นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง และความคงตัวของสารสกัดเอทานอลตำรับยากัปปิผสมหมาก

กริยาภา หลายรุ่งเรือง*, อรุณพร อิฐรัตน์*, **, สุมาลี ปานทอง*, **

บทคัดย่อ

บทนำ: ตำรับยาสมุนไพรชื่อกัปปิ ได้ถูกระบุในคัมภีร์มุขโรคว่ามีสรรพคุณรักษาอาการบวมในคอและมะเร็งช่องปาก ประกอบไปด้วย ข่าแดง มะขวิด เทียนดำ และกานพลู บดเป็นผง และนำไปรับประทานกับหมาก แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของตำรับยาดังกล่าว ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และกล่องเสียง (HEp-2) ของตำรับยากัปปิผสมหมาก เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนสรรพคุณรักษาโรค รวมถึงการศึกษาความคงตัวของสารสกัดตำรับยากัปปิผสมหมาก

วิธีการศึกษา: สกัดตำรับยากัปปิผสมหมากด้วยเอทานอลร้อยละ 50 ซึ่งเป็นการเลียนแบบการสกัดด้วยการดองเหล้าแบบหมอพื้นบ้าน จากนั้นนำสารสกัดไปศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและกล่องเสียง การทดสอบความคงตัวโดยนำสารสกัดไปเก็บในตู้ที่มีสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นระยะเวลา 6 เดือน หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียงด้วยวิธี Sulphorhodamine B (SRB) assay

ผลการศึกษา: จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับยากัปปิผสมหมาก มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากที่ดี และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกล่องเสียงในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} 28.85 ± 0.69 และ 34.15 ± 1.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเก็บสารสกัดในสภาวะเร่งเป็นระยะเวลา 6 เดือน แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง พบว่าฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) ตั้งแต่วันที่ 30 เป็นต้นไป โดยทำการเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น (วันที่ 0)

วิจารณ์: สรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับกัปปิผสมหมากมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากที่ดี และมะเร็งกล่องเสียงในระดับปานกลาง ซึ่งอ้างอิงค่า IC_{50} จากเกณฑ์มาตรฐานของ National Cancer Institute (NCI) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีความคงตัวสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 เดือนหลังจากนั้นฤทธิ์ต้านมะเร็งลดลง

คำสำคัญ: ความคงตัว, ตำรับยากัปปิ, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งกล่องเสียง, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

วันที่รับบทความ: 23 กรกฎาคม 2561 **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: 2 พฤศจิกายน 2561**

* สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: รองศาสตราจารย์อรุณพร อิฐรัตน์ สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์: 02-9269746 อีเมล iarunporn@yahoo.com

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุอันดับที่สองของการเสียชีวิตทั่วโลก จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่าในปี พ.ศ. 2558 มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 8.8 ล้านคน และมีจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่เป็นมะเร็งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจำนวนผู้เสียชีวิตพบได้มากกว่าการเสียชีวิตด้วยโรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) คาดการณ์ว่าในอีก 12 ปีข้างหน้า จะมีผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 21.4 ล้านคน และคาดว่าจะมีผู้เสียชีวิตราว 13 ล้านคน[1] ในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรไทย โดยพบว่าโรคมะเร็งเป็นปัญหาการเจ็บป่วย การเสียชีวิต รวมทั้งปัญหาเรื่องภาระโรคที่ทำให้ประชากรไทยสูญเสียการมีคุณภาพชีวิตที่ดี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 เป็นต้นมา[2] สถิติจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2559 พบว่าอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียงเป็นมะเร็งที่พบ 10 อันดับแรกทั้งในเพศชายและเพศหญิง โดยในเพศชายพบผู้ป่วยมะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง เป็นอันดับ 4 และ 8 ตามลำดับ สำหรับในเพศหญิงพบผู้ป่วยมะเร็งช่องปากเป็นอันดับ 10[3] ซึ่งการรักษาโรคมะเร็งทางการแพทย์แผนปัจจุบันทำได้โดยการผ่าตัด การฉายรังสี เคมีบำบัด และการรับประทานยา ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน การเลือกวิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค สภาพร่างกายของผู้ป่วย และปัจจัยที่อาจจะเกี่ยวข้องอีกมากมาย นอกจากนี้การรักษาด้วยวิธีเหล่านี้ทุกวิธีต่างมีผลข้างเคียงที่เกิดจากการรักษา เพราะการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวนอกจากจะทำลายเซลล์มะเร็งแล้วยังทำลายเซลล์ปรกติไปพร้อมกันด้วย[4] ศาสตร์การแพทย์แผนไทยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดรักษาโรค

คัมภีร์มุขโรคเป็นคัมภีร์ทางการแพทย์แผนไทยที่กล่าวถึงโรคในปากและลำคอ 19 ประการ โดยในคัมภีร์ได้กล่าวถึงตำรับยากัปปิซึ่งมีสรรพคุณในการรักษาอาการบวมในคอ[5] ตำรับยากัปปิได้ถูกใช้ในทางการแพทย์แผนไทยกันมาอย่างยาวนานเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในช่องปากและลำคอ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง และยังกล่าวถึงสมุนไพรในตำรับและวิธีการใช้โดยระบุว่า นำข่าแดง มะขวิด เทียนดำ และกานพลู บดเป็นผงรับประทานกับหมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาตำรับยากัปปิโดยรวมหมากเข้าเป็นส่วนหนึ่งในตำรับ กล่าวคือจะมีสมุนไพร 5 ชนิดอยู่ในตำรับ โดยเลือกวิธีการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งการสกัดด้วยเอทานอลเป็นวิธีการที่นิยมตามแบบฉบับของหมอพื้นบ้าน[6] ประกอบกับการใช้ในรูปแบบผงยาของตำรับตามการใช้ของแพทย์แผนไทย ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดังนั้นการเลือกสกัดด้วยเอทานอล เป็นการสกัดแบบการดองเหล้ามาศึกษาจะสามารถพัฒนาต่อยอดได้ นอกจากนี้สารสกัดตำรับยากัปปิผสมหมากยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง รวมถึงยังไม่มีการศึกษาความคงตัวของสารสกัดในสภาวะเร่ง จึงต้องทำการศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งโดยการเก็บตัวอย่างที่ทดสอบในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริง[7] ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาในรูปแบบต่างๆ และเป็นการทำนายระยะเวลาของการสิ้นอายุของยาโดยประมาณ นอกจากนี้ยังใช้ในการประเมินคุณภาพเบื้องต้นของสารสกัดเพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

คัดเลือกสมุนไพรและตรวจสอบเอกลักษณ์สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบของตำรับยากัปปิ ได้แก่ เหง้าข่าแดง เมล็ดหมากสง เปลือกมะขวิด เมล็ดเทียนดำ และดอกกานพลู โดยได้ทำการซื้อ ดอกกานพลู เหง้าข่าแดง และเมล็ดเทียนดำจากร้านขายยาสมุนไพรฮงฮวด เขตบางกอกน้อย จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมล็ดหมากสง ซื้อจากตลาดศาลาน้ำเย็น เขตบางกอกน้อย จังหวัดกรุงเทพมหานคร และเปลือกมะขวิดได้มาจาก อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานีใน พ.ศ. 2555 ในสัดส่วนที่เท่ากัน (ตารางที่ 1) จากนั้นนำสมุนไพรแต่ละชนิดมาบดหยาบ และนำมารวมกันในอัตราส่วนที่เท่ากันเป็นตำรับยากัปปิผสมหมาก

ตารางที่ 1 แสดงชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ ชื่อวงศ์ ส่วนที่ใช้ และอัตราส่วนสมุนไพรในตำรับ

