

ฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์

สุภาพร สุภารักษ์^{*†}, กนกวรรณ เกื่อนจันทร์ทอง^{*}, เพทาย อุ่นผล^{*}, สิริลดา พิมพ์า ชีขอลัม^{*}, สิริไพลิน จอมจันทร์ยง^{*}, วิภาวี ธัญญเจริญ^{*}, พรชัย สันเจริญโกโคย[†], อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์^{*}, พิเชฐ บัญญัติ[§]

^{*}สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

[†]สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

[§]กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

[†]ผู้รับผิดชอบบทความ: supaporn.su@dmasc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: การวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรไทยในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงในระดับหลอดทดลอง

วิธีการศึกษา: นำสารสกัดสมุนไพรมากระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลานำ PBMCs ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ (K-562 CCL-243™) ที่ถูกติดฉลากด้วยสีเขียว carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE) เป็นเวลา 4–6 ชั่วโมง ครบเวลาตรวจวัดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ (K-562 CCL-243™) ที่ถูกทำลายโดยการย้อมสี Propidium iodide (PI) และตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ (K-562 CCL-243™) ที่ถูกทำลายจะย้อมติดสี PI และ CFSE ส่วนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูกทำลายจะติดเพียงสี CFSE เท่านั้น

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบฤทธิ์สารสกัดพืชสมุนไพรจำนวน 17 สารสกัด ทดสอบกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสของโลหิตบริจาด จำนวน 3 ราย พบสารสกัดสมุนไพร 5 สารสกัด สามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังเพาะเลี้ยงแบบไมอีลอยด์ (K-562 CCL-243™) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired *t*-test) เมื่อเทียบกับเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น ได้แก่ สารสกัดสมุนไพร HID (ปอบิด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Helicteres isora* L. สารสกัดน้ำ), CSS (กัญชา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cannabis sativa* L.), CCF (ชิงโคนาสด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinchona ledgeriana* Moens.), CCD (ชิงโคนาแห้ง), และ AED 1 (พิลังกาสา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia elliptica* Thunb.)

อภิปรายผล: การทดสอบสารสกัดจำนวน 17 ชนิด นี้สามารถบ่งชี้สรรพคุณด้านวิทยาศาสตร์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 5 สารสกัดที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ (K-562 CCL-243™) ในระดับหลอดทดลอง ซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจและสามารถส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรไทยสำหรับรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้อย่างถูกต้องและมีผลยืนยันทางห้องปฏิบัติการรองรับสรรพคุณ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: จากผลทดสอบทางห้องปฏิบัติการนี้ ควรตรวจหาสารออกฤทธิ์จากสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 สารสกัด เพื่อทดสอบกลไกและยืนยันฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว สำหรับนำข้อมูลไปพัฒนายาตำรับไทยต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ (K-562 CCL-243™), ปอบิต, กัญชา, ชิงโคนา, พิลังกาสา

Stimulatory Effect of Thai Herbal Plant Extracts on Lymphocytes for Destruction of Cultured Chronic Myeloid

Supaporn Suparak^{*,§}, Kanokwan Ngueanchanthong^{*}, Petai Unpol^{*}, Sirilada Pimpa Chisholm^{*},
Siriphailin Jomjunyoung^{*}, Wipawee Thanyacharn^{*}, Pornchai Sincharoenpokai[†],
Archawin Rojanawiwat^{*}, Phichet Banyati[§]

^{*} National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand.

[†] Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand.

[§] Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand.

[¶] Corresponding author: supaporn.su@dmasc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: This research aimed to screen and evaluate the effects of Thai herbal extracts in stimulating white blood cells, specifically lymphocytes, to destroy cultured leukemia cells *in vitro*.

Methods: Herbal extracts were utilized to stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the laboratory for 24 hours. Subsequently, the PBMCs were cultured with K-562 CCL-243™ chronic myelogenous leukemia cell line labeled with the fluorescent dye Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) for 4–6 hours. The K-562 CCL-243™ cell line was then stained with propidium iodide (PI) to identify dead cells, and analyzed using a flow cytometer. The destroyed K-562 CCL-243™ cell line was stained with PI and CFSE, while the viable cells remained stained only with CFSE.

