

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งมะเร็งและปริมาณฟีนอลิก ของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก

ดวงพชรภรณ์ ขวัญเขียว*, สุมาลี ปานทอง^{†,§}, ศรีโสภา เรืองหนู[†], อรุณพร อธิรัตน์[‡],
ภัสสร วรวัฒนนัย[‡]

* หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง
อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[†] สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[‡] ศูนย์ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง
อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[§] ผู้รับผิดชอบบทความ: psumalee@tu.ac.th

บทคัดย่อ

ตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก เป็นตำรับยาที่ใช้รักษามะเร็งในมดลูกซึ่งถูกระบุไว้ในคัมภีร์ยาสมุนไพรไทยของกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ แต่ยังไม่มียารายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของยาตำรับนี้ วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาดังกล่าวได้แก่ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ด้านเชื้อราและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกและสมุนไพรเดี่ยว ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกยับยั้งการหลั่ง IL-6 และยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* อย่างไรก็ดี สารสกัดจากตำรับไม่มีฤทธิ์ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่และมะเร็งมดลูก แต่สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรเดี่ยวบางตัวมีฤทธิ์ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่และมะเร็งมดลูกได้ดี จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดพบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวมีสารฟีนอลิกในปริมาณสูง ผลทั้งหมดสรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับสามารถยับยั้งการอักเสบและต้านเชื้อราได้ดี แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่และมะเร็งมดลูก ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำยาตำรับดังกล่าวไปใช้หรือพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ และความปลอดภัยของยาตำรับนี้ควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ตำรับยาไทย, มะเร็งมดลูก, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา, ปริมาณฟีนอลิกรวม

Biological and Anticancer Activities as well as Total Phenolic Content of Thai Traditional Herbal Medicine for Treatment of Uterine Cancer

Duangpacharaporn Kwanchian^{*}, Sumalee Panthong^{†,§}, Srisopa Ruangnoo[†], Arunporn Itharat^{†,‡}, Patsorn Worawattananutai[‡]

^{*}Master of Science Program in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Klong Nueng Sub-District, Klong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[†]Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Klong Nueng Sub-District, Klong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[‡]Center of Excellent in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Klong Nueng Sub-District, Klong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[§]Corresponding author: psumalee@tu.ac.th

Abstract

Ya Kae Mareng Nai Motluk (MRM) is a Thai traditional herbal remedy for uterine cancer, described in the textbook on herbal medicine by folk healer Mor Phon, Krom Luang (Prince) Chumphon Khet Udomsak. As biological activities of this remedy remain uninvestigated, this study was done to determine biological activities such as cytotoxicity, anti-inflammatory and antifungal properties as well as total phenolic contents of ethanolic and aqueous extracts of MRM and its medicinal plant ingredients. Results showed that the ethanolic extract of MRM expressed anti-inflammatory activity against interleukin 6 (IL-6) production and inhibited *Candida albicans* growth. However, the MRM extract was not toxic to ovarian or uterine cancer cell lines. On the other hand, some ethanolic extracts of some single medicinal plants showed a good cytotoxic activity against ovarian and uterine cancer cell lines. For total phenolic analysis, ethanolic extracts of MRM and its single herbal ingredients had high phenolic contents. The findings indicate that MRM ethanolic extract has anti-inflammatory and antifungal activities, but does not inhibit the growth of ovarian or uterine cancer cell lines. Thus, based on its preliminary medicinal property information, MRM can be used as a drug and for further product development. However, other relevant MRM biological activities and safety should be studied in the future.

Key words: Thai traditional remedy, uterine cancer, anti-inflammatory activity, antifungal activity, total phenolic content

บทนำและวัตถุประสงค์

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนไทยมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 จากข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าปัจจุบันมีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้น 122,757 คนต่อปี และมีอัตราการเสียชีวิต 80,665 คนต่อปี ในกรณีของเพศหญิงพบว่าจากสถิติผู้ป่วยมะเร็งในปี พ.ศ. 2563 มะเร็งในเพศหญิงที่พบมากที่สุด ได้แก่ มะเร็งเต้านม (39.8%) นอกจากนี้ยังพบมะเร็งในอวัยวะสืบพันธุ์

ของเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งมดลูก (5.1%) และมะเร็งรังไข่ (3.5%)^[1] สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง อาจเกิดได้จากหลายปัจจัยทั้งปัจจัยภายนอกร่างกายและปัจจัยภายในร่างกาย เช่น สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหาร มลภาวะต่าง ๆ และความผิดปกติทางพันธุกรรม^[1] นอกจากนั้นการติดเชื้อรา *Candida albicans* จะส่งผลให้ร่างกายผลิตสารกระตุ้นการอักเสบได้แก่ tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6)^[2] ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผล

ให้เซลล์เกิดการเจริญผิดปกติ และกลายไปเป็นเซลล์มะเร็งได้^[3]

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ การฉายรังสี การผ่าตัด เคมีบำบัด รวมถึงการใช้ศาสตร์การแพทย์ทางเลือกช่วยในการรักษา^[4] ในทางการแพทย์แผนไทยมีตำรับยาที่ระบุสรรพคุณเกี่ยวกับการใช้รักษาโรคมะเร็งอยู่มากมายหลายตำรับ หนึ่งในนั้นคือตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกที่ถูกระบุไว้ในคัมภีร์ยาสมุนไพรไทย ตำรับ “หมอมพร” คือ กรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ หัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) หัวข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill.) ต้นหนอนตายหยาก (*Stemona collinsiae* Craib HC) รากนมแมว (*Rauwenhoffia siamense* Scheff.) หัวพุทธรักษาดอกสีขาว (*Canna indica* L.) หนังก้อย่างละ 4 บาทเท่ากัน เกลือทะเล 4 กำมือ ต้มดื่มครั้งละ 1 ถ้วยชาจีน เข้า เย็น แก้โรคมะเร็งในมดลูก^[5] จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาของสมุนไพรเดี่ยวบางชนิดในตำรับ พบว่า หัวข้าวเย็นเหนือและพุทธรักษามีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี^[6-7] ส่วนสารสกัดหัวข้าวเย็นใต้พบว่าสามารถต้านการอักเสบและยับยั้งเซลล์มะเร็งได้^[8-11] กลุ่มสารสำคัญที่พบในสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของยาตำรับนี้พบว่าประกอบด้วยสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกหลายชนิด เช่น เควอซีติน แอสติวบิน แคมเฟอรอล กรดโรสมารินิก^[6,12-15] ซึ่งมีรายงานว่ามีส่วนช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็งและต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดเซลล์มะเร็งในร่างกาย^[16] แต่สำหรับตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกนั้นยังไม่พบรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพและกลุ่มสารสำคัญของตำรับ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ และเซลล์มะเร็งมดลูก ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก และสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง centrifuge (ยี่ห้อ Hettich, ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่อง microplate reader (ยี่ห้อ Thermo Scientific, ประเทศออสเตรเลีย), ตู้แช่แบบมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ยี่ห้อ Thermo Scientific, ประเทศออสเตรเลีย), lipopolysaccharides (ยี่ห้อ Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา), Dulbecco's Modified Eagle Medium (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา), McCoy's 5a medium (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา), เพนนิซิลิน และสเตรปโตมัยซิน (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา), fetal bovine serum (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา), trypsin-EDTA (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา), sulphorhodamine B (ยี่ห้อ Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา), ELISA Kit (ยี่ห้อ R&D, ประเทศสหรัฐอเมริกา), Muller Hinton broth (Difco, ประเทศอังกฤษ), Sabouraud's dextrose agar (Difco, ประเทศอังกฤษ), Resazurin (ยี่ห้อ Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา), 96-well plate (ยี่ห้อ Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา), Folin-Ciocalteu reagent (ยี่ห้อ Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา), gallic acid (ยี่ห้อ TCI, ประเทศญี่ปุ่น)

1.2 การเตรียมตัวอย่างพืช

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาจะถูกเก็บมาจากแหล่งดังต่อไปนี้ หัวข้าวเย็นเหนือจากจังหวัดเลย หัว

ข้าวเย็นใต้และหนองตายหยากจากจังหวัดเพชรบูรณ์ รากนมแมวจากจังหวัดลำปาง เหง้าพุทธรักษาจาก จังหวัดสุพรรณบุรี รวมจำนวนสมุนไพรทั้งสิ้น 6 ชนิดโดยหั่นข้าวเย็นเหนือจะถูกนำไปตรวจสอบเทียบ สายพันธุ์และขอเลขอ้างอิงจากพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เลข อ้างอิง SKP A062041305 หนองตายหยาก นมแมว และพุทธรักษาถูกนำไปตรวจสอบเทียบสายพันธุ์และ ขอเลขอ้างอิงจากพิพิธภัณฑ์สมุนไพร กรมการแพทย์ แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกโดยมีเลขอ้างอิงคือ TMM-c No.1000643, TMM No.0006005 และ TMM No.0006006 ตามลำดับ