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	อัตราส่วนในตำรับ (จำนวนเท่า)
Achasma sphaerocephalum Holtt.	ข่าแดง	Zingiberaceae	เหง้า	1
Areca catechu Linn.	หมากสง	Arecaceae	เมล็ด	1
Limonia acidissima Linn.	มะขวิด	Rutaceae	เปลือก	1
Nigella sativa Linn.	เทียนดำ	Ranunculaceae	เมล็ด	1
Syzygium aromaticum (Linn.) Merr. et Perry	กานพลู	Myrtaceae	ดอกตูม	1

การสกัดสมุนไพรตำรับยากัปปิ

นำสมุนไพรมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงหยาบ จากนั้นนำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เหง้าข่าแดง เมล็ดหมากสง เปลือกมะขวิด เมล็ดเทียนดำ และดอกกานพลู มารวมกันในอัตราส่วนที่เท่ากันในปริมาณรวม 750 กรัม นำสมุนไพรมาสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 หมักไว้ 3 วัน กรองและระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำกากที่ได้ไปหมักซ้ำด้วยวิธีการเดียวกันกับข้างต้น หมักซ้ำอีก 2 รอบ แล้วนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน ระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) คำนวณหาน้ำหนักร้อยละ (%yield) ซึ่งได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 16.73 และเก็บสารสกัดที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปากและกล่องเสียง

นำเซลล์มะเร็งช่องปาก [Human oral epidermoid carcinoma (KB) ATCC CCL-17], American Type Culture Collection (ATCC), USA และมะเร็งกล่องเสียง [Human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) ATCC CCL-23], American Type Culture Collection (ATCC), USA มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum essential medium (MEM), Gibco, USA ที่มีการเติม Fetal bovine serum (FBS), Gibco, USA ร้อยละ 10 และ Penicillin-Streptomycin (P/S), Biochem, Germany ร้อยละ 1 ในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองโดยวิธี Sulphorhodamine B (SRB)[8]

นำสารสกัดทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง ขั้นตอนแรกทำการถ่ายเซลล์ลงใน 96-well microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์ KB และ HEp-2 เท่ากับ 1,500 และ 2,000 เซลล์/หลุม ตามลำดับ (ค่านี้ได้จากการหาอัตราการเจริญเติบโตของ cell ใน 96-well microtiter plate) ปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตติดกับหลุมเป็น monolayer โดยบ่มในตู้ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดในความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายด้วยร้อยละ 100 Dimethyl sulfoxide, [$(CH_3)_2SO$] (DMSO), RCL Labscan, Thailand และทำการเจือจางด้วย culture media ในความเข้มข้นระดับต่างๆ โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 50, 10 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่มากที่สุด 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของ DMSO อยู่ที่ร้อยละ 1 เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง) โดยเติมสารสกัดหลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำ 4 หลุม นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ดูด culture media ออก แล้วล้างเซลล์ที่เป็น monolayer ด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS), Amresco, USA หลุมละ 200 ไมโครลิตร ดูด PBS ออก 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม culture media หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อดูการรอดของเซลล์มะเร็งเมื่อเทียบกับ non-treated control และ solvent control (ใน 1 หลุมของ solvent control จะเติม culture media 100 ไมโครลิตร และร้อยละ 2 DMSO 100 ไมโครลิตร โดยจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับร้อยละ 1) นำมาทดสอบอัตราการรอดของเซลล์ด้วยวิธี Sulphorhodamine B (SRB) โดยการตรึงเซลล์ที่มีชีวิตด้วย Trichloroacetic acid, [$Cl_3C_2O_2H$] (TCA), Merck, Germany ร้อยละ 40 ที่เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ ทำการย้อมเซลล์ด้วยสารละลายสี Sulforhodamine B sodium salt [$C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$] (SRB), Sigma-Aldrich, USA ร้อยละ

