มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ได้ ส่วนผงโปรตีน (Uncut) และโปรตีนไฮโดรไลทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 แต่กลับส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นถึงเปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain เป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเปปไทด์สายสั้นของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ สามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหา active peptide พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรืออาหารเพื่อสุขภาพในการต้านโรคมะเร็งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดามรัศมน สุรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการดูแลและให้คำปรึกษา ตลอดจนห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

วีรวุฒิ อิ่มสำราญ. มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก [วารสารออนไลน์] 2562 [8 ธันวาคม 2563] Available from: http://www.nci.go.th/th/Knowledge/article.html

Bhat ZF, Sunil K, Hina FB. Bioactive peptides of animal origin: a review. Journal of Food Science and Technology 2015; 52.9: 5377-5392.

Chalamaiah M, Wenlin Y, Jianping W. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins. A review: Food chemistry 2018; 245: 205-222.

Church FC, Porter DH, Catignani GL, Swaisgood, HE. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. Analytical biochemistry 1985; 146(2): 343-348.

Girón-Calle J, et al. Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. Cytotechnology 2008; 57.3: 263-272.

Gonzalez-Aspajo G, Belkhelfa H, Haddioui-Hbabi L, Bourdy G, Deharo E. Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococus aureus* to human skin explant and keratinocytes in vitro. Journal of ethnopharmacology 2015; 171: 330-334.

Ma S, et al. Isolation of a novel bio-peptide from walnut residual protein inducing apoptosis and autophagy on cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 2015; 15.1: 1-14.

Nascimento AKL, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013; 2013.

Rawdkuen S, Nurdalila R, Suttiporn P. Characterization of sacha inchi protein hydrolysates produced by crude papain and Calotropis proteases. LWT 2018; 98: 18-24.

Šterbová L, Hlásná Čepková P, Viehmannová I, Huansi D. Effect of thermal processing on phenolic content, tocopherols and antioxidant activity of sacha inchi kernels. Journal of Food Processing and Preservation 2017; 41(2): e12848.

Wang S, Fan Z, Yukio K. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. Food chemistry 2018; 265: 316-328.