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสาร

นำสมุนไพรมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้น เล็ก ๆ แล้วนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C หลังจากนั้นนำสมุนไพรซึ่งอย่างละเท่า ๆ กัน บดผสมเป็นตำรับ แล้วจึงทำการสกัดสารจากตำรับ และสมุนไพรเดี่ยวโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ การนำสมุนไพรไปแช่สกัดด้วยเอทานอล (95%) เป็น เวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการกรอง แล้วนำของเหลว ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง แบบสูญญากาศทำซ้ำอีกสองครั้ง แล้วนำไประเหยตัว ทำละลายออกจนแห้ง สำหรับวิธีที่สองคือนำสมุนไพร ไปต้มกับน้ำให้เดือด 15 นาที แล้วกรองเอาแต่น้ำ ทำ เช่นนี้ซ้ำอีกสองครั้ง จากนั้นนำน้ำที่กรองได้ทั้งสามครั้ง มาต้มเคี่ยวให้เหลือหนึ่งในสามส่วน แล้วนำไปทำให้ แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้น นำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะ นำไปทดสอบ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ มะเร็ง

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองมีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งรังไข่ (SKOV-3) ATCC HTB-77 ซึ่ง จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และเซลล์มะเร็งมดลูก (HEC-1-A) ATCC HTB112 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร McCoy's 5a medium โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ ทั้งสองชนิดจะมีการเติม 10% fetal bovine serum (FBS), 50 IU/mL เพนนิซิลินและ $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ สเตรปโตมัยซิน เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C ที่มีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จะใช้เทคนิค sulphorhodamine B (SRB)^[17] โดย ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในเพลท 96 หลุม โดยใส่ เซลล์ SKOV-3 ที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม สำหรับเซลล์ HEC-1-A ใส่ที่ความหนาแน่น 5×10^4 เซลล์/หลุม ทำการบ่ม 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียม สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/mL โดยที่สารสกัดชั้น เอทานอลจะละลายด้วย dimethylsulphoxide ใน ขณะที่สารสกัดชั้นน้ำจะละลายด้วยน้ำ deionized water แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด $0.22\text{ }\mu\text{m}$ จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเตรียมแบบเจือจางลดลง 2 เท่า (serial 2-fold dilution) และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใน การเจือจาง แล้วจึงทำการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ ลงไปหลุมละ $100\text{ }\mu\text{L}$ ทำการบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline ที่ปราศจากเชื้อแล้วเติมอาหารใหม่ ลงไป จากนั้นบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง แล้วทำการตรึง เซลล์ด้วย 40% trichloroacetic acid บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสี 0.4% SRB บ่ม 30 นาที

จากนั้นล้างเพลทแล้วตั้งทิ้งให้แห้ง ทำการละลายสียด้วย 10 mM Tris base นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} โดยเปรียบเทียบกับยา Paclitaxel (ยามาตรฐาน) ที่ทำการละลายด้วย dimethylsulphoxide ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL แล้วทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเตรียมแบบเจือจางลดลง 2 เท่าเช่นกัน

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบจะศึกษาการยับยั้ง $TNF-\alpha$ และ IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาของหนู (RAW 264.7) โดยเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มีการเติม 10% FBS, 50 IU/mL เพนนิซิลิน และ 50 μ g/mL สเตربتอมัยซิน ทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C. ที่มีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นนำไปทดสอบโดยใส่เซลล์ลงไปในเพลท 96 หลุมที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าออก แล้วทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วยการเติม lipopolysaccharide จากนั้นทำการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/mL โดยที่สารสกัดชั้นเอทานอลจะละลายด้วย dimethylsulphoxide ในขณะที่สารสกัดชั้นน้ำจะละลายด้วยน้ำ deionized water แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ m จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเตรียมแบบเจือจางลดลง 2 เท่า (serial 2-fold dilution) และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ในการเจือจาง แล้วจึงทำการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปหลุมละ 100 μ L บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดให้ทำการนำส่วนใสไปตรวจวัดปริมาณ $TNF-\alpha$ และ IL-6 ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้วิธี Sandwich ELISA

ซึ่งจะทำการเคลือบเพลทด้วย capture antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการตรวจวัด จากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดลงไป บ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลท แล้วเติม detection antibody และ streptavidin-HRP และในขั้นตอนสุดท้ายเติม TMB substrate solution ทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N H_2SO_4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรแล้วคำนวณค่า %inhibition หาค่า IC_{50} [18-20]