0.4 ในกรดอะซิติกร้อยละ 1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง ล้างสี SRB ด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 1 และตั้งทิ้งไว้จนแห้งจากนั้นละลายสี SRB ด้วยสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ของ Tris (hydroxymethyl) aminomethane, [$NH_2C(CH_2OH)_3$], Sigma-Aldrich, USA พีเอช 10 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่อง Microplate reader, Biotek, USA ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาคำนวณค่าทางสถิติและหาค่า IC_{50} จาก dose response curve ซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity)

การทดสอบสภาพความคงตัวในสภาวะเร่ง[9]

ทำการเก็บสารสกัดขนาด 100 มิลลิกรัม ในขวดแก้วที่ปิดฝามิดชิด และพันพาราฟิล์ม โดยเก็บตัวอย่างละ 3 ขวด (n=3) ไว้ในตู้ที่มีสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นระยะเวลา 180 วัน โดยเก็บสารสกัดวันที่ 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ เก็บสารสกัดที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บสารสกัดจนครบ 180 วัน จึงนำสารสกัดทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และการทดสอบความคงตัวของสารสกัดตำรับยากัปปิผสมหมาก จะแสดงผลด้วยค่า IC_{50} หมายถึงค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถเป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) เพื่อยืนยันผล นำค่าที่ได้มาคิดค่าเฉลี่ยและหาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error of measurement; SEM) โดยจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย IC_{50} ± SEM ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7.04 for windows สำหรับความแตกต่างของการทดสอบความคงตัว ต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) ในแต่ละวันวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA (p-value < 0.05) และความคงตัวของสารสกัดวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunnett เพื่อเทียบความแตกต่างในแต่ละวันที่เก็บกับระยะเวลา 0 วัน (p-value < 0.05) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7.04 for windows

ผลการศึกษา

จากการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) ของสารสกัดชั้นร้อยละ 50 เอทานอลของตำรับยากัปปิผสมหมาก พบว่ามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่ดีโดยมีค่า IC_{50} 28.85 ± 0.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกล่องเสียงในระดับปานกลางโดยมีค่า IC_{50} 34.15 ± 1.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามข้อกำหนดของ The National Cancer Institute (NCI) ประเทศสหรัฐอเมริกากล่าวว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ดีต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดที่ออกฤทธิ์ปานกลางต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[10] ดังแสดงผลในตารางที่ 2 และเมื่อทำการเก็บสารสกัดในสภาวะเร่ง ที่มีอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นระยะเวลา 180 วัน โดยเก็บสารสกัดวันที่ 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ ตามข้อกำหนดของ ICH (International Conference on Harmonisation)[9] แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) โดยทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) จากค่า IC_{50} ของช่วงเวลาการเก็บแต่ละช่วง (0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน) เปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น (วันที่ 0) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) ตั้งแต่วันที่ 30 เป็นต้นไป ดังแสดงผลในตารางที่ 3, ตารางที่ 4 และรูปที่ 1 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงค่าร้อยละความเข้มข้น (%inhibition) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) [IC_{50} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร] ของสารสกัดเอทานอลตำรับยากัปปิผสมหมาก (n = 3)

เซลล์	ร้อยละความเข้มข้น (%inhibition ± SEM) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร				IC_{50} ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Mean ± SEM)
	100	50	10	1	
KB	98.72 ± 0.13	83.80 ± 2.70	27.51 ± 1.66	25.30 ± 2.34	28.85 ± 0.69
HEp-2	97.31 ± 1.14	68.17 ± 0.27	21.66 ± 2.00	14.13 ± 1.23	34.15 ± 1.45

ตารางที่ 3 แสดงค่าการทดสอบความคงตัวร้อยละความเข้มข้น (%inhibition) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) [IC_{50} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร] ของสารสกัดเอทานอลตำรับยากัปปิผสมหมาก (n = 3)

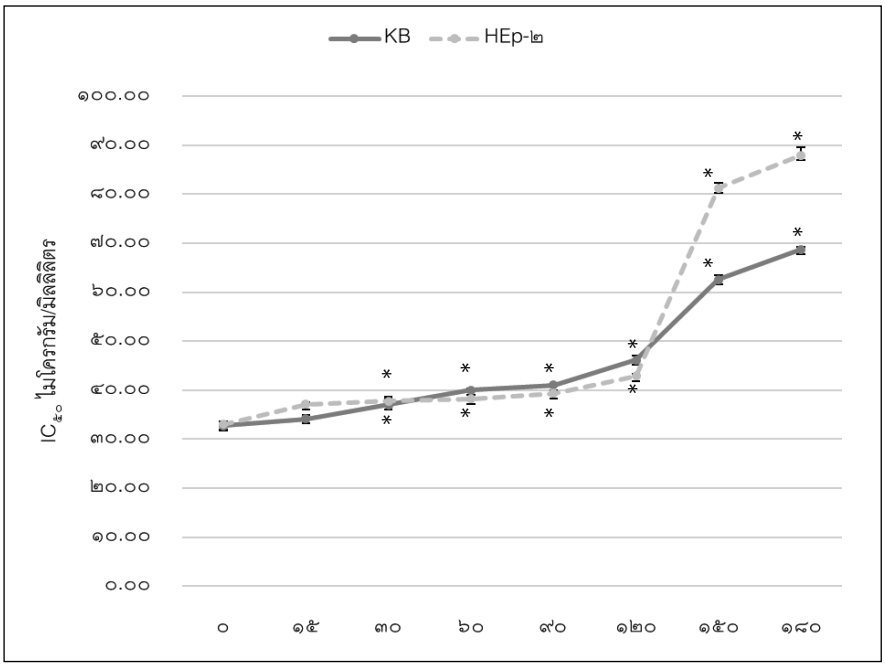
ระยะเวลา (วัน)	ร้อยละความเข้มข้น (%inhibition ± SEM) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร				IC_{50} ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Mean ± SEM)
	100	50	10	1	
0	96.97 ± 0.77	80.06 ± 1.62	13.27 ± 2.31	6.56 ± 3.07	32.75 ± 0.83
15	94.82 ± 2.30	77.68 ± 4.78	14.21 ± 3.68	11.16 ± 2.31	34.19 ± 0.74
30	97.21 ± 0.41	72.63 ± 2.87	7.52 ± 1.53	3.18 ± 0.53	37.08 ± 1.30*
60	94.08 ± 0.92	63.36 ± 1.25	12.08 ± 1.27	6.68 ± 1.53	39.98 ± 0.40*
90	94.53 ± 1.23	60.22 ± 1.39	17.98 ± 3.16	13.91 ± 2.36	41.04 ± 0.34*
120	91.00 ± 2.53	55.14 ± 1.83	7.85 ± 2.52	5.21 ± 2.24	46.18 ± 0.98*
150	80.02 ± 1.88	43.08 ± 1.14	25.11 ± 1.71	16.55 ± 2.78	62.60 ± 0.92*
180	80.47 ± 1.71	36.62 ± 0.62	19.47 ± 1.55	13.77 ± 1.83	68.76 ± 0.48*

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*p*-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 0 วัน

ตารางที่ 4 แสดงค่าการทดสอบความคงตัวร้อยละความเข้มข้น (%inhibition) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) [IC_{50} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร] ของสารสกัดเอทานอลตำรับยากัปปิผสมหมาก (n = 3)

ระยะเวลา (วัน)	ร้อยละความเข้มข้น (%inhibition ± SEM) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร				IC_{50} ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Mean ± SEM)
	100	50	10	1	
0	90.76 ± 0.63	66.16 ± 1.33	23.38 ± 0.20	12.78 ± 2.49	33.04 ± 0.52
15	92.64 ± 1.61	63.93 ± 0.76	20.74 ± 0.72	14.12 ± 1.17	37.11 ± 0.53
30	92.75 ± 1.43	64.81 ± 1.28	19.01 ± 1.73	14.34 ± 2.60	37.77 ± 0.94*
60	89.25 ± 0.77	64.42 ± 2.15	18.19 ± 1.54	14.02 ± 1.05	38.25 ± 1.56*
90	88.48 ± 0.65	63.83 ± 0.87	15.65 ± 0.78	12.67 ± 1.56	39.38 ± 0.28*
120	84.21 ± 1.12	60.17 ± 1.15	7.86 ± 0.60	6.86 ± 0.97	42.91 ± 0.49*
150	73.40 ± 1.54	23.68 ± 0.72	14.74 ± 0.83	8.25 ± 1.27	81.28 ± 1.13*
180	64.51 ± 2.04	17.56 ± 2.51	10.31 ± 2.31	4.54 ± 1.34	87.92 ± 1.68*

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*p*-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 0 วัน



* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 0 วัน

รูปที่ 1 แสดงค่าการทดสอบความคงตัวต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) [IC_{50} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร] ของสารสกัดเอทานอลตำรับยากัปปิผสมหมาก (n = 3)

วิจารณ์

จากการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) ในหลอดทดลองโดยวิธี SRB พบว่าสารสกัดชั้นร้อยละ 50 เอทานอลของตำรับยากัปปิผสมหมาก มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่ดีโดยมีค่า IC_{50} 28.85 ± 0.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกล่องเสียงในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} 34.15 ± 1.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอ้างอิงจากเกณฑ์มาตรฐานของ National Cancer Institute (NCI) ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งกล่าวได้ว่าการศึกษานี้เป็นการรายงานฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) ของสารสกัดของตำรับยากัปปิผสมหมากที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 เป็นครั้งแรก แต่พบว่าสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยากัปปิผสมหมาก มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยงานวิจัยของ Mahavorasirikul และคณะ[11] ที่พบว่าสารสกัดชั้นร้อยละ 50 เอทานอลของกานพลูและเทียนดำ มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งกล่องเสียงชนิด HEp-2 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 34.30 ± 21.33 และ 43.68 ± 0.49 ตามลำดับ และยังพบอีกว่างานวิจัยของ Salomi และคณะ[12] ที่พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลของเทียนดำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 60 นอกจากนี้งานวิจัยของ Farah และ Begum[13] พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลและสารสกัดชั้นน้ำของเทียนดำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และงานวิจัยของ Yazan และคณะ[14] ที่ศึกษาวิธี MTT พบว่าสาร Thymoquinone ในเทียนดำมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.80 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของมะขวิดมีงานวิจัยของ Pradhan และคณะ[15] พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลของผลมะขวิด มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR3 และ MDA-MB435 โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 56.10 ± 3.80 และ 30.60 ± 1.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Sari และคณะ[16] พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลร้อยละ 96 ของหมากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติชนิด HaCat

สารสกัดตำรับยากัปปิผสมหมากมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่ดี และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกล่องเสียงในระดับปานกลาง การศึกษาครั้งนี้จึง