Results: Testing the activity of 17 herbal extracts on PBMCs from donated blood (3 donors) revealed that five herbal extracts could significantly stimulate PBMCs to destroy K-562 CCL-243™ cell line compared to unstimulated control PBMCs. The effective herbal extracts include HID (*pobit*, *Helicteres isora* L. aqueous extract), CSS (*kancha*, *Cannabis sativa* L.), CCF (fresh cinchona, *Cinchona ledgeriana* Moens.), CCD (dried cinchona), and AED 1 (*philangkasa*, *Ardisia elliptica* Thunb.).

Discussion: The laboratory test results revealed the scientific potential of five out of 17 Thai herbal extracts, showcasing their capacity to stimulate PBMCs and effectively eradicate cultured cancer cells (K-562 CCL-243™) *in vitro*. This valuable insight underscores the promising role of Thai medicinal plants in leukemia treatment, as confirmed by these laboratory findings.

Conclusion and Recommendation: Future research endeavors should prioritize the identification of active constituents and mechanisms underlying the actions of the five herbal extracts to substantiate their efficacy in cancer cell destruction. Such endeavors hold promise for advancing Thai medicine and fostering the utilization of Thai medicinal plants in leukemia treatment.

Key words: K-562 CCL-243™ chronic myelogenous leukemia cell line, *Helicteres isora* L., *Cannabis sativa* L., *Cinchona ledgeriana* Moens., *Ardisia elliptica* Thunb.

บทนำและวัตถุประสงค์

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลูคีเมีย (leukemia) เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) ในไขกระดูก ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวในไขกระดูกอย่างผิดปกติเป็นจำนวนมากและไม่สามารถควบคุมได้ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามการดำเนินโรค ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน ที่มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนที่ไม่สามารถเจริญเป็นเม็ดเลือดขาวตัวแก่ปกติได้ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนอย่างรวดเร็วในไขกระดูก ส่งผลให้การสร้างเม็ดเลือดทุกชนิดลดลง ผู้ป่วยจึงมีอาการผิดปกติในระยะเวลาย่นสั้น ส่วนมะเร็งเม็ดเลือดขาวเรื้อรัง (chronic myeloid leukemia cells) มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวอย่างผิดปกติ แต่ยังสามารถเจริญเติบโตเป็นเม็ดเลือดขาวตัวแก่ได้ ทำให้อาการของโรคค่อยเป็นค่อยไป โดยในระยะแรกผู้ป่วยมักไม่มีอาการจนกระทั่งปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดสูงขึ้นมาก จนทำให้อ่อนเพลียหรือโลหิตจาง หรือไปสะสมในม้ามทำให้ม้ามโต ทำให้อึดท้องหรือคลำได้ก้อนในท้อง เป็นต้น สาเหตุที่แท้จริงของมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่ามียปัจจัยต่าง ๆ ที่เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคนี้ ได้แก่ พันธุกรรม สารรังสี สารเคมี ยาเคมีบำบัด ผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่นมาก่อน ประเทศไทยพบโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือลูคีเมีย (Leukemia) ในอัตรา 1 ใน 10 และสามารถพบได้ในทุกเพศทุกวัย^[1-3] ปัจจุบันยังไม่พบสาเหตุที่แน่ชัดของการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว จะใช้เคมีบำบัดร่วมกันหลายชนิด และบางรายอาจมีการฉายรังสีรักษาร่วมด้วยเพื่อช่วยกันกำจัดเซลล์มะเร็งเพื่อ

