การเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Per.)

Growth of Melanoma Cells in Vitro Culture with Extracts of Queen's Flower (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Per.)

ณัฐพร บู๊ฮวด*[1] ปิยนุช พรมภมร[1] ทัศนีย์ พาณิชย์กุล[1] จิระวดี วิริยะแสงจันทร์[1]
ประภาศิริ ปราโมทย์[1] พัชรีภรณ์ พิสุราช[1] มลิวัลย์ เอมแย้ม[2]
[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Nattaporn Boohuad*[1], Piyanuch Prompamorn[1], Tasanee Panichakul[1], Jirawadee Viriyasangjan[1], Prapasiri Pramote[1], Phatchareeporn Pisurat[1] and Maliwan Emyeam[2]
[1]Faculty Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University
[2]Faculty of Science, Mahidol University

บทคัดย่อ

อินทนิลน้ำ (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Per.) หรือ Queen's Flower เป็นพืชสมุนไพรที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และส่วนต่างๆ ของพืชสามารถรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคเบาหวาน โรคอ้วน นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในเครื่องสำอางสำหรับผิวหนังและเส้นผม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนำมาใช้สำหรับผลิตภัณฑ์ปรับสีผิว ต้านริ้วรอย ฝาดสมานผิวและกระตุ้นการเจริญของเส้นผม การใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะต้องสัมผัสกับผิวหนังโดยตรง ดังนั้นฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์จึงมีความสำคัญ งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ โดยเซลล์เมลาโนมาถูกเลี้ยงด้วยจำนวนเริ่มต้น $2x10^5$, $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในจานหลุม 6 หลุม (6-well tissue culture plate) ในอาหารชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และถูกทดสอบกับสารอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/ml เซลล์ถูกเลี้ยงอยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า เวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) มีค่าเฉลี่ย 70.03±8.26 ชั่วโมง และสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: nattaporn2608@gmail.com
งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

10 µg/ml ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และเวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารโดยไม่มีสารสกัด ส่วนสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลทำให้เซลล์เริ่มตายในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.037 (p<0.05) และสารดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01% ที่ใช้ละลายสารอินทนิลน้ำ ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ผลจากการวิจัยทำให้ทราบว่าความเข้มข้นของสารที่นำมาใช้มีผลต่อการเจริญของเซลล์ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้หรือกำหนดความเข้มข้นของสารนี้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ : เซลล์เมลาโนมา สารสกัด อินทนิลน้ำ

Abstract

Queen's flower (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Per.) is a traditional herbs in South East Asia. Extracts of Queen's flower have been used to treat ailments such as Diabetes and Obesity. Moreover, it has been used in cosmetic products for skincare and haircare as it has anti-oxidant qualities to whitening, anti-wrinkles, astringent, and enhance hair growth. The products are normally used directly with skin contact. In this study, growth of melanoma cells with Queen's flower extract was studied. Results showed that cell numbers $2x10^5$, $3x10^5$ and $4x10^5$ cell per well in 6 well tissue culture plate were cultured in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 10% of fetal bovine serum at 37° C. Queen's flower extracts of three concentrations 1, 10 and 100 microgram/ml added in cell cultures were tested for 7 days. Results showed that doubling time of cell growth was 70.03±8.26 hour. Queen's flower extracts 1 and 10 microgram/ml have no effects with the cell growth and no difference of doubling time was found between with and without extract. But the one with 100 microgram/ml caused the cells to die on the third day of cultures with the significant value p = 0.037 (p<0.05). DMSO (dimethlysulfonyloxide) used as diluent for Queen's flower extract in various concentrations of 0.0001, 0.001 and 0.01% were tested with the cells and results showed no inhibition of cell growth. This study showed the concentration levels of Queen's flower extract that effects on melanoma cell growth and this is useful to apply for cosmetic product development.

Keywords : melanomacells, extract, queen's flower, (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Per.)