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ *Candida albicans* ATCC 9028 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการทดสอบจะใช้เทคนิค Microtitre plate based method [21] โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Muller Hinton broth (MHB) และปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland จากนั้นทำการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 mg/mL โดยที่สารสกัดชั้นเอทานอลจะละลายด้วย dimethylsulphoxide ในขณะที่สารสกัดชั้นน้ำจะละลายด้วยน้ำ deionized water แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ m แล้วจึงทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเตรียมแบบเจือจางลดลง 2 เท่า (serial 2-fold dilution) และความเข้มข้นสูงสุดในการเตรียมเพื่อทดสอบจะมีค่าเท่ากับ 10 mg/mL ทำการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงในเพลท 50 μ L/หลุม แล้วทำการเติมเชื้อที่ปรับความขุ่นไว้ลงไปปริมาตร 50 μ L/หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการเติมสี resazurin ลงไปในแต่ละหลุม ทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของ resazurin โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่

ไม่ทำให้ resazurin เปลี่ยนสีคือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) จากนั้นจึงนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ มาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ (MFC) โดยหยดสารละลายลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญจะถูกบันทึกเป็นค่า MFC สำหรับ positive control จะใช้ยา Amphotericin B เตรียมที่ความเข้มข้น 100 mg/mL ละลายใน DMSO แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหาร MHB โดยเตรียมแบบเจือจางลดลง 2 เท่า (serial 2-fold dilution) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยความเข้มข้นสูงสุดในการเตรียมเพื่อทดสอบจะมีค่าเท่ากับ 1 mg/mL แล้วจึงนำไปทำการทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอนการทดสอบผลของสารสกัด

2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมด้วย Folin-Ciocalteu's reagent

สารสกัดตำรับและสมุนไพรเดี่ยวจะถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นทำการเปิดสารตัวอย่างใส่ลงในเพลท 96 หลุม (100 μ L/หลุม) แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 100 μ L/หลุม และสารละลาย 20% sodium carbonate 80 μ L/หลุม บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร^[22] จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ซึ่งเตรียมความเข้มข้นเรียงลำดับจากเข้มข้นน้อยไปมาก ได้แก่ 0, 30, 50, 70, 150, 200, และ 400 μ L/mL ตามลำดับ โดยกราฟมาตรฐานที่ได้จะเป็นเส้นตรง โดยให้มีค่า correlation coefficient (R^2) ≥ 0.995 จากนั้นรายงานค่าเป็นมิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด

2.6 การรายงานผล

สารสกัดทั้งชั้นน้ำและชั้นเอทานอลทั้งหมด 12

ตัวอย่างจะถูกนำไปทำการทดสอบ โดยจะมีการทำซ้ำ 3 ครั้งในทุก ๆ การทดสอบ และทำการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่ได้ แล้วจึงรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษา

1. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ในการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่และเซลล์มะเร็งมดลูกของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกพบว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำของตำรับยาดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้ โดยพบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) นั้นมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบคือ 100 μ g/mL (ตารางที่ 1) ในกรณีสารสกัดของสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ พบว่าสารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำเกือบทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ โดยแสดงค่า IC_{50} มากกว่า 100 μ g/mL ยกเว้นสารสกัดชั้นเอทานอลของรากนมแมวที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 54.46 ± 0.67 μ g/mL สำหรับฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมดลูกพบว่าสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวชั้นเอทานอลของรากนมแมว หัวข้าวเย็นใต้และหนอนตายหยากมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมดลูก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.06 ± 0.79 , 48.26 ± 4.88 และ 69.29 ± 4.47 μ g/mL ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดน้อยกว่ายา Paclitaxel (ยามาตรฐาน) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.30 \times 10^{-4} \pm 1.14 \times 10^{-5}$ และ $5.86 \times 10^{-11} \pm 2.33 \times 10^{-12}$ μ g/mL ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ และเซลล์มะเร็งมดลูกตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ และเซลล์มะเร็งมดลูกของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก และสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ (สารสกัดทั้งหมดถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง)

ตัวอย่าง	สารสกัด	IC ₅₀ (μg/mL)	
		เซลล์ SKOV-3	เซลล์ HEC-1-A
ตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก	เอทานอล	> 100	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
หัวข้าวเย็นเหนือ	เอทานอล	> 100	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
หัวข้าวเย็นใต้	เอทานอล	> 100	48.26 ± 4.88
	น้ำ	> 100	> 100
หนอนตายหยาก	เอทานอล	> 100	69.29 ± 4.47
	น้ำ	> 100	> 100
รากนมแมว	เอทานอล	54.46 ± 0.67	30.06 ± 0.79
	น้ำ	> 100	> 100
เหง้าพุทธรักษา	เอทานอล	> 100	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
ยามาตรฐาน	Paclitaxel	0.00013 ± 0.00001	0.00000000006 ± 0.00

2. ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่ง

สาร IL-6 และ TNF-α

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก และสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกชั้นเอทานอลสามารถยับยั้งการหลั่งสาร IL-6 ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งสารได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เท่ากับ 35.47 ± 3.29 μg/mL แต่สารสกัดชั้นน้ำของตำรับดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการหลั่งสาร IL-6 ได้ สำหรับสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของหัวข้าวเย็นใต้และนมแมวชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.57 ± 2.34 และ 99.39 ± 0.09 μg/mL ในขณะที่สารสกัดอื่น ๆ ไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้อย่างไรก็ตามสารสกัดทุกชนิด

ที่นำมาทดสอบไม่สามารถยับยั้งการหลั่งสาร TNF-α ได้ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 100 μg/mL (ตารางที่ 2)

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans*

ในการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกและสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ พบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.5 mg/mL ในขณะที่สารสกัดน้ำของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ในส่วนสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวพบว่าสารสกัดเอทานอลของรากนมแมวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.625 mg/mL รองลง

มาคือสารสกัดเอทานอลของหัวข้าวเย็นใต้ สารสกัดน้ำของหัวข้าวเย็นใต้ และสารสกัดน้ำของรากนมแมว โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.5, 5, 5 mg/mL ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดยังคงมีฤทธิ์ต่ำกว่า positive control คือ Amphotericin B ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.125 mg/mL (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสาร IL-6 และ TNF- α ของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งโหนดลูก และสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ (สารสกัดทั้งหมดถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง)

ตัวอย่าง	สารสกัด	IC ₅₀ (μ g/mL)	
		IL-6	TNF- α
ตำรับยาแก้มะเร็งโหนดลูก	เอทานอล	35.47 $\pm$ 3.29	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
หัวข้าวเย็นเหนือ	เอทานอล	> 100	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
หัวข้าวเย็นใต้	เอทานอล	39.57 $\pm$ 2.34	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
หนอนตายหยาก	เอทานอล	> 100	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
รากนมแมว	เอทานอล	99.39 $\pm$ 0.09	> 100
	น้ำ	> 100	> 100
เหง้าพุทธรักษา	เอทานอล	> 100	> 100
	น้ำ	> 100	> 100

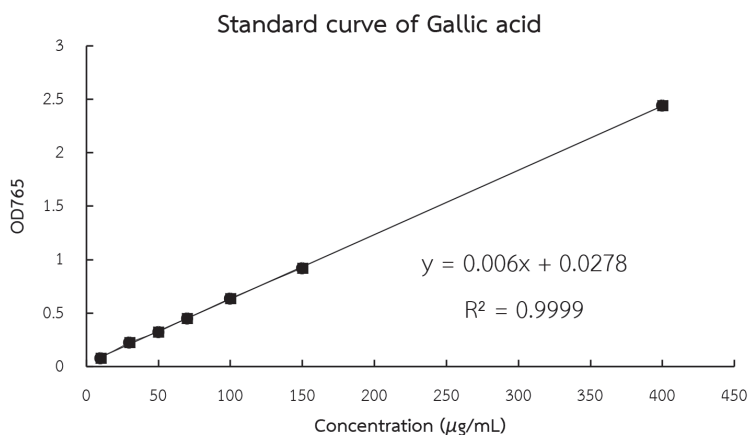
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งโหนดลูกและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ (สารสกัดทั้งหมดถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง)

ตัวอย่าง	สารสกัด	MIC (mg/mL)	MFC (mg/mL)
ตำรับยาแก้มะเร็งโหนดลูก	เอทานอล	2.5	> 5
	น้ำ	> 5	> 5
หัวข้าวเย็นเหนือ	เอทานอล	> 5	> 5
	น้ำ	> 5	> 5
หัวข้าวเย็นใต้	เอทานอล	2.5	5
	น้ำ	5	> 5
หนอนตายหยาก	เอทานอล	> 5	> 5
	น้ำ	> 5	> 5
รากนมแมว	เอทานอล	0.625	> 5
	น้ำ	5	> 5
เหง้าพุทธรักษา	เอทานอล	> 5	> 5
	น้ำ	> 5	> 5
Amphotericin B		0.125	0.5