ให้ไขกระดูกสามารถสร้างเม็ดเลือดปกติขึ้นมา

การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวมักเป็นการผสมผสานของหลายวิธีการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและลดความเสี่ยงของการกลับมาของโรคในอนาคตจะใช้เคมีบำบัดร่วมกันหลายชนิด และบางรายอาจมีการฉายรังสีรักษาร่วมด้วยเพื่อช่วยกันกำจัดเซลล์มะเร็งเพื่อให้ไขกระดูกสามารถสร้างเม็ดเลือดปกติขึ้นมา การรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy) โดยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นแนวทางที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการวิจัยทางการแพทย์ในปัจจุบัน โดยใช้สารสกัดหรือสารเคมีที่มีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เพิ่มการตอบสนองที่เป็นปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวถูกกระตุ้นและเพิ่มการตอบสนองที่ดีขึ้น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีความผิดปกติก็จะถูกทำลายได้โดยมีองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันของร่างกายและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่ทำลายเซลล์มะเร็ง เช่น โมโนไซต์ (monocyte) เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด T cells (T lymphocyte) และ เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด Natural killer cells (NK cells) ที่เป็นส่วนสำคัญของระบบภูมิคุ้มกัน การใช้สารสกัดพืชสมุนไพรในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์เพื่อทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นเรื่องที่น่าสนใจและมีการศึกษาวิจัยมากมาย ผู้วิจัยและคณะจึงเล็งเห็นความสำคัญของการรักษาเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยสารสกัดสมุนไพรไทย จึงคัดกรองสารสกัดสมุนไพรที่เป็นสมุนไพรไทยท้องถิ่นที่มีการใช้ตามภูมิปัญญาชาวบ้านแต่ยังไม่มีการศึกษาทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในระดับห้องปฏิบัติการ

สารสกัดสมุนไพรไทยที่นำมาทดสอบ 17 ชนิด ได้แก่ HID (ปอปัด *Helicteres isora* L.), HSF (แมงลักคาสต *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze), HSD (แมงลักคาสต *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze), CSS (กัญชา *Cannabis sativa* L.), CCF (ชิงโคนาสด *Cinchona ledgeriana* Moens.), CCD (ชิงโคนาแห้ง *Cinchona ledgeriana* Moens.), AED 1 (พิลังกาสา *Ardisia elliptica* Thunb.), ATD 01 (มะหาด *Artocarpus thailandicus* C.C.Berg), TTF (ย่านางสด *Tiliacora triandra* Diels), TTD (ย่านางแห้ง *Tiliacora triandra* Diels), PND (สารสกัดผงนัว), KPF (กระชายดำ สด *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker.), KPD (กระชายดำแห้ง *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker.), Y5RW (สารสกัดตำรับ 5 ราก), RCS (สารสกัดรากกัญชา), PSPW (สารสกัดตำรับประสะเปราะใหญ่ด้วยน้ำ) และ PSPE (สารสกัดตำรับประสะเปราะใหญ่ด้วยเอทานอล) สารสกัดที่น่าสนใจ ได้แก่ กัญชา (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cannabis*, sp.) เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งในวงศ์ *Cannabidaceae*^[4] *Cannabis sativa* มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ต้นกัญชามีลักษณะลำต้นสูง ลักษณะใบจะแยกออกเป็นแฉก ดอกสีเขียว ออกดอกเป็นช่อเล็ก ๆ^[5] กัญชาเป็นพืชยอดนิยมที่ใช้ทั้งในด้านนันทนาการ การแพทย์ทางเลือก และยาวิจัยทางคลินิก^[6]

ชิงโคนา (*Cinchona*) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinchona ledgeriana* Moens. ถิ่นกำเนิดคือเทือกเขาแอนดีส เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ เปลือกเรียบสีน้ำตาล ใบกลมหรือรียาว ออกดอกเป็นช่อ จัดอยู่ในจำพวกไม้ดอก ตระกูล *Rubiaceae* ดอกลักษณะคล้ายเข็ม มีสีขาว ชมพู หรือแดง ผลมีลักษณะเป็นฝักขนาดเล็กซึ่งมีเมล็ดอยู่ข้างใน^[7] ประโยชน์ของต้นชิงโคนาที่รู้จักกัน

ดีคือการนำเปลือกมาใช้ทำยาควินินสำหรับรักษาโรคควินินเป็นสารอัลคาลอยด์หลักในเปลือกต้นชิงโคนาใช้เป็นยาลำหรับรักษาและป้องกันโรคมาลาเรียและรักษาโรคไทรโฟเรียและควินินยังมีฤทธิ์ยับยั้งการบีบตัวของหัวใจและยับยั้งการบีบตัวของมดลูก และปัจจุบันอัลคาลอยด์ชิงโคนากำลังได้รับการพัฒนามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาและเครื่องสำอางได้ เป็นยาต้านมะเร็ง, สารต้านอนุมูลอิสระ, ต้านเบาหวาน, เสริมความงาม และ ยาด้านจุลชีพ^[8]