บทนำ

ในปัจจุบันนี้ผู้บริโภคมีความเป็นห่วงสุขภาพมากขึ้น จึงพยายามหลีกเลี่ยงจากสารพิษทั้งหลาย แม้กระทั่งในเรื่องความงามก็นิยมนำสมุนไพรมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางเพื่อเสริมบุคลิกและรักษาสุขภาพ มีการสำรวจรายชื่อพืชสมุนไพรจากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีจำหน่ายในท้องตลาด มีจำนวนมากถึง 264 ผลิตภัณฑ์ จึงทำให้การตรวจสอบความปลอดภัยของสารที่ใช้มีความสำคัญ และมีการกำหนดกฎเกณฑ์ในการตรวจสอบ กระบวนการตรวจสอบความปลอดภัยในการใช้สารเหล่านั้น ซึ่งการตรวจสอบมีหลายวิธี การนำเซลล์ของคนมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารจึงเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ เพราะไม่เสี่ยงที่ต้องทดสอบกับคนหรือในสัตว์ทดลอง การทดลองโดยวิธีการทดสอบกับเซลล์จัดเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) ซึ่งเป็นการศึกษาถึงข้อมูลขั้นพื้นฐานในระดับเซลล์ ก่อนที่จะศึกษาในสัตว์ทดลอง (in vivo test) และนำผลที่ได้มาใช้ทดลองในคนต่อไป (Wiratchawong, P., 2008) มีเซลล์ชนิดที่มีคุณสมบัติแบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุด (continuous cell line) ซึ่งสามารถเลี้ยงต่อไปได้เรื่อย ๆ เช่น เซลล์มะเร็ง ซึ่งจะสะดวกในการศึกษาวิจัยเนื่องจากสามารถเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องและไม่ต้องมีกระบวนการยุ่งยากในการแยกเซลล์ออกจากสิ่งมีชีวิตหรืออวัยวะ (Sri-Me B., 2013)

อินทนิลน้ำหรือตะแบกดำมีชื่อสามัญคือ Queen's flower และชื่อในภาษาตากาลอกคือ Banaba เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ในวงศ์ Lythraceae ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lagestroemia speciosa* (L.) Pers. เป็นพืชสมุนไพรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีถิ่นกำเนิดในไทย อินเดีย มาเลเซีย และฟิลิปปินส์และเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดสกลนคร (Patumlongthong, 2012) มีการใช้ในรูปชาชงจากใบ สารสกัดจากใบและส่วนต่างๆ สามารถรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคเบาหวาน โรคอ้วน (Saraswathi et al., 2011) มีสารสำคัญที่พบได้แก่ แทนนิน 12.8-13.3% จากเปลือกลำต้นมี 10% (Kerddonfag, 2001) และพบสารกลุ่ม triterpene และ steroid พบว่าสารที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดในใบของอินทนิลคือ corosolic acid และสารแทนนิน ใบอินทนิลน้ำที่สกัดด้วยน้ำหรือเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* (Gram positive) และ *Psedomonas aeruginosa, Escherichia coli* (Gram negative bacteria) โดยการสกัดใบของอินทนิลน้ำด้วยน้ำจะให้ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอล (Ambujakshi et al., 2009) มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำด้วยเอทานอลในการกระตุ้นการดูดซึมกลูโคสในเซลล์กล้ามเนื้อ (L8 muscle cells) พบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลปริมาณสูงและมีความสามารถในการกระตุ้นการดูดซึมกลูโคสในเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L8 ได้มากขึ้นโดยแปรผันตรงกับปริมาณที่ใช้ (Keawpradub, & Purintrapiban, 2009) และมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบและต้นของอินทนิลน้ำด้วยเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 ในเซลล์ไลน์ชนิด TZM-bl และ CEM-GFP มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50% (IC_{50}) ตั้งแต่ 1 ถึง 25 µg /ml. (Vinu

et al., 2013) การนำไปใช้ประโยชน์ด้านเครื่องสำอางพบว่าอินทนิลน้ำเป็นพืชที่มีฤทธิ์แอนติออกซิเด้นท์สูง จึงนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนังและเส้นผม มีคุณสมบัติช่วยปรับสีผิว (whitening) ต่อต้านการแก่ (anti-aging) ต่อต้านการเกิดริ้วรอย (anti-wrinkle) ฝาดสมานผิว (astringent) เนื่องจากมีส่วนประกอบของแทนนินและกระตุ้นการงอกของเส้นผม (hair growth)

เซลล์เมลาโนมา ซี 32 เป็นชนิดอะเมลาโนทิค เมลาโนมา (Amelanotic melanoma) คือ เซลล์มะเร็งที่ไม่สร้างเม็ดสี จะมีทั้งสีชมพู แดง ม่วงหรือสีผิวปกติ ทำให้ยากต่อการวินิจฉัยพบ (James, D., Berger, T. & Elston, D., 2011) เซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่พบในผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิส (epidermis) ของร่างกาย เนื่องจากเซลล์สามารถเพาะเลี้ยงได้ในหลอดทดลอง แบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุดสามารถเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง มีการศึกษานำสารสำคัญในพืชสมุนไพรธรรมชาติมาศึกษาในเซลล์เมลาโนมา ซี 32 ได้แก่ ศึกษาสารเคอร์คูมิน (curcumin) จากขมิ้นในการเหนี่ยวนำให้เกิด Antiproliferative และ Proapoptotic ที่มีผลต่อเซล์เมลาโนมา ซี 32 การศึกษาความเป็นพิษของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระจาก Hypericum triquetrifolium Turra ใน เซล์เมลาโนมา ซี 32 (Conforti et al., 2008)

ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากต้น *Lagerstroemia speciosa* (L) Pers. หรือชื่อทั่วไปเรียก อินทนิลน้ำ ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา เพื่อเป็นการนำทักษะและความรู้ที่ได้มาเป็นพื้นฐานในการศึกษาสารสำคัญชนิดอื่นๆ ที่เป็นสารสำคัญหรือส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และเครื่องสำอางซึ่งการใช้ต้องทาบนผิวหนังโดยตรง เช่น ครีมต่อต้านความชรา เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารสกัดสมุนไพร

สารสกัดจากต้นอินทนิลน้ำ (*Lagestroemia speciosa* (L.) Pers.) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท บรอนสันแอนด์จาคอบส์อินเตอร์เนชันแนล จำกัด โดยถูกละลายและเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10,000 µg/ml ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethylsulfonyloxide) 1% และนำมาทำให้ปลอดเชื้อโดยผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา

เซลล์เมลาโนมาของคน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% offetal bovine serum)

และถูกอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% มีการให้อาหารแก่เซลล์อย่างสม่ำเสมอทุกๆ 2-3 วัน และเซลล์จะต้องถูก subculture ทุกๆ สัปดาห์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพพร้อมใช้งานและปลอดจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้รับความอนุเคราะห์ให้เข้าไปใช้ห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

เนื่องจากเซลล์เมลาโนมาที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเกาะพื้นผิว (adherent cells) ในขั้นตอนการ subculture จึงต้องทำการย่อยเซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) จากนั้นจึงทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด จึงนำเซลล์ดังกล่าวในจำนวนที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงต่อไป โดยขั้นตอนในการย่อยเซลล์มีดังนี้ 1) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (flask) ให้หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) จำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อไม่ให้มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคลือบอยู่ เพราะโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเซลล์จะรบกวนการทำงานของสารละลายทริปซิน (Trypsin/EDTA) จากนั้นจึงดูดสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ทิ้ง 2) เติมสารละลายทริปซิน (Trypsin/EDTA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในภาชนะเพื่อทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ รอจนเซลล์หลุดออกจนหมด 3) เมื่อเซลล์หลุดหมด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดูดพ่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดและกระจายออกจากกัน จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่น (Centrifuge Tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง G8-15R centrifuge ที่ความเร็ว 1,600 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 4) ดูดน้ำส่วนบนทิ้งไป จะได้กลุ่มเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้นหลอดปั่น ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ แบ่งเซลล์ที่ได้จากการย่อยเซลล์ไปนับจำนวนเซลล์ โดยนำเซลล์ที่ได้ไปย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (trypan blue) ในอัตราส่วน 1:10 (cell 10 µl : trypan blue 90 µl) จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer คำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้ เซลล์ถูกนำไปเพาะเลี้ยงในภาชนะใหม่ต่อไป

3. การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ (growth curve)

เป็นการหาค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ในแต่ละวัน เพื่อเลือกจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา โดยเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$, $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และถูกอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO2) 5% ในจานหลุม 6 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน พร้อมกับทำการสังเกตการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องหัวกลับ (inverted microscope) ทำการย่อยเซลล์ด้วยสารละลายทริปซิน (Trypsin) และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวัน นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ในแต่ละวันมาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการเจริญของเซลล์ หรือค่า Doubling time คือ เวลาที่เซลล์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์ตั้งต้น (Freshney & Jan, 1987)

4. ศึกษาการเจริญของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากอินทนิลน้ำ

ทำการทดสอบฤทธิ์สารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ เนื่องจากสารสกัดอินทนิลน้ำมีลักษณะเป็นผงถูกละลายในดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethylsulfonyloxide) จึงทำการทดสอบฤทธิ์ของดีเอ็มเอสโอด้วย โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ และ ดีเอ็มเอสโอในความเข้มข้นของสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 µg/ml และดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001 และ 0.01% เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน พร้อมกับทำการสังเกตการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องหัวกลับ (inverted microscope) นับจำนวนเซลล์เป็นและเซลล์ตายทุกวัน

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในสภาวะควบคุมคือ ในอาหารชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ และ ดีเอ็มเอสโอในความเข้มข้นของสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 µg/ml และดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001 และ 0.01% ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้โปรแกรม SPSS v.11.5 เลือกใช้การวิเคราะห์แบบ Complete Randomized Design (CRD) หรือ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ผลการทดลอง

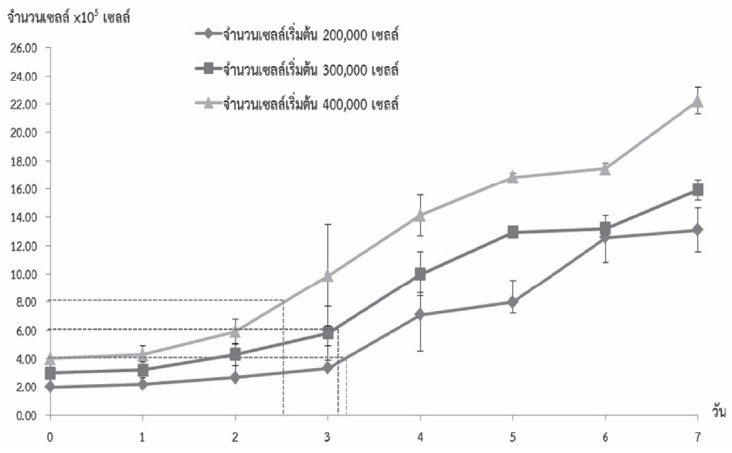
1. การเลี้ยงจำนวนเซลล์เมลาโนมาที่เหมาะสมในจานหลุม

จากการศึกษาการเจริญของเซลล์ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$, $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 7 วันพบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ดี มีการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าที่เวลา 76.27, 73.15 และ 60.66 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1(A) และค่าเฉลี่ยการเจริญของเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าที่เวลา 70.03±8.26 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาการเจริญของเซลล์ในการทดลองนี้จะต้องทำการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาอย่างน้อย 60.66 ชั่วโมง

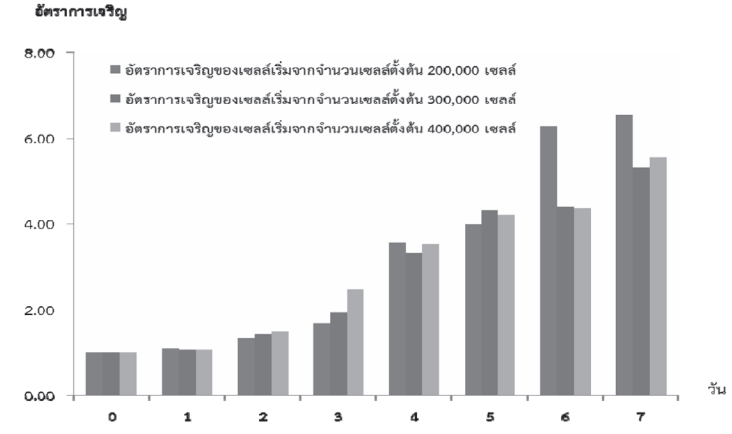
เมื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญของเซลล์จากค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็นเวลา 7 วัน แสดงดังภาพที่ 1 (B) พบว่าที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$, $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นทุกวัน แสดงให้เห็นว่าการทดลองเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10% เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์ ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$ และ $3x10^5$ เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญของเซลล์เป็นสองเท่าหลังวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของการเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญของเซลล์เป็นสองเท่าหลังวันที่ 2 ถึงวันที่ 5 ของการเลี้ยงเซลล์ แต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 7 พบว่าที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญสูงกว่าอัตราการเจริญของจำนวนเซลล์เริ่มต้น $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุมอย่างชัดเจน

โดยพบว่าที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม มีเซลล์ตายบางส่วนคิดเป็น 10% อันเนื่องมาจากเซลล์มีจำนวนมากและอาหารไม่เพียงพอกับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น และพื้นที่ที่จะให้เซลล์เจริญไม่เพียงพอ สำหรับเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม พบว่าเซลล์กระจายตัวบนหลุมได้เหมาะสม ไม่หนาแน่นหรือน้อยจนเกินไป เนื่องจากมีพื้นที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์เจริญได้ดี และมีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมกับปริมาณอาหาร ดั้งนั้นที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม จึงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป

A



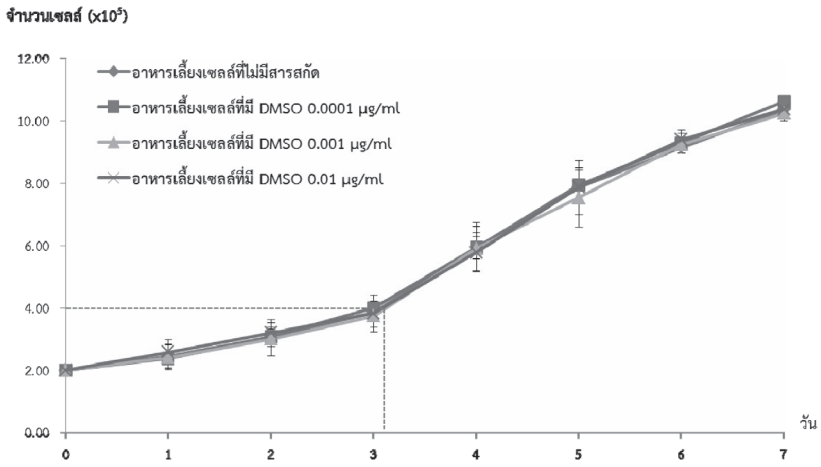
B



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของเซลล์เมลาโนมา (growth curve) (A) และอัตราการเจริญของเซลล์ (B) โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์คำนวณจากสามการทดลอง เริ่มจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น 200,000, 300,000 และ 400,000 เซลล์

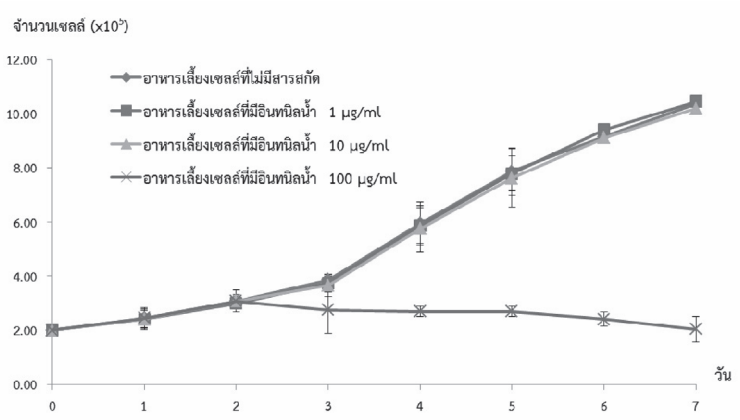
2. การศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ ในภาพที่ 2 และ 3 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่ถูกละลายในดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01 % และถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:10 (1, 10, 100 µg/ml) สารสกัดอินทนิลน้ำและดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้นต่างๆ ถูกนำมาทดสอบกับการเจริญของเซลล์เป็นเวลา 7 วัน จากภาพที่ 2 ผลการทดสอบพบว่าเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01 % เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีการเจริญอยู่ในช่วง $2.45\pm0.11x10^5$ ถึง $10.42\pm0.19x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ซึ่งใกล้เคียงกับในหลุมที่ไม่มีดีเอ็มเอสโอ คือมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง $2.45\pm0.38x10^5$ ถึง $10.37\pm0.25x10^5$ เซลล์ต่อหลุม แสดงว่าดีเอ็มเอสโอไม่มีผลรบกวนต่อการเจริญของเซลล์ จึงสามารถใช้ดีเอ็มเอสโอเป็นตัวทำละลายอินทนิลน้ำในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ได้ จากภาพที่ 3 (A) ผลการทดสอบพบว่า เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีการเจริญอยู่ในช่วง $2.41\pm0.00x10^5$ ถึง $10.33\pm0.18x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ซึ่งใกล้เคียงกับในหลุมที่ไม่มีอินทนิล คือมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง $2.45\pm0.38x10^5$ ถึง $10.37\pm0.25x10^5$ เซลล์ต่อหลุม แสดงว่าอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และไม่พบความแตกต่างของเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีและไม่มีสารสกัด แต่พบว่าเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ในวันที่ 1 และ 2 เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนเป็น $2.45\pm0.07x10^5$ และ $3.08\pm0.19x10^5$ เซลล์ต่อหลุมตามลำดับ แต่ในวันที่ 3 เริ่มพบเซลล์ตาย และในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ $2.75\pm0.87x10^5$, $2.70\pm0.19x10^5$, $2.70\pm0.19x10^5$, $2.41\pm0.26x10^5$ และ $2.04\pm0.47x10^5$ เซลล์ต่อหลุมตามลำดับ และจากภาพที่ 3 (B) จะเห็นได้ว่าเซลล์มีอัตราการเจริญลดลงอย่างชัดเจน แสดงว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลต่อการเจริญของเซลล์ คือทำให้เซลล์เริ่มตายในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์และพบว่าเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอินทนิลน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 4 และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างการเจริญของเซลล์ในหลุมที่มีอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เทียบกับในหลุมที่ไม่มีอินทนิลน้ำด้วย One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.037$)