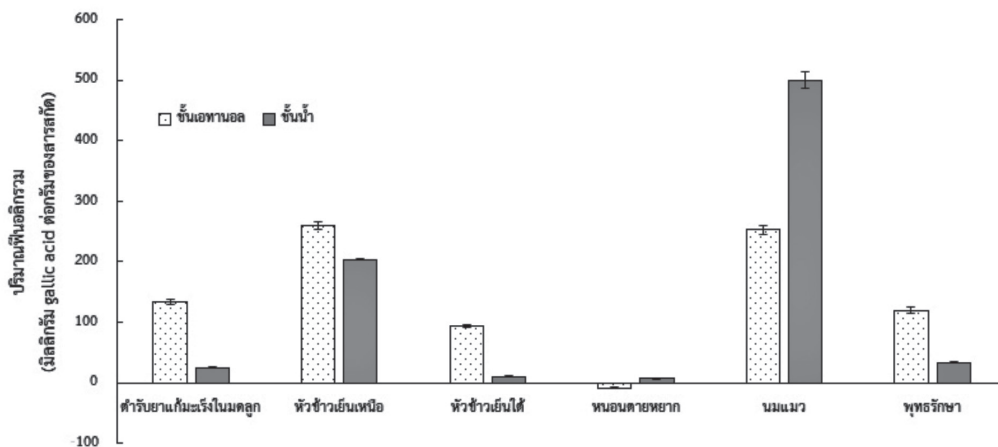
4. ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยา แก้มะเร็งในมดลูกและสมุนไพรเดี่ยว

ในส่วนการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูก โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid (ภาพที่ 1) พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดตำรับน้ำ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 132.90 มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด ในขณะที่สารสกัดน้ำของตำรับมี

ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 24.99 มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด สำหรับสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวพบว่าสารสกัดน้ำของรากนมแมวพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ 499.90 มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลของหัวข้าวเย็นเหนือ สารสกัดเอทานอลของรากนมแมว และสารสกัดน้ำของหัวข้าวเย็นเหนือ โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 259.26, 252.98, และ 203.93 มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของ gallic acid



ภาพที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดแต่ละชนิด

อภิปรายผล

โรคมะเร็งในเพศหญิงที่พบได้บ่อยมีมากมายหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งรังไข่ และมะเร็งมดลูก เป็นต้น^[23] จากตำรายาของกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์พบว่ามีการกล่าวถึงตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกที่ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิดนำมาต้มและให้ผู้ป่วยรับประทานเพื่อรักษาโรคมะเร็งในมดลูก จากการศึกษาในระดับหลอดทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของตำรับยาดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งมดลูกและเซลล์มะเร็งรังไข่ ถึงแม้ว่าสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ ได้แก่ สารสกัดเอทานอลของรากนมแมว หัวข้าวเย็นใต้ และหนอนตายหยากจะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งมดลูกก็ตาม เหตุผลดังกล่าวอาจเกิดจากสัดส่วนของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวที่มีปริมาณลดลง เมื่อนำมาผสมเป็นตำรับจึงอาจทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งนั้นมีค่าลดลงตามไปด้วย ในกรณีของสมุนไพรหัวข้าวเย็นใต้ที่มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสมุนไพรดังกล่าว ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ 2,4-dimethoxy-5,6-dihydroxy-9,10-dihydrophenanthrene, 5-hydroxy-2,4,6-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene, 5,6,2-trihydroxy 3,4-methoxy, 9,10-dihydrophenanthrene, diosgenin-(3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside, dioscoreanone และ dioscorealides B ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งต่อลูกหมาก เซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งตับได้^[8,24] ดังนั้นการที่หัวข้าวเย็นใต้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งมดลูกได้นั้นน่าจะเกิดจากผลของสารต่าง ๆ ที่เคยพบรายงานก่อนหน้านี้ ในส่วนของฤทธิ์ต้านการอักเสบนั้น พบว่าสารสกัดชั้น

เอทานอลของตำรับมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสาร IL-6 ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารไซโตไคน์ในกระบวนการอักเสบที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและยังมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ส่งผลให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งขึ้นได้^[25] ดังนั้นการที่สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกสามารถยับยั้ง IL-6 ได้นั้นจะส่งผลดีที่จะสามารถลดอาการอักเสบและลดอัตราการกลายพันธุ์ของเซลล์ได้ ในการออกฤทธิ์ของตำรับนั้น คาดว่าน่าจะมาจากสมุนไพรเดี่ยวในตำรับเนื่องจากสารสกัดชั้นเอทานอลของหัวข้าวเย็นใต้ และรากนมแมวพบว่ามีฤทธิ์เช่นเดียวกับสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับ สารสำคัญที่พบในสารสกัดชั้นเอทานอลของหัวข้าวเย็นใต้ยังพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีเช่นกัน^[8,10-11] ส่วนสารสกัดพุทธรักษานั้นนอกจากจะพบว่าสามารถยับยั้ง IL-6 ได้ ก็ยังพบรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของพุทธรักษาสามารถยับยั้งไซโตไคน์ในกระบวนการอักเสบตัวอื่น ๆ ได้แก่ PGE2, NO, และ IL-1 β ^[7] นอกจากการยับยั้งสารในกระบวนการอักเสบแล้ว สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับยังมีส่วนช่วยยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของการกระตุ้นให้เซลล์บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เกิดการกลายพันธุ์และเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้อีกหนึ่งเนื่องจากสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น^[2] การออกฤทธิ์ของสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับน่าจะเกิดจากสารสำคัญในสมุนไพรเดี่ยวเนื่องจากในการทดสอบพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของหัวข้าวเย็นใต้และรากนมแมวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans* ได้เช่นกัน

ในส่วนของกลุ่มสารเคมีที่พบในสารสกัดนั้นพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดชั้นน้ำซึ่งน่าจะเกิดจาก

สมุนไพรเดี่ยวชั้นเอทานอลมีปริมาณของฟีนอลิกที่สูงเช่นกัน โดยสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ ได้แก่ หัวข้าวเย็นเหี่ยว นมแมว และหนอนตายหยากพวยงาม วิจัยก่อนหน้าเกี่ยวกับการพบสารกลุ่มฟีนอลิก เช่น แอสติวบิน เควอซีติน และแคมเฟอร์อล^[6,12-15] สารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา^[26-27] ดังนั้นสารสกัดเอทานอลของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกอาจพบสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ จึงทำให้แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ อย่างไรก็ตามเมื่อดูความสอดคล้องระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแต่ละชนิดพบว่ามีการสกัดสมุนไพรเดี่ยวบางตัว ได้แก่ สารสกัดน้ำของนมแมวที่พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกที่สูงที่สุดแต่ไม่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งฤทธิ์ยับยั้ง IL-6 และฤทธิ์ต้านเชื้อรา จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารฟีนอลิกที่พบปริมาณสูงในสารสกัดน้ำของนมแมวนั้นน่าจะมีองค์ประกอบของสารหรือชนิดของสารเป็นคนละชนิดกับสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในสารสกัดเอทานอลของนมแมวส่งผลให้สารสกัดน้ำและเอทานอลของนมแมวมีฤทธิ์แตกต่างกัน ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากการสกัดด้วยตัวทำละลายคนละชนิดจึงทำให้ได้องค์ประกอบของสารเคมีที่แตกต่างกันออกไป^[28]

ข้อสรุป

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดของตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งมดลูกและเซลล์มะเร็งรังไข่ได้โดยตรง และมีฤทธิ์ต้านเชื้อราอยู่ในระดับต่ำ แต่สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ที่ช่วยในการยับยั้งการอักเสบ ดังนั้นในการนำตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกไปใช้นั้นอาจนำไปใช้เพื่อช่วยยับยั้งการอักเสบในคนไข้ และอาจนำไป

ใช้ร่วมกับยาตำรับอื่นที่ออกฤทธิ์โดยตรงกับมะเร็งสำหรับการนำตำรับยาดังกล่าวไปทำการศึกษาต่อนั้น พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลจะให้ผลดีที่สุด อย่างไรก็ตามจากสรรพคุณตามตำรายาของกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ระบุไว้ว่าใช้รักษามะเร็งในมดลูก ดังนั้นตำรับยาดังกล่าวจึงควรจะไปศึกษาผลกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพื่อยืนยันผลของตำรับยาในการรักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ควมมีการศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักและสารออกฤทธิ์เพื่อช่วยให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์และการควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากตำรับยาแก้มะเร็งในมดลูกต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ในการสนับสนุนทุนวิจัยตามสัญญาเลขที่ ทป.2-01-2564

References

1. National Cancer Institute. Hospital-based cancer registry 2020 [Internet]. 2021 [cited 2022 May 3]. Available from: https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2563/index.html (in Thai)
2. Ramirez-Garcia A, Rementeria A, Aguirre-Urizar JM, Moragues MD, Antoran A, Pellon A, Abad-Diaz-de-Cerio A, Hernando FL. *Candida albicans* and cancer: can this yeast induce cancer development or progression? Crit Rev Microbiol. 2016;42(2):181-93.
3. Muntané J, De la Mata M. Nitric oxide and cancer. World J. Hepatol. 2010;2(9):337-44.
4. Buckner CA, Lafrenie RM, Dènommée JA, Caswell JM, Want DA. Complementary and alternative medicine use in patients before and after a cancer diagnosis. Curr Oncol. 2018;25(4):e275-81.
5. Chamnan T. Thai traditional medicine of Krom Luang Chumphon Khet Udomsak. 2nd ed. Bangkok: Thai Quality Book; 2013; 368 p. (in Thai)

6. Ruangnoo S, Jaiaree N, Makchuchit S, Panthong S, Thongdeeying P, Itharat A. An *in vitro* inhibitory effect on RAW 264.7 cells by anti-inflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2012;30(4):268-74.
7. Chen HJ, Chen C-N, Sung M-L, Wu Y-C, Ko P-L, Tso TK. *Canna indica* L. attenuates high-glucose-and lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in monocyte/macrophage. *J Ethnopharmacol.* 2013;148(1):317-21.
8. Hiransai P, Ratanachaiyavong S, Itharat A, Graidist P, Ruengrairatanaroj P, Purintrapiban J. Dioscorealide B suppresses LPS-induced nitric oxide production and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages: the inhibition of NF-kappa α and ERK1/2 activation. *J Cell Biochem.* 2010;109(5):1057-63.
9. Itharat A, Plubrukan A, Kaewpradub N, Chuchom T, Ratanasuwan P, Houghton P. Selective cytotoxicity and antioxidant effects of compounds from *Dioscorea membranacea* Rhizomes. *Nat Prod Commun.* 2007;2:643-8.
10. Panthong S. Immunomodulatory effect of Thai medicinal preparation for treatment of cancer patients (dissertation). Pathumthani: Thammasat University; 2015.
11. Tewtrakul S, Itharat A. Anti-allergic substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *Bioorg Med Chem.* 2006;14(24):8707-11.
12. Rutnakornpituk B, Boonthip C, Kerdpan J, Fakfeang N, Kholam W. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and analyses of active compounds in *Stemona collinsae* Craib crude extracts. *Int J Sci.* 2018;15(1):25-36.
13. Jaidee W, Andersen RJ, Chavez MAG, Wang YA, Patrick BO, Pyne SG, Muanprasat C, Borwornpinyo S, Laphookhieo S. Amides and flavonoids from the fruit and leaf extracts of *Melodorum siamensis*. *J Nat Prod.* 2019;82(2):283-92.
14. Intaranongpai J. Phytochemical investigation and biological activities of *Melodorum siamensis* stem and *Annona squamosa* seed extracts (dissertation). Bangkok: Mahidol University; 2006.
15. Ayusman S, Duraivadevel P, Gowtham HG, Sharma S, Hariprasad P. Bioactive constituents, vitamin analysis, antioxidant capacity and α -glucosidase inhibition of *Canna indica* L. rhizome extracts. *Food Bioscience.* 2020;35:100544.
16. Carochi M, Ferreira ICFR. The role of phenolic compounds in the fight against cancer--a review. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013;13(8):1236-58.
17. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-12.
18. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(5):645-57.
19. Cho BO, Ryu HW, So Y, Lee CW, Jin CH, Yook HS, Jeong YW, Park JC, Jeong IY. Anti-inflammatory effect of mangostenone F in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Biomol Ther (Seoul).* 2014;22(4):288-94.
20. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res.* 2013;62(7):641-51.
21. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007;42(4):321-4.
22. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 2004;85(2):231-7.
23. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(4):444-57.
24. Itharat A, Thongdeeying P, Ruangnoo S. Isolation and characterization of a new cytotoxic dihydrophenanthrene from *Dioscorea membranacea* rhizomes and its activity against five human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2014;156:130-4.
25. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol.* 2021;33(3):127-48.
26. Zhao X, Chen R, Shi Y, Zhang X, Tian C, Xia D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids from *Smilax glabra* Roxb. *Molecules.* 2020;25(22):5295.
27. Singh BN, Upreti DK, Singh BR, Pandey G, Verma S, Roy S, Naqvi AH, Rawat AKS. Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2153-68.
28. Venkatesan T, Choi Y-W, Kim Y-K. Impact of different extraction solvents on phenolic content and antioxidant potential of *Pinus densiflora* bark extract. *Biomed Res Int.* 2019;2019:3520675.