พิลังกาสา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia elliptica* Thunb หรือที่คนไทยรู้จักในชื่อ รามใหญ่ หรือ บิลุงกาศา เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ *Myrsinaceae* เป็นไม้พุ่มกึ่งเล็ก ๆ มีใบเรียบและเป็นหนังและมีดอกสีม่วงอ่อน ผลมีลักษณะกลม มีลักษณะคล้ายผลเบอร์รี่ เปลี่ยนจากสีแดงและสีม่วงเข้มเป็นสีดำเมื่อสุก ผลไม้สามารถรับประทานได้และมีรสฝาดเล็กน้อย พลังกาสาพบได้ทั่วไปในประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้^[9] มีรายงานพิลังกาสาใช้เพื่อบรรเทาอาการเจ็บหน้าอก รักษาไข้ ท้องร่วง และภาวะแทรกซ้อนในการคลอดบุตร^[10]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรไทยกระตุ้นเม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ K-562 CCL-243TM ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเป้าหมายของระบบภูมิคุ้มกันเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด natural killer cells (NK cells)^[11-12] ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยสำหรับใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือใช้ควบคู่ไปกับการรักษามะเร็งด้วยการแพทย์แผนปัจจุบัน เพื่อเพิ่มโอกาสในการรักษามะเร็ง

เม็ดเลือดขาวให้ประสบผลสำเร็จดีมากขึ้น

ระเบียบวิธีศึกษา

วิธีการศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดสมุนไพร

เตรียมสารสกัดสมุนไพร จำนวน 17 ชนิด ได้แก่ HID (โปบิต *Helicteres isora* L.), HSF (แมงลักคาสด *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze), HSD (แมงลักคาคั่ว *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze), CSS (กัญชา *Cannabis sativa* L.), CCF (ชิงโคนาสด *Cinchona ledgeriana* Moens.), CCD (ชิงโคนาแห้ง *Cinchona ledgeriana* Moens.), AED 1 (พิลังกาสอ *Ardisia elliptica* Thunb.), ATD 01 (มะหาด *Artocarpus thailandicus* C.C.Berg), TTF (ย่านางสด *Tiliacora triandra* Diels), TTD (ย่านางแห้ง *Tiliacora triandra* Diels), PND (สารสกัดผงนัว), KPF (กระชายดำสด *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker.), KPD (กระชายดำแห้ง *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker.), Y5RW (สารสกัดตำรับ 5 ราก), RCS (สารสกัดรากกัญชา), PSPW (สารสกัดตำรับประสะเปราะใหญ่ด้วยน้ำ) และ PSPE (สารสกัดตำรับประสะเปราะใหญ่ด้วยเอทานอล) ตัวทำละลายที่เหมาะสมเอกลักษณ์ทางสมุนไพร แสดงใน (Table 1)

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรรายละเอียดดังนี้

1.1.1 สารสกัดสมุนไพรสดด้วยน้ำกลั่น

นำสมุนไพรมาปั่นให้ละเอียดด้วยน้ำกลั่น คั้นเอาน้ำสมุนไพรแล้วกรอง จากนั้นทำการกลั่นระเหยสุญญากาศ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดสมุนไพรในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ก่อนการทดสอบ

1.1.2 สารสกัดสมุนไพรแห้งด้วยน้ำกลั่น

นำสมุนไพรสดมาล้าง ตากให้แห้ง และอบที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเป็นผงสมุนไพร สกัดโดยวิธีการ reflux ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรอง จากนั้นทำการกลั่นระเหยสุญญากาศ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดสมุนไพรในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ

1.1.3 สารสกัดด้วย 95% เอทานอล

นำสมุนไพรสดมาล้าง ตากให้แห้ง และอบที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเป็นผงสมุนไพร สกัดด้วย 95% เอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction แล้วกรอง จากนั้นทำการกลั่นระเหยสุญญากาศ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดสมุนไพรในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ

1.1.4 การเตรียมสารสกัดด้วย 50% เอทานอล

นำผงสมุนไพรตำรับยาประสะเปราะใหญ่ สกัดด้วย 50% เอทานอล โดยวิธี Maceration แล้วกรอง จากนั้นทำการกลั่นระเหยสุญญากาศ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดสมุนไพรในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ

1.2 ขั้นตอนการละลายสารสกัดสมุนไพรสำหรับการทดสอบ

นำสารสกัดสมุนไพรมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมให้ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 10 mg/ml และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อโรค จากนั้นนำมาเจือจางด้วย complete RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่ผสมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS; Grand Island Biologi-

cal Company, Grand Island, NY, USA) ที่มียาปฏิชีวนะ penicilline และ streptomycin เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อราในชั้น

ตอนการทดสอบ ขณะเพาะเลี้ยงเซลล์และ ให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้ 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$

Table 1 List and details of herbal extracts

Herbal extract	Solvent	Scientific name	Voucher specimen	Phenolic (mg/g)	Major compounds
HID (ปอบิด)	Distilled water	<i>Helicteres isora</i> L.	DMSC 5270		Rosemarinic acid = 0.29%
HSF (แมงลักคาสด)	Distilled water	<i>Mesospaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze	DMSC 5291	134.16	
HSD (แมงลักคั่วแห้ง)	Distilled water			128.24	
CCF (ชิงโคนาสด)	Distilled water	<i>Cinchona ledgeriana</i> Moens.	DMSC 5312	280.52	
CCD (ชิงโคนาแห้ง)	Distilled water			267.16	
ATD 01 (มะหาด)	Distilled water	<i>Artocarpus thailandicus</i> C.C.Berg	DMSC 5237		Oxyresveratol = 70%
TTF (ย่านางสด)	Distilled water	<i>Tiliacora triandra</i> Diels	DMSC 5240	116.37	
TTD (ย่านางแห้ง)	Distilled water			48.07	
PND (สารสกัดผงนัว)	Distilled water				Tannin = 11.46%
KPF (กระชายดำคาสด)	Distilled water	<i>Kaempferia parviflora</i> Wallich. ex Baker	DMSC 5285	37.91	
KPD (กระชายดำคั่วแห้ง)	Distilled water			37.48	
RCS (สารสกัดรากกัญชา)	Distilled water	<i>Cannabis sativa</i> L.	DMSC 5272		Friedelin = 0.70 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$
CSS (กัญชา)	95% ethanol	<i>Cannabis sativa</i> L.	DMSC 5272		THC = 3.49% CBD = 2.89%
AED 1 (พิลังกาสา)	95% ethanol	<i>Ardisia elliptica</i> Thunb	DMSC 5318		Emberlin = 2.04%
Y5RW (สารสกัดตำรับ 5 ราก)	Distilled water			5.47	
PSPW (สารสกัดตำรับ ประสะเปราะใหญ่)	Distilled water			14.63	
PSPE (สารสกัดตำรับ ประสะเปราะใหญ่)	50% ethanol			23.26	

1.3 ตัวอย่างเลือดสำหรับทดสอบ

ตัวอย่างเลือดชนิด leukocyte-enriched buffy coats ที่เหลือใช้และรอการทำลายซึ่งไม่เปิดเผยตัวตนเจ้าของข้อมูลก็นำมาศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 3 ราย ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่าง

เลือดนี้ไม่มีข้อมูลที่สามารถสืบเสาะถึงตัวบุคคลผู้เป็นเจ้าของข้อมูลได้และตัวอย่างเลือดเหลือใช้ไม่ได้ก่อประโยชน์เชิงวิชาการโดยไม่ได้แสวงหาผลกำไรใด ๆ และเข้าข่ายยกเว้นการขออนุมัติด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จึงได้รับการละเว้นการขอจริยธรรมในการวิจัย

นำตัวอย่างเลือดมาตรวจการติดเชื้อ Hepatitis B virus, Hepatitis C virus และ HIV virus และคัดแยก Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรต่อไป

1.4 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเซเลียชนิด K-562 CCL-243TM