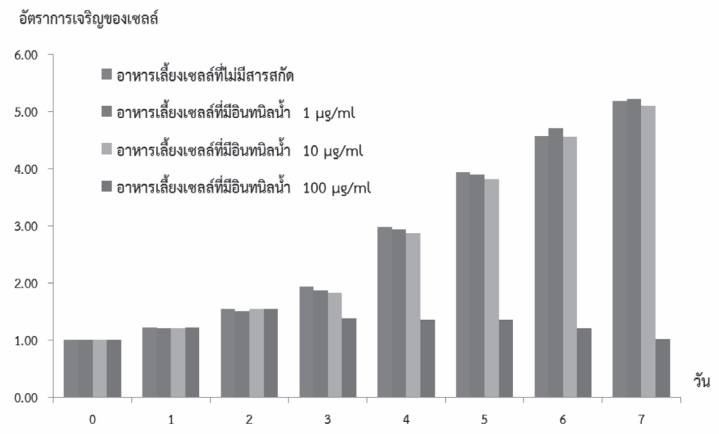


ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10% โดยไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ 0.0001, 0.001 และ 0.01 % เป็นเวลา 7 วัน

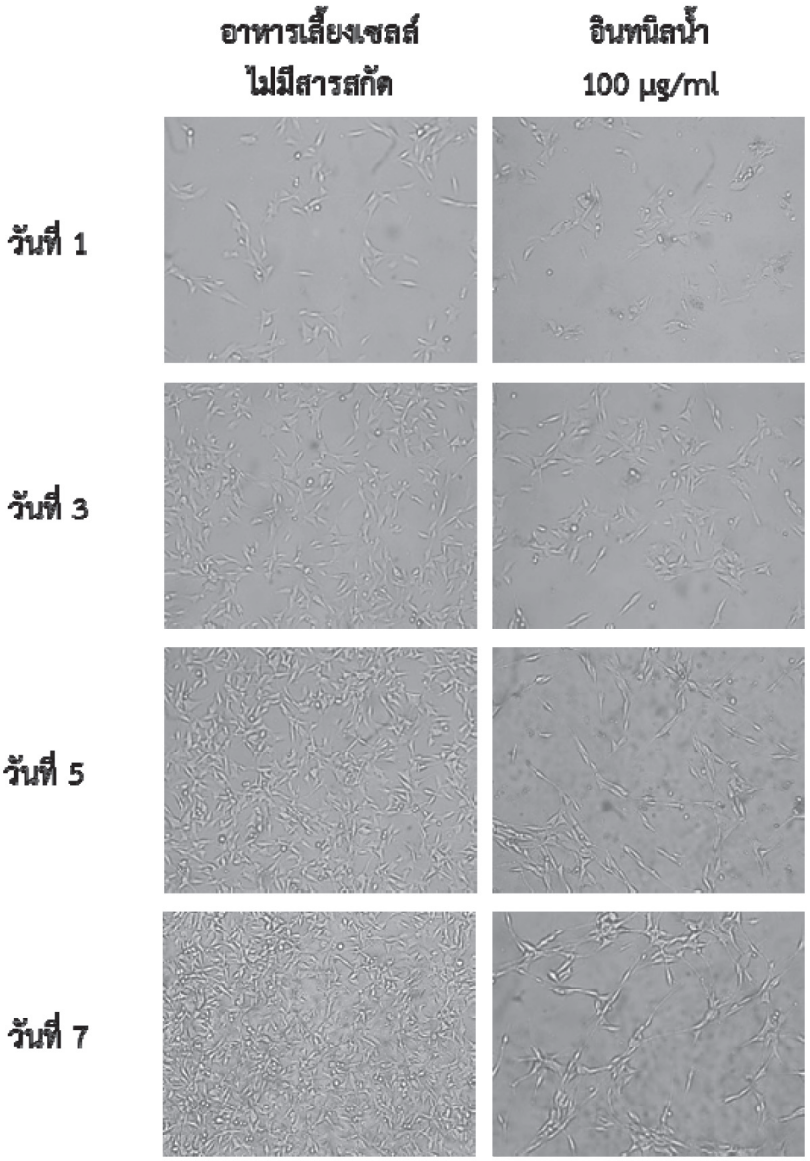
A



B



ภาพที่ 3 ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ (A) อัตราการเจริญของเซลล์ (B) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม ผสมซีรั่มลูกวัว 10% โดยไม่มีสารสกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมีสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4 เซลล์เมลาโนมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10% โดยไม่มีสารสกัดและ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ 100 µg/ml ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา แต่พบว่าอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลต่อการเจริญของเซลล์คือทำให้เซลล์ตายในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์และพบว่าเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารอินทนิลน้ำซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Panichakul et al (2013) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคน : ศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 µg /ml มีผลทำให้เซลล์ตายตั้งแต่ 24 ชั่วโมงในขณะที่ความเข้มข้น 100 µg /ml ไม่มีผลทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมงแต่ที่เวลา 72 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหาร (DMEM, 10% FBS) ที่ไม่มีสารอินทนิลน้ำ และพบว่าเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) และ Vinu et al. (2013) ยังพบว่าสารสกัดจากใบและต้นของอินทนิลน้ำด้วยเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 NL 4.3 ในเซลล์ไลน์ชนิด TZM-bl และ CEM-GFP มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50% (IC_{50}) ตั้งแต่ 1 ถึง 25 µg /ml.

การเลือกสารที่ใช้สกัดและส่วนของอินทนิลน้ำมาทำการศึกษา เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อองค์ประกอบที่สำคัญในสารสกัดอินทนิลน้ำ เนื่องมาจาก Ambujakshi et al. (2009) พบว่าการสกัดใบของอินทนิลน้ำด้วยน้ำจะให้ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลเนื่องจากได้สารแทนนินออกมา นอกจากนี้การศึกษาของ Rahman et al. (2009) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของใบอินทนิลน้ำที่ถูกสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์ พบสารสำคัญใหม่สองตัว ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ ในขณะที่ Patel, Shah, & Mesariya (2011) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากอินทนิลน้ำ พบว่าการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์และสารเบนซีน จะไม่พบสารสำคัญพวก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนิน แต่ถ้าสกัดด้วยเอทานอลจะพบสารฟลาโวนอยด์และแทนนิน และถ้าสกัดด้วยน้ำจะพบสารฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนิน ดังนั้นในการเลือกสารที่นำมาศึกษาจะต้องทราบว่ามาจากส่วนใดของพืชและสกัดด้วยวิธีใด ในการศึกษานี้เป็นการนำอินทนิลน้ำที่อยู่ในรูปผง สกัดได้จากส่วนใบ นำมาละลายด้วยตัวทำละลายแทนการสกัด เนื่องจากไม่ทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ เมื่อละลายด้วยน้ำและเอธานอลพบว่าไม่สามารถละลายได้หมดจึงนำมาละลายด้วยสารดีเอ็มเอสโอซึ่งเป็นเป็นตัวทำละลายที่ดีมากแต่เป็นสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายและสามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ดี จึงต้องมีการทดสอบฤทธิ์ของดีเอ็มเอสโอต่อการเจริญของเซลล์ก่อน เพื่อป้องกันการรบกวนต่อผลการเจริญของเซลล์ในอินทนิลน้ำ

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาการทดสอบเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารจะออกฤทธิ์แรงมากขึ้นและเมื่อทดสอบเซลล์นานขึ้นพบว่าการเจริญของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งสามารถประเมินระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบจากผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ (growth curve) เพื่อหาค่าการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเซลล์

(doubling time) ก่อน ซึ่งข้อมูลพื้นฐานนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

เซลล์เมลาโนมาซี 32 ที่นำมาทดสอบมีค่าเฉลี่ยการเจริญเป็นสองเท่าของเซลล์เป็น 70.03 ชั่วโมง สารสกัดอินทนิลน้ำที่ละลายด้วยสารดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ไม่มีผลรบกวนการเจริญของเซลล์เมลาโนมาแต่ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมาคือทำให้เซลล์ตายและมีการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.037 ดังนั้นจึงสามารถนำผลการศึกษามาเป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังทางเครื่องสำอางต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

1. การตั้งตำรับเครื่องสำอางให้มีความปลอดภัยต้องคำนึงถึงชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาใช้อย่างเหมาะสม
2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-100 µg/ml เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เริ่มตายหรือลดจำนวนลง
3. ศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ที่ทำให้บริสุทธิ์ของอินทนิลน้ำ
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังทางเครื่องสำอางได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาส เซลล์เมลาโนไซต์ เป็นต้น
5. การนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางควรมีการทดสอบผลทางคลีนิกด้วย

References

Ambujakshi, H.R., Surendra, V., Haribabu, T. & Divakar, G. (2009). Antibacterial activity of leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L) Pers. *Journal of Pharmacy Research,* 2(6), 1028.

Casson, L. (1989). *The periplusmariserythraei.* Greek : Princeton University.

Chen, TR. & Shaw, MW. (1973). Stable chromosome changes in human malignant melanoma. *Cancer Res,* 33, 2042-2047.

Chen, TR. (1978). Evolution in vitro of stemlines with minimal karyotypic deviations in a human heteroploid cell line. *Journal of The National Cancer Institute,* 61, 277-284.

Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine. (2011). *Herbals for reducing diabetes risk by local medical wisdoms.* Bangkok : The War Veterans Organization of Thailand. (in Thai).

Department Operation Center of Economic Crops. (2012). *Lagerstroemia speciosa.* Retrieved June 25, 2012 from http://www.dnp.go.th/EPAC/Herb/30intaninnum.htl.

Freshney, R. & Jan. (1987). Culture of animal cells : A manual of basic technique. *Cancer Res,* 2, 32-55, 85-134.

George, E. (1996). In vitro toxicology in the pharmaceutical industry : Practical aspects and examples. *Comparative Haematology International,* 6, 237-241.

James, D., Berger, T. & Elston, D. (2011). Andrews' Diseases of the Skin : clinical Dermatology. *Elsevier Health Sciences,* 694–9.

Keawpradub, N. & Purintrapiban, J. (2009). Upregulation of glucose uptake in L8 myotubes by the extract from *Lagerstroemia speciosa :* a possible mechanism of action. *Maejo International Journal of Science and Technology,* 3(03), 472-485. (in Thai).

Kerddonfag, J., (2001). *Herbals for Diabetes Treatment.* Bangkok : Seven Printing Group. (in Thai).

Leelapornpisit, P. (2001). *Cosmetic for skins.* Chiangmai University. Faculty of Pharmacy. (in Thai).

McKim JM Jr, Keller DJ 3rd & Gorski JR. (2012). An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. *CutanOculToxicol,* 1-4.

Panichakul T., Prompamorn P., Boohuad N., Sriyaem S., Kanjanapachacha A., Aim-Yam M. (2013). Cytotoxic activity of Banaba's extracts against human melanoma cells: In vitro study. *SDU Research Journal Sciences and Tecjhnology* 6(2), 97-113.

Patel, N., Shah, V., & Mesariya, P. (2011). Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of roots of Lagestroemiaspeciosa Pers. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development,* 3(6), 110-117.

Patumlongthong, S. (2012). *Auspicious plants of Thai provinces.* Bangkok. Asis Press (1989). (in Thai).

Rahman, S.M., Pervin, S., Quader, Md. & Hossain, M. (2009), Phytochemical studies of the petroleum ether extract of the leaves Lagerstroemia speciosa Linn. *Indonesian Journal of Chemistry,* 9(3), 470 – 473.

Saraswathi, V., Thirumalai, D., Yadav, P., & Saranya, M. (2011). Pharmacognostic and preliminary phytochemical study of *Lagestroemia speciosa* leaf. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy,* 2(3), 893-898.

Sri-Me, B. (2009). Cell culture. *The Government Pharmaceutical Organization (GPO) R&D Newsletter,* 20(1), 19-23. (in Thai).

Vinu, N., Modi, M., Goel, T., Das, T., Malik, S., Suri, S., Rawat, AK., Srivastava, SK., Tuli, R., Malhotra, S. & Gupta, SK. (2013). Ellagic acid & gallic acid from *Lagerstroemia speciosa* L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity. *Indian Journal of Medical Research,* 137(3), 540–548.

Wiratchawong, P. (2008). Alternative to Laboratory Animal. *The Government Pharmaceutical Organization (GPO) R&D Newsletter.* Retrieved June 23, 2008, from http://www. gpo.or.th/rdi/html/alter.html.

คณะผู้เขียน

อาจารย์ณัฐพร บู๊ฮวด

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

e-mail: nattaporn2608@gmail.com

ดร.ปิยนุช พรมภร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

e-mail: piyanuch_ppm@

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

e-mail: tasanee_p@yahoo.com

นางสาวจิระวดี วิริยะแสงจันทร์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

e-mail: kimhyun_joo@hotmail.com

นางสาวประภาศิริ ปราโมทย์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

e-mail: prapasiri_jar_14@hotmail.com

นางสาวพัชรีภรณ์ พิสุราช

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด แขวงบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

e-mail: yungying_7797@hotmail.co.th

นางมลิวัลย์ เอมแย้ม

ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

272 ถ.พระรามที่ 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400