นำสารสกัดตำรับยากับปิผสมหมากมาทำการศึกษาความคงตัว ซึ่งกล่าวได้ว่างานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาความคงตัว ต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) ของตำรับยากับปิผสมหมาก จากการศึกษาพบว่าหลังจากเก็บสารสกัดในสภาวะเร่ง ที่มีอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นระยะเวลา 180 วัน โดยเก็บสารสกัดในวันที่ 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ และนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองโดยวิธี SRB พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) จากค่า IC_{50} ของช่วงเวลาการเก็บแต่ละช่วง (0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน) เปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น (วันที่ 0) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 30 เป็นต้นไป โดยพบว่าในวันที่ 180 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) มีค่าเปลี่ยนแปลงจากวันเริ่มต้น (วันที่ 0) มากที่สุด โดยแสดงค่า IC_{50} 68.76 ± 0.48 และ 87.92 ± 1.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดชั้นเอทานอลร้อยละ 50 ของตำรับกับปิผสมหมากมีความคงตัวภายใต้สภาวะเร่งตั้งแต่วันที่ 0 ถึง 15 วัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่ถึง 2 ปี หรืออีกนัยหนึ่งคือสารสกัดมีความคงตัวประมาณ 2 เดือน หลังจากนั้นฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองเปลี่ยนไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดตำรับนี้มีน้ำมันหอมระเหยคือ กานพลู ซึ่งสามารถระเหยได้ในความร้อน จึงทำให้ฤทธิ์ความเป็นพิษลดลง มีรายงานว่าสารที่มีปริมาณสูงในกานพลู คือ Eugenol มีรายงานหลายฉบับพบว่า Eugenol มีฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่างๆ และมะเร็งโพรงจมูก[17] ดังนั้นจึงควรศึกษาต่อไปว่าสารชนิดใดในสารสกัดตำรับมีพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้

จากงานวิจัยสรุปได้ว่าสารสกัดตำรับยากับปิผสมหมาก ซึ่งเลียนแบบการสกัดแบบหมอพื้นบ้านคือการดองเหล้า มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่ดี และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกล่องเสียงในระดับปานกลาง แต่สารสกัดมีความคงตัวได้ในระยะ 2 เดือน หลังจากนั้นฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดค่อยๆ ลดลง ดังนั้นจึงควรพัฒนาสารสกัดให้มีความคงตัว โดยการศึกษาสารประกอบทางเคมี ของสารสกัดตำรับและพืชเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบของตำรับว่ามีสารสำคัญ หรือพืชที่เป็นองค์ประกอบชนิดใดออกฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสองชนิดนี้แล้วจึงศึกษาวิธีการพัฒนาสารสกัด ให้มีความคงตัวในการออกฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งกล่องเสียงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนันสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัย แพทย์แผนไทยประยุกต์ (CEATMR) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

1. องค์การอนามัยโลก (WHO). มะเร็ง. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 19 พฤษภาคม 2561] เข้าถึงได้จาก: http://www.who.int/cancer/en/.
2. คณะกรรมการ จัดทำแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ พ.ศ. 2556 - 2560 [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 19 พฤษภาคม 2561] เข้าถึงได้จาก: http://www.nci.go.th/th/File_download/D_index/NCCP_2556-2560.pdf.
3. กลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2559 [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 19 พฤษภาคม 2561] เข้าถึงได้จาก:http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/HOSPITAL-BASED%202015.pdf.
4. Griffin, A.M., Butow., P.N., Coates, A.S., Childs, A.M., Ellis, P.M., Dunn, S.M. and Tattersall, M.H. On the receiving end, V: patient perception of the side effect of cancer in chemotherapy. Journal of Annuals of Oncology 1996;7:189-95.
5. กองการประกอบโรคศิลปะ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเวชกรรม 2549;เล่ม 1:87.
6. Itharat, A., Singchangchai, P. and Ratanasuwan, P. Wisdom of Southern Thai Traditional Doctors. Prince of Songkla University, Songkla 1998; page 126.
7. กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยา; พิมพ์ครั้งที่ 1: 2535.
8. Skehan, P., Storeng, R., Scudier., D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of the National Cancer Institute 1990; 82: 1107-12.