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K-562 CCL-243TM (human chronic myeloid leukemia) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (GIBCO BRL, Paisley, UK) ที่มีส่วนผสมของ HEPES ความเข้มข้น 10 mM, L-glutamine ความเข้มข้น 1 mM, penicillin ความเข้มข้น 100 U/ml, streptomycin ความเข้มข้น 100 µg/ และ fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10

1.5 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย 1) เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร คือ เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ และเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยสมาคมเวชกรรมไทย และห้องปฏิบัติการฟิสิกส์พันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร

2) เครื่องมือที่ใช้ในการวัด การทำลาย เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243TM คือ Guava[®] easyCyte Flow Cytometers (Millipore Corp, Hayward, CA, USA)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การคัดแยกเม็ดเลือดขาว Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) จากตัวอย่างเลือด leukocyte-enriched Buffy coats

นำ leukocyte-enriched buffy coats มาเติม IsoPrep (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) ปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs ที่ความเร็ว 1,800 xg เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูด

เก็บเซลล์ PBMCs แล้วปั่นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ที่ความเร็ว 300 xg นับปริมาณ PBMCs และปรับความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด complete RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่ผสมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS; Grand Island Biological Company, Grand Island, NY, USA) ให้ได้ PBMCs ความเข้มข้น 1×10^6 cells/ml สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพร

2.2 การเตรียมและติดตามเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเซเลีย K-562 CCL-243TM

นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเซเลีย K-562 CCL-243TM บ่มเลี้ยงที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มานับจำนวนให้ได้ 1×10^6 cells/ml และติดตามด้วยสารเรืองแสง Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 20 นาที

2.3 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาเซเลีย K-562 CCL-243TM

2.3.1 นำ PBMCs ความเข้มข้น 1×10^6 cells/ml (จากข้อ 2.1) มากระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml แล้วนำ PBMCs ไปบ่มที่ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาปั่นแยก PBMCs ที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm 10 นาที

2.3.2 นำ PBMCs มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์

มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243™ ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง CFSE แล้ว ในอัตราส่วน K-562 CCL-243™ ต่อ PBMCs เท่ากับ 1:90 นำไปบ่มเพาะเลี้ยง ที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

2.3.3 ครบเวลานำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243™ ที่ได้มาย้อมเซลล์ตายด้วยสารเรืองแสง Propidium iodide, PI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) และตรวจวัดโดยเครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometers (Millipore Corp, Hayward, CA, USA) โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243™ เป้าหมายที่ถูกทำลายตายจะย้อมติดสีสารเรืองแสง PI และ CFSE (แสดงในภาพผลทดสอบช่อง Upper Right, UR) ส่วนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูกทำลายจะติดสี CFSE เท่านั้น (แสดงในภาพผลทดสอบช่อง Lower Right, LR)

ควบคุมผลการทดสอบ โดย negative control คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่ถูกกระตุ้นใดๆ และ positive control คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs ที่กระตุ้นด้วย phytohemagglutinin (PHA)

2.4 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลผลทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ มาเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ PBMCs ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร วิเคราะห์ความแตกต่างและคำนวณทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic Package for the Social Sciences (SPSS) โดยใช้สถิติ paired *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.005$) โดยข้อมูล

ทุกค่าผลการทดสอบแสดงในรูป Mean $\pm$ S.D.

ผลการศึกษา

ผลทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรกระตุ้นเม็ดเลือดขาว PBMCs ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ ในหลอดทดลอง ได้ทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ ทั้งหมด สารสกัดสมุนไพร 17 สารสกัด Table 2 แสดงผลทดสอบสารสกัดสมุนไพรทั้ง 17 สารสกัด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับสภาวะควบคุม (control) คือเซลล์ PBMCs ควบคุมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร ผลทดสอบพบว่า สารสกัดสมุนไพร 5 สารสกัด ได้แก่ สารสกัดสมุนไพร HID (ปอบิด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Helicteres isora* L. สารสกัดน้ำ) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$, CSS (กัญชา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cannabis sativa* L.) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$, CCF (ชิงโคนาสