
การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทะเลบริเวณอ่าวไทย
Cytotoxic Activities of Crude Extract from Seaweeds along the Gulf of Thailand on Cancer Cells

จันทรวรรณ แสงแข^{1*}, จงกมลณี จงอร่ามเรือง² และ ธิดารัตน์ น้อยรักษา³

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

³ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Chantarawan Saengkhae^{1*}, Jongkolnee Jongaramruong² and Thidarat Noiraksar³

¹Department of Medical Science, Faculty of Science, Burapha University

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

³Institute of Marine Science, Burapha University

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการค้นหาโมเลกุลที่สามารถรักษาโรคมะเร็งได้ ตัวอย่างสาหร่ายทะเล 19 ชนิด (สีน้ำตาล 15 ชนิด, สีแดง 2 ชนิด และสีเขียว 2 ชนิด) ถูกเก็บมาจากชายฝั่งทะเลอ่าวไทยในจังหวัดชลบุรี และระยองโดยการดำน้ำแบบ SCUBA ตัวอย่างสดนำมาสกัดด้วย ethyl acetate ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกับเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดคือ มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งช่องปาก (KB), มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งสมอง (ASK) ด้วยเทคนิค MTT

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาลทั้งหมด 15 ชนิด มีจำนวน 4 ชนิด (*Sargassum oligocystum*, *Sargassum swartzii*, *Sargassum binderi* และ *Turbinaria conoides*) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็ง (ใช้ค่า $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$) โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นเป็นสัดส่วนตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent cytotoxicity) สาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Turbinaria conoides* มีประสิทธิภาพสูงต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งเต้านม และมะเร็งสมอง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19, 18, 22 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีแดงทั้งหมด 2 ชนิด มีจำนวน 1 ชนิด (*Chondrophyucus cartilaginous*) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งเต้านม โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32 และ 34 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 2 ชนิด และทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็ง โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียว (*Halimeda macroloba*) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งเต้านม และมะเร็งสมอง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30, 32, 28 และ 41 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียว (*Caulerpa racemosa*) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งช่องปาก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18 และ 36 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยเซลล์ที่ตายมีลักษณะกลม ไม่ติดแน่น แยกจากกันได้ง่าย เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวย เกาะติดผิวภาชนะแน่น อย่างไรก็ตามควรสกัดเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็งต่อไป

คำสำคัญ : เซลล์มะเร็ง, ความเป็นพิษ, สารสกัดหยาบ, สาหร่ายทะเล, อ่าวไทย

*Corresponding author. E-mail : schantara@yahoo.com

Abstract

The marine natural products are the source of structurally unique and are helpful for the discovery of bioactive compounds for deadly diseases like cancer. The specimens of 19 seaweed species (15 brown, 2 red and 2 green seaweeds) were collected from Chonburi and Rayong provinces along the east coast of the Gulf of Thailand by SCUBA diving. The fresh samples were extracted with ethyl acetate. The cytotoxic activities of the crude extract were determined by the MTT test against four cancer cell lines such as human cervical carcinoma (HeLa), human oropharyngeal carcinoma (KB), human breast adenocarcinoma (MCF-7) and rat glioma cancer (ASK).

The crude extract of 4 among 15 brown seaweeds (*Sargassum oligocystum*, *Sargassum swartzii*, *Sargassum binderi* and *Turbinaria conoides*) showed dose-dependent cytotoxic activity ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$). *Turbinaria conoides* was the most toxicity on cervical, oropharyngeal, breast and glioma cancer cell lines with an IC_{50} of 19, 18, 22 and 25 $\mu\text{g/ml}$ respectively. For the total crude extract of 2 red seaweeds, there are 1 species (*Chondrophycus cartilaginous*) exhibited cytotoxic activity against cervical and breast cancer cell lines ($IC_{50} = 32$ and $34 \mu\text{g/ml}$). The total crude extract of 2 green seaweeds showed dose-dependent cytotoxic activity. *Halimeda macroloba* showed the toxicity on cervical, oropharyngeal, breast and glioma cancer cell lines with an IC_{50} of 30, 32, 28 and 41 $\mu\text{g/ml}$ respectively. *Caulerpa racemosa* showed the toxicity on cervical and oropharyngeal cancer cell lines with an IC_{50} of 18 and 36 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The cytotoxic activities of these crude extracts were associated with round cells, lost of cell-to-cell contact and fewer adherent cells when compared with cuboid and polygonal in normal shape. In addition, it should be further investigated for other active compounds against several cancer cell lines.