9. Grimm, W. Extension of the International Conference on Harmonization Tripartite Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products to countries of climatic zones III and IV. Drug Development and Industrial Pharmacy 1998 Apr; Vol. 24 Issue 4:313-25.
10. Boyed, M.R. The NCI *in vitro* anticancer drug discovery screen. concept, implementation, and Operation, 1985-1995. In: K. Teichher, (ed.). Anticancer drug development guide; preclinical screening, clinical trials and approval. Totowa: Humana Press 1997: pp. 23-42.
11. Mahavorasirikul, W., Viyanant, V., Chaijaroenkul, W., Itharat, A. and Na-Bangchang, K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. BMC Complementary and Alternative Medicine 2010;10:1-8.
12. Salomi, N.J., Nair, S.C., Jayawardhanan, K.K., Varghese, C.D. and Panikkar K.R. Antitumour principles from Nigella sativa seeds. Cancer letters 1992 Mar 31;63:41-6.
13. Farah, I.O. and Begum, R.A. Effect of *Nigella sativa* (*N. sativa* L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. Biomedical Sciences Instrumentation 2003;39:359-64.
14. Yazan, L.S., Ng, W.K., Al-Naqeeb, G. and Ismail M. Cytotoxicity of thymoquinone (TQ) from *Nigella sativa* towards human cervical carcinoma cells (HeLa). Journal of Pharmacy Research Vol. 2009 Apr;2:585-89.
15. Pradhan, D., Tripathy, G. and Patanaik S. Anticancer activity of *Limonia acidissima* Linn (Rutaceae) fruit extracts on human breast cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2012;11:413-9.
16. Sari, L.M. Subita, G.P. and Auerkari E.I. Potential antioxidant and cytotoxic activities of areca nut (*Areca catechu* Linn.) extract in human oral squamous cell carcinoma and keratinocyte cells. *Asian Jounal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2017;10:286-91
17. Nguyen Thi Thanh, C., Truong Thi Cam, M., Pham Van, T., Nguyen, L., Nguyen Ha, M. and Van Meervelt L. Synthesis, structure and *in vitro* cytotoxicity of platinum(II) complexes containing eugenol and a quinolin-8-ol-derived chelator. Acta Crystallogr C Struct Chem 2017 Nov 1;73:1030-7

Abstract

Cytotoxic activity of Kabpi remedy with *Areca catechu* L. against oral and laryngeal cancer cell and its stability study

Kriyapa Lairungruang*, Arunporn Itharat*, **, Sumalee Panthong*, **

*Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

**Center of Excellence on Applied Thai Traditional Medicine Research (CEATMR), Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

Introduction: Thai Traditional remedy called Kabpi (KP) was described in Mukalok scripture and it has long been used for treatment of swelling of throat and oral cancer. It is composed of *Achasma sphaerocephalum* Holtt., *Limonia acidissima* L., *Nigella sativa* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry. It is grinded into powder and eat with *Areca catechu* L. (AC). There is no report about cytotoxicity. Therefore, the purposes of this study are to investigate cytotoxic activity against oral cancer (KB) and laryngeal cancer (HEp-2) cell lines to scientific information for properties support and its stability study.

Method: KP remedy added AC was macerated with 50% ethanol. This method imitated from Thai folk medicines using by soaking in alcohol. The extract was tested for cytotoxic activity against KB and HEp-2. Stability of the extract was investigated by storage under accelerated conditions at temperature 40 ± 2 ℃ and 75 ± 5 % relative humidity (RH) for 6 months and tested for cytotoxic activity by using Sulphorhodamine B (SRB) assay.

Result: The results of this study, the ethanolic extract of KP remedy added AC showed good cytotoxic activity against KB and showed moderate cytotoxic activity against HEp-2 cell lines with IC_{50} values of 28.85 ± 0.69 and 34.15 ± 1.45 µg/ml, respectively. For 6 months stability test, the cytotoxic activity against KB and HEp-2 showed significant differences at various time comparison with day 0 (p value < 0.05) since 30 days.

Conclusion: The 50% ethanolic extract of KP remedy added AC showed good cytotoxic activity against KB and showed moderate cytotoxic activity against HEp-2 cell lines, IC_{50} value reference from National Cancer Institute (NCI), USA and was stable with on 2 months at room temperature after that the activity of extract decreased significantly with day 0.

Key words: Stability, Kabpi remedy, Oral cancer, Laryngeal cancer, Cytotoxic activity