Keywords : cancer cells, cytotoxic activities, crude extract, seaweeds, Gulf of Thailand

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ผลิต chemotherapeutic agents ที่มีประสิทธิภาพสูง ยารักษาโรคมะเร็งที่ผ่านการคัดกรองจากสถาบัน Food and Drug Administration (FDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1960 นั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากกว่า 50% และตั้งแต่ปี 1996-2000 มีผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับ cytotoxic bioassay มากกว่า 400 ชนิดที่สกัดได้จากทะเล ดังนั้นแนวโน้มการวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติจึงมุ่งไปสู่สิ่งที่มีกำเนิดอยู่ในทะเล (Kim & Park, 2002) มีคำกล่าวว่ามีมหาสมุทรเป็นแหล่งให้กำเนิดชีวิต «mother of origin of life» พื้นที่ในโลกเป็นส่วนที่เป็นมหาสมุทรถึง 70% แหล่งทรัพยากรทางทะเลที่เกี่ยวข้องกับ biomedical compounds ได้แก่ sponges (37%), coelenterates (21%), microorganisms (18%), algae (9%), echinoderms (6%), tunicates (6%), molluscs (2%), bryozoans (1%) นักวิจัยทั่วโลกจึงมุ่งเน้นที่จะค้นคว้าหาชนิดใหม่สำหรับรักษาโรคร้ายแรงในมนุษย์เช่นโรคมะเร็ง เป็นต้น (Jha & Rong, 2004)

สารสกัดหยาบ fucooidan จากสาหร่ายสีน้ำตาลในประเทศเกาหลี สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยมีสารสำคัญคือ sulfated fucooidan ในปริมาณมากกว่า desulfated fucooidan ซึ่งสารดังกล่าวไปจับกับ DNA ทำให้ไม่สามารถเกิด DNA replication เซลล์จึงไม่สามารถแบ่งตัวได้ การศึกษานี้ได้ให้ข้อเสนอแนะในการนำมาเป็นยาด้านมะเร็งต่อไป (Park et al., 2002) สาร sulfated polysaccharides (fucooidan) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ผ่านทางเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-7 (Aisa et al., 2005; Teruya et al., 2007) และการเพิ่มปริมาณ sulfate ใน fucooidan มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง และ ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (Koyanagi et al., 2003) อย่างไรก็ตามสาร fucooidan จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cladosiphon okamuranus* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (U937) (Teruya et al., 2007) ซึ่งสอดคล้องกับสาร fucooidan จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus evanescens* ไม่สามารถกระตุ้น apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองทั้งชนิด T cells และ B cells ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่สูงถึง 500 µg/ml แต่เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็ง etoposide พบการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น 2 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ etoposide เพียงอย่างเดียว (Philchenkov et al., 2007)

สาหร่ายสีแดง *Porcheria hornaminyahae* ได้รับการทดสอบในปี 1980 โดยสถาบัน National Cancer Institute (NCI) พบว่าประกอบด้วยสารเคมีที่ฆ่าเซลล์มะเร็งได้ สาหร่ายสีแดง *Callophyucus serratus* พบในแนวชายฝั่งปะการังน้ำตื้นทางแปซิฟิกตอนใต้ ทำการศึกษาโดยสถาบัน Georgia Technology Institute (University of South Pacific) สกัดแยกได้สาร bromophycolide A ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้น programmed cell death และขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นพัฒนาเป็นยามาใหม่ (Kubanek, 2005) ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Portieria hornemannii* ได้รับการคัดกรองจากสถาบัน NCI เนื่องจากมีความเป็นพิษสูงต่อ เซลล์มะเร็งสมอง ไต ลำไส้ใหญ่ ขณะนี้กำลังศึกษาขั้นต่อไปในสัตว์ทดลอง (Carte, 1996)

การวิจัยและฟื้นฟูการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายทะเลจึงมีความจำเป็นสำหรับการพึ่งตนเองในระยะยาว ในโรคที่เป็นปัญหาด้านสุขภาพของประชาชนชาวไทย เป็นการนำทรัพยากรทางทะเลมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาประเทศ จากการวิจัยเบื้องต้นที่คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่าสาหร่ายทะเลในแถบภาคตะวันออกเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่น่าสนใจ และมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็งแต่ยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายชนิดต่างๆ ในทะเลแถบภาคตะวันออก เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการพัฒนาศักยภาพของทรัพยากรทางทะเลเพื่อประโยชน์ด้านการรักษาโรคมะเร็ง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

Dimethyl sulfoxide (DMSO) และ [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) จากบริษัท Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); อาหารและวัสดุเลี้ยงเซลล์จากบริษัท Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA) และ InVitromex (Grevenbroich, Germany)

การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเล

เก็บตัวอย่างบริเวณจังหวัดชลบุรี และระยอง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนเมษายน 2551 โดยใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA diving) บริเวณที่เก็บตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงแนวปะการัง พร้อมทั้งบันทึกภาพ แบ่งตัวอย่างออกเป็น

2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใส่ถุงพลาสติกรักษาสภาพตัวอย่างด้วยการ
แช่น้ำแข็งนำมาย้งห้องปฏิบัติการเคมีเพื่อใช้ในการสกัดสารหยาบ
ส่วนที่ 2 ทำตัวอย่างแห้ง (herbarium specimens) เพื่อนำไป
จำแนกชนิดภายในห้องปฏิบัติการต่อไป

การศึกษาภายในห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดสาหร่าย
ทะเล โดยการศึกษาจากโครงสร้างภายนอก พร้อมทั้งบันทึกภาพ
รายละเอียด และศึกษาโครงสร้างภายใน โดยนำตัวอย่างที่แห้ง
มาตัดเป็นชิ้นบางๆ โดยใช้ใบมีดตัดได้กล้องจุลทรรศน์ ย้อมสีด้วย
1 เปอร์เซ็นต์ aniline blue ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ 50 เปอร์เซ็นต์
Karo syrup ศึกษาเนื้อเยื่อสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อ
นำมาวิเคราะห์หาชื่อทางวิทยาศาสตร์ (Ajisaka, 2002)

การสกัดสารตัวอย่าง

ตัวอย่างสดสกัดด้วยเมทานอลแล้วทำการแยกชั้น
(partition) ต่อด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและ
เอทิลอะซิเตต (อัตราส่วน 1:1) ระเหยตัวทำละลายออกจนได้
สารสกัดหยาบ (crude extracts) ละลายสารสกัดที่ความเข้มข้น
10 mg/ml ด้วย DMSO จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วย
membrane nylon filter ขนาด 0.2 μm แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ
-4°C

การเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่ง
ชาติ มี 4 ชนิดได้แก่ มะเร็งช่องปาก (human oropharyngeal
carcinoma, KB), มะเร็งปากมดลูก (human cervical carcinoma,
HeLa), มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma, MCF-
7), มะเร็งสมอง (rat glioma cancer, ASK) การเลี้ยงเซลล์ ทำการ
เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^5 cells/ml ด้วย RPMI 1640
ใน culture flask ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ โดยใช้เวลา
ประมาณ 2-3 วัน จนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10^6 cells/ml
ตรวจดูเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่เกาะพื้นผิวผ่านทางกล้อง stereoscope

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบ

เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 5×10^4 cells/ml ใน
96 well plate แล้วบ่มเซลล์ด้วยตัวทำละลาย DMSO (0.21%)
นาน 24 ชม. และสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0-500 $\mu\text{g/ml}$ นาน
48 ชม. ส่วน positive control นั้นทำการทดสอบด้วยยา
Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0-10 $\mu\text{g/ml}$ นาน 48 ชม. แล้ว
วิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT โดยนำสารละลาย MTT
(5 g/L) ปริมาตร 30 μl ใส่ลงใน well ที่ต้องการทดสอบ จากนั้น
บ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 3 ชม. แล้วละลายผลึก
formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 100 μl วัดค่าการดูดกลืนแสง

ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm
จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (% cell
viability) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Absorbance at 570 nm of sample}}{\text{Absorbance at 570 nm of control}} \times 100$$

สร้างกราฟระหว่าง % cell viability (แกน y) กับความ
เข้มข้นของสารสกัดหยาบ (แกน x) จากกราฟนี้สามารถคำนวณ
หา ขนาดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการ
เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% (Inhibitory concentration
at 50%, IC₅₀)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลอง 4 ครั้ง เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม
Microcal™ Origin 6 แสดงผลเป็นค่า mean \pm standard error
of mean (S.E.M)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการเก็บตัวอย่างบริเวณจังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยอง
ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนมกราคม 2551 ได้
ตัวอย่างสาหร่ายทะเล 19 ชนิด ประกอบด้วยสาหร่ายสีน้ำตาล
15 ชนิด สาหร่ายสีแดง 2 ชนิดสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด โดย
จังหวัดชลบุรีเก็บตัวอย่างบริเวณหาดนางรอง หาดเขาหมาจอ
เกาะขาม เกาะแรด และเกาะจระเข้ อำเภอสัตหีบได้ตัวอย่าง
สาหร่ายทะเล 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสาหร่ายสีน้ำตาล 6 ชนิด
สาหร่ายสีแดง 2 ชนิด สาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด สำหรับจังหวัด
ระยองเก็บตัวอย่างบริเวณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเล
อ่าวไทยฝั่งตะวันออก อำเภอกุฉินารายณ์ และเกาะมันใน อำเภอกองกระ
ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด (ตารางที่ 1)

ในน่านน้ำไทย สาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสาหร่ายกลุ่มที่พบ
มากที่สุดมีการแพร่กระจายสูงเกือบทุกพื้นที่ เช่นสกุล *Padina* และ
Sargassum เนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น จึงพบ
ทั่วไปในปริมาณสูง จากการสำรวจชายฝั่งทะเลอ่าวไทยพบ
สาหร่ายสีน้ำตาลที่ถูกบันทึกไว้ล่าสุดคือ *Sargassum oligocystum*
Montagne (Noiraksa *et al.*, 2006) การที่สาหร่ายมีสีน้ำตาล
เนื่องจากมีปริมาณของ carotenoid ชนิด fucoxanthin มาก
กว่ารงควัตถุสีอื่นๆ สาหร่ายสีแดงส่วนใหญ่ขึ้นอยู่ในทะเล พบ
กระจายอยู่ได้ทั่วโลก สามารถขึ้นในที่ลึกได้ดีกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น
มีรงควัตถุคือ phycobilin มีทาลัสเป็นพุ่มสีแดงเข้ม ส่วนล่าง
เป็นรากยึดเกาะ ขึ้นบนก้อนหินหรือซากปะการัง บริเวณชายฝั่ง
ที่น้ำท่วมถึง สาหร่ายสีเขียวเป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายพืชชั้นสูง

มีทั้งคลอโรฟิลล์ เอ และมีเช่นเดียวกับพืชบก สาหร่ายทะเลที่เป็นสาหร่ายสีเขียวพบน้อยมากเพียง 10% อีก 90% เป็นสาหร่ายน้ำจืด พวกที่เป็นสาหร่ายทะเลขึ้นอยู่ได้ตั้งแต่ชายฝั่งที่น้ำท่วมถึงไปจนถึงระดับน้ำลงต่ำสุด เมื่อน้ำลงจะโผล่ให้เห็นเป็นสีเขียวตามริมทะเล หรืออาจฝังส่วนล่างอยู่ในพื้นทราย โผล่

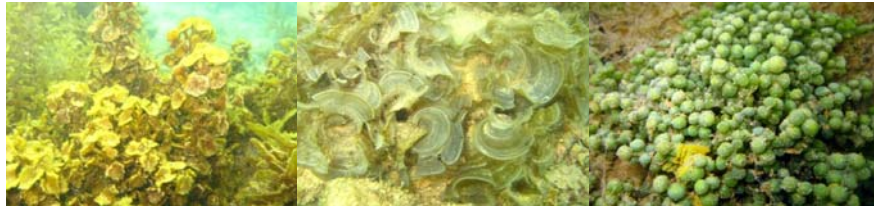
เฉพาะส่วนบนขึ้นมาเหนือพื้นดิน มีรากเกาะบนหิน ซากปะการัง และเปลือกหอย (กาญจนภานัน, 2550) ตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่พบในทะเลจังหวัดชลบุรี และระยอง แสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสาหร่ายทะเล ในจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง

ตัวอย่าง			จังหวัด	วันที่เก็บ
ชนิด	รหัส	สาหร่ายทะเล		
1. <i>Sargassum oligocystum</i> Montagne	AC-01	สีน้ำตาล	ชลบุรี	25/11/2550
2. <i>Sargassum swartzii</i> (Turner) C. Agardh	AC-02	สีน้ำตาล	ชลบุรี	25/11/2550
3. <i>Sargassum binderi</i> Sonder	AC-03	สีน้ำตาล	ชลบุรี	25/11/2550
4. <i>Turbinaria conoides</i> (J. Agardh) Kützing	AC-04	สีน้ำตาล	ชลบุรี	5/12//2550
5. <i>Padina australis</i> Hauck	AC-05	สีน้ำตาล	ชลบุรี	5/12/2550
6. <i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>macrophysa</i> (Sonder ex Kützing) Taylor	AC-06	สีเขียว	ชลบุรี	5/12/2550
7. <i>Gracilaria salicornia</i> (C. Agardh) Dawson	AC-07	สีแดง	ชลบุรี	5/12/2550
8. <i>Halimeda macroloba</i> Decaisne	AC-08	สีเขียว	ชลบุรี	5/12/2550
9. <i>Padina santae-crucis</i> Borgesen	AC-09	สีน้ำตาล	ระยอง	5/12/2550
10. <i>Padina australis</i> Hauck	AC-10	สีน้ำตาล	ระยอง	24/12/2550
11. <i>Sargassum baccularia</i> (Mertens) C. Agardh	AC-11	สีน้ำตาล	ระยอง	24/12/2550
12. <i>Lobophora variegata</i> (Lamouroux) Womersley ex Oliveira	AC-12	สีน้ำตาล	ระยอง	24/12/2550
13. <i>Sargassum oligocystum</i> Montagne	AC-13	สีน้ำตาล	ระยอง	24/12/2550
14. <i>Sargassum binderi</i> Sonder	AC-14	สีน้ำตาล	ระยอง	24/12/2550
15. <i>Padina antillarum</i> (Kützing) Piccone	AC-15	สีน้ำตาล	ระยอง	26/12/2550
16. <i>Sargassum polycystum</i> C. Agardh	AC-16	สีน้ำตาล	ระยอง	26/12/2550
17. <i>Colpomenia sinuosa</i> (Mertens ex Roth) Derbés et Solier	AC-17	สีน้ำตาล	ระยอง	26/12/2550
18. <i>Chondrophyucus cartilagineus</i> (Yamada) Garbary et Harper	AC-19	สีแดง	ชลบุรี	14/1/2551
19. <i>Sargassum polycystum</i> C. Agardh	AC-20	สีน้ำตาล	ชลบุรี	14/1/2551



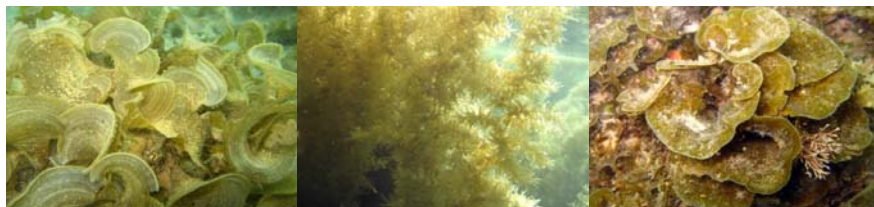
Sargassum oligocystum (AC-01) *Sargassum swartzii* (AC-02) *Sargassum binderi* (AC-03)



Turbinaria conoides (AC-04) *Padina australis* (AC-05) *Caulerpa racemosa* (AC-06)



Gracilaria salicornia (AC-07) *Halimeda macroloba* (AC-08) *Padina santae-crucis* (AC-09)



Padina australis (AC-10) *Sargassum baccularia* (AC-11) *Lobophora variegata* (AC-12)



Sargassum oligocystum (AC-13) *Sargassum binderi* (AC-14) *Padina antillarum* (AC-15)



Sargassum polycystum (AC-16) *Colpomenia sinuosa* (AC-17) *Chondrophycus cartilagineus* (AC-18)



Sargassum polycystum (AC-19)

ภาพที่ 1 ตัวอย่างสาหร่ายทะเลในจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง

เมื่อผสมสารสกัดหยาบครบ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ในกลุ่ม negative control ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ มีลักษณะเซลล์เหยียดยาวเป็นรูปกระสวย มีจำนวนเซลล์ที่เกาะพื้นมากกว่า 95% เป็นลักษณะการเกาะที่แน่นมาก เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลาย (DMSO: 0.21%) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็ง ต่างจากกลุ่มที่ได้รับ Doxorubicin (positive control) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบ ซึ่งพบข้อดีพลสมขรุขระ เซลล์มีลักษณะกลมแทนที่จะเป็นรูปกระสวย จำนวนเซลล์ที่เกาะพื้นผิวลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เป็นลักษณะการเกาะที่ไม่แน่น สามารถหลุดจากพื้นผิวได้ง่ายเมื่อเขย่า และเมื่อวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ โดยกลุ่มที่ได้รับ Doxorubicin มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.5-3 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดคือ HeLa, KB, MCF-7 และ ASK กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล (15 ชนิด) สาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Turbinaria conoides* มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 18-25 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีแดง (2 ชนิด) พบว่า *Chondrophycus cartilaginous* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 32 และ 34 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ HeLa และ MCF-7 ส่วนสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียว (2 ชนิด) คือ *Halimeda macroloba* มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 28-41 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ส่วน *Caulerpa racemosa* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18 และ 36 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ HeLa และ KB ดังรายละเอียดต่อไปนี้

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล

สาหร่ายสีน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมี 4 ชนิดอยู่ในวงศ์ Sargassaceae ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก *Sargassum oligocystum* Montagne (AC-01) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 24-30 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ HeLa, KB และ MCF-7 สารสกัดหยาบจาก *Sargassum swartzii* (Turner) C. Agardh (AC-02) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 17-38 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ HeLa และ KB สารสกัดหยาบจาก *Sargassum binderi* Sonder (AC-03) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 35-37 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ HeLa และ KB ส่วนสารสกัดหยาบจาก *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützing (AC-04) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 18-25 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดคือ HeLa, KB, MCF-7 และ ASK โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นเป็นสัดส่วนตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (dose-

dependent cytotoxicity) เมื่อเปรียบเทียบสาหร่ายชนิดเดียวกัน แต่คนละจังหวัด ตัวอย่างเช่น AC-01 กับ AC-13, AC-03 กับ AC-14 และ AC-16 กับ AC-20 พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาลที่เก็บจากจังหวัดชลบุรีมีประสิทธิภาพดีกว่าจังหวัดระยอง ยกเว้น AC-20 ต่อเซลล์ KB ซึ่งสาหร่ายสีน้ำตาลที่เก็บจากจังหวัดระยองมีประสิทธิภาพดีกว่าจังหวัดชลบุรีรายละเอียดแสดงในตาราง 2

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีสาหร่ายชนิดเดียวกัน แต่เก็บมาจากจังหวัดที่แตกต่างกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้น อาจเป็นสารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในธรรมชาติระหว่างกระบวนการเติบโต ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เฉพาะ สาหร่ายชนิดเดียวกันที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมต่างกัน จึงมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันได้ (Patterson *et al.*, 1984) ดังนั้นสถานที่และฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง

รงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำตาล คือ carotenoid ชนิด fucoxanthin และ sulfated fucan (fucoidan) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสาร fucoxanthin ยังสามารถหยุดการแบ่งตัวในระยะ G1 ของ cell cycle ในเซลล์ HepG2 และ DU145 จึงทำให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (Yoshiko, 2007) โดยทั่วไปเมื่อเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นจำเป็นต้องมีการสร้างหลอดเลือดเพื่อนำอาหารไปเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นถ้ามีการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดได้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง ซึ่งสาร fucoxanthin และ fucoxanthinol จากสาหร่ายสีน้ำตาลมีคุณสมบัติยับยั้งการแบ่งตัวของ endothelial cells ในการสร้างหลอดเลือด จึงน่าจะมีส่วนช่วยในการป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Tatsuya *et al.*, 2006)

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีแดง

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีแดงที่อยู่ในวงศ์ Rhodome-laceae คือ *Chondrophycus cartilagineus* (Yamada) Garbary et Harper (AC-19) มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC_{50} = 32 และ 34 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์ HeLa และ MCF-7 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพลดลงในเซลล์ KB และ ASK โดยมีค่า IC_{50} = 59 และ 90 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายสีแดง *Gracilaria salicornia* (C. Agardh) Dawson (AC-07) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 100-118 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดคือ HeLa, KB, MCF-7 และ ASK ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสาหร่ายสีแดง *Chondrophycus cartilagineus* ดังรายละเอียดแสดงในตาราง 3

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (IC₅₀ ± S.E.M) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล 15 ชนิด และ Doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด (n = 4)

ชนิด	รหัส	จังหวัด	IC ₅₀ (µg/ml)			
			HeLa	KB	MCF-7	ASK
<i>Doxorubicin (Positive control)</i>	-	-	2.12±0.08	0.5±0.01	0.5±0.02	3±0.08
<i>Sargassum oligocystum</i> Montagne	AC-01	ชลบุรี	24±0.9	30±1.3	26±1.2	64±4.81
<i>Sargassum oligocystum</i> Montagne	AC-13	ระยอง	119±4.81	87±5.92	120±4.41	405±14.8
<i>Sargassum binderi</i> Sonder	AC-03	ชลบุรี	35±2.38	37±3.17	>300	91±4.98
<i>Sargassum binderi</i> Sonder	AC-14	ระยอง	313±15.9	199±13.2	337±16.2	>500
<i>Sargassum polycystum</i> C. Agardh	AC-16	ชลบุรี	71±3.56	199±9.12	105±8.34	465±17.3
<i>Sargassum polycystum</i> C. Agardh	AC-20	ระยอง	130±5.38	52±1.29	119±4.21	278±9.12
<i>Sargassum swartzii</i> (Turner) C. Agardh	AC-02	ชลบุรี	17±0.98	38±1.21	80±3.92	80±4.17
<i>Turbinaria conoides</i> (J. Agardh) Kützinger	AC-04	ชลบุรี	18±0.65	19±1.65	22±1.38	25±1.27
<i>Sargassum baccularia</i> (Mertens) C. Agardh	AC-11	ระยอง	117±7.39	84±3.16	137±3.18	>500
<i>Lobophora variegata</i> (Lamouroux) Womersley ex Oliveira	AC-12	ระยอง	126±6.17	107±4.95	107±5.84	437±11.3
<i>Padina australis</i> Hauck	AC-05	ชลบุรี	136±7.29	>300	>300	>300
<i>Padina australis</i> Hauck	AC-10	ระยอง	326±14.2	313±9.34	350±8.76	>500
<i>Padina santae-crucis</i> Børgesen	AC-09	ระยอง	252±7.26	200±3.78	245±5.18	>500
<i>Padina antillarum</i> (Kützinger) Piccone	AC-15	ระยอง	240±5.24	165±3.43	296±6.21	>500
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Mertens ex Roth) Derbés et Solier	AC-17	ระยอง	179±4.92	190±6.13	374±3.95	>500

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (IC₅₀ ± S.E.M) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีแดง (n = 4)

ชนิด	รหัส	จังหวัด	IC ₅₀ (µg/ml)			
			HeLa	KB	MCF-7	ASK
<i>Gracilaria salicornia</i> (C. Agardh) Dawson	AC-07	ชลบุรี	115±1.9	118±3.35	100±1.4	113±2.31
<i>Chondrophycus cartilagineus</i> (Yamada) Garbary et Harper	AC-19	ชลบุรี	32±1.99	59±3.24	34±1.74	90±4.11

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบสารสำคัญในสาหร่ายสีแดงคือ carageenan เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งมักรวมกับสารประกอบพวกโปรตีนหรือลิปิด มีบทบาทหน้าที่ต่างๆ ทางชีวภาพ เช่น เป็นแหล่งพลังงาน เป็นองค์ประกอบโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต ควบคุมปฏิกิริยาทางด้านภูมิคุ้มกัน จึงมีความสำคัญทางชีววิทยาและสรีรวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ฯลฯ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้สารประกอบกลุ่มโพลีแซคคาไรด์เพื่อการค้นหาหรือพัฒนาาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ผลข้างเคียงต่ำ เช่น ยารักษาเอดส์ มะเร็ง เป็นต้น (Chang, 2002) สาหร่ายสีแดง *Callophycus serratus* พบในแนวชายฝั่งปะการังน้ำตื้นทางแปซิฟิกตอนใต้ ทำการศึกษาโดยสกัดแยกได้สาร bromophycolide A ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้น programmed cell death และขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นพัฒนาเป็นยาฆ่ามะเร็งชนิดใหม่ (Kubaneck, 2005)

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียว

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในวงศ์ Halimedaceae คือ *Halimeda macroloba* Decaisne (AC-08) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า $IC_{50} = 30, 32, 28$ และ $41 \mu\text{g/ml}$ ในเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดคือ HeLa, KB, MCF-7 และ ASK ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในวงศ์ Caulerpaceae คือ *Caulerpa racemosa* var. *macrophysa* (Sonder ex Kützinger) Taylor (AC-06) มีค่า $IC_{50} = 18$ และ $36 \mu\text{g/ml}$ ในเซลล์ HeLa และ KB ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพลดลงเล็กน้อยในเซลล์ ASK และ MCF-7 โดยมีค่า $IC_{50} = 50$ และ $60 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังรายละเอียดแสดงในตาราง 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ($IC_{50} \pm S.E.M$) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียว ($n = 4$)

ชนิด	รหัส	จังหวัด	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
			HeLa	KB	MCF-7	ASK
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>macrophysa</i> (Sonder ex Kützinger) Taylor	AC-06	ชลบุรี	18 ± 0.45	36 ± 0.91	60 ± 2.32	50 ± 2.98
<i>Halimeda macroloba</i> Decaisne	AC-08	ชลบุรี	30 ± 1.84	32 ± 1.96	28 ± 0.56	41 ± 1.22

เมื่อเปรียบเทียบสาหร่ายสีเขียวกับสาหร่ายสีน้ำตาลพบว่า สาหร่ายสีเขียวมีจำนวนน้อยกว่า แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง สาหร่ายสีเขียว *Desmarrestia tabacoids* และ *Dictyota dichotoma* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว monoblastoid (U937), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว promyelocyte (HL-60), มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู mouse (CT26) (Kim et al., 2006) สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Halimeda macroloba* Decaisne และ *Caulerpa racemosa* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งสมอง (ASK) ขณะเดียวกันสาหร่ายสีแดงซึ่งมีจำนวนน้อย แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเช่นกัน

คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายทะเลประกอบด้วย vitamins, carotenes, iodine, chlorophyll, enzymes, amino acids และ fiber สำหรับแร่ธาตุต่างๆ เช่น sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, iron นั้นมีปริมาณมากกว่าพืชบกถึง 20 เท่า สารสำคัญเหล่านี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพเช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ลดไขมันสะสมในร่างกาย ป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด ลดความดันโลหิตได้ โดยเฉพาะธาตุ iodine พบมากในสาหร่ายทะเล Wakame และ Mekabu ซึ่งมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมแบบ apoptosis ในหลอดทดลอง (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) ดังนั้นในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับไอโอดีนร่วมด้วย จะทำให้การรักษา มะเร็งเต้านมมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Funahashi et al., 1999)

ในการศึกษาครั้งนี้ ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพของสาหร่ายทะเล ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ Doxorubicin แต่เนื่องจากสาหร่ายเหล่านี้มีรังควัตถุ แร่ธาตุ รวมถึงสารอาหาร จึงอาจนำสาหร่ายเหล่านี้มาพัฒนาในการแพทย์ทางเลือก ใช้ร่วมกับยารักษามะเร็งในแผนปัจจุบัน เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพของยาดังกล่าว และช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้ ยาได้ (Philchenkov *et al.*, 2007) จึงควรมีการทดลองในขั้น ต่อไป รวมถึงการทดสอบในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์ มะเร็งด้วย

สรุป

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล สีแดง และสีเขียว ที่เก็บมาจากชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี และ ระยอง มีจำนวนหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการ เจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก, มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งเต้านม และมะเร็งสมอง ในระดับหลอดทดลอง ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐาน ทางเภสัชวิทยาที่แสดงถึงทะเลเป็นแหล่งสำคัญ ที่นักวิทยาศาสตร์ จากส่วนต่างๆ ของโลกได้พยายามค้นหา และพัฒนายาหลายชนิด ที่รักษาโรคร้ายแรง เช่น มะเร็ง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2551 และขอขอบคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ได้ให้ ความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชนี ลีวมโนมนต์, ธิดารัตน์ น้อยรักษา และ ชัชวีร์ แก้วสุริยขิต. (2550) สาหร่ายบริเวณเกาะครามและ เกาะใกล้เคียง. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร: บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด.

Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., & Kizaki, M. (2005). Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *American Journal of Hematology*, 78(1), 7-14.

Ajisaka, T. (2002). *Sargassum* specimens from Singapore and Malaysia in the herbarium of the Bishop Museum. In Abbott I.A., Mc Dermid K. (eds.). *Taxonomy of Economic Seaweeds with Reference to Some Pacific Species*. (pp 77-88). California Sea Grant College System.

Carte, B.K. (1996). Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, 46, 271-86.

Chang, R.. (2002). Bioactive polysaccharides from traditional Chinese medicine herbs as anticancer adjuvants. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8(5), 559-65.

Funahashi, H., Tsukamura, K., & Takahashi, M. (1999). Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90, 922-27.

Jha, R.K., & Rong, X.Z. (2004). Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs*, 2, 123-46.

Kim, J., & Park, E.J. (2002). Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Current Medicinal Chemistry*, 2, 485-537.

Kim, K.N., Lee, K.W., Song, C.B., & Jeon, Y.J. (2006). Cytotoxic activities of green and brown seaweeds collected from Jeju island against four tumor cell lines. *Journal of Food Science and Nutrition*, 11, 17-24.

Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., & Shimeno, H. (2003). Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochemical Pharmacology*, 65, 173-79.

Kubaneck, J., Prusak, A., Snell, T., Giese, R., Hardcastle, K., Fairchild, C., Aalbersberg, W., Raventos-Suarez, C., & Hay, M. (2005). Antineoplastic diterpene-benzoate macrolides from the Fijian red algae *Callophycus serralus* [Abstract]. *Organic Letters*, 10(7), 5261-264.

Noiraksa, T., Ajisaka, T., & Kaewsuralikhit, C. (2006). Species of *Sargassum* in the east coast of the gulf of Thailand. *Science Asia*, 32(1), 99-106.

- Park, J.S., Kim, A., Kim, E.H., Suh, H.S., & Choi, W.C. (2002). Increased Anticancer Activity by the Sulfated Fucoidan from Korean Brown Seaweeds. *Journal of Korean Chemical Society*, 46(2), 151-56.
- Patterson, G.M., Norton, T.R., Furusawa, E., Kashiwagi, M., & Moore, R.E. (1984). Antineoplastic evaluation of marine algal extracts. *Botanica Marina*, 485-88.
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Imbs, T., Zvyagintseva, T., & Zaporozhets, T. (2007). Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide. *Experimental Oncology*, 3, 181-85.
- Tatsuya, S., Kiminori, M., & Reiko, A. (2007). Masaharu M & Takashi H. Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(19), 7701-6.
- Teruya, T., Konishi, T., Uechi, S., Tamaki, H., & Tako, M. (2007). Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(3), 221-6.
- Yoshiko, S., & Hoyoku, N. (2007). Fucoxanthin, a natural carotenoid, induces G1 arrest and GADD45 gene expression in human cancer cells. *In Vivo*, 21(2), 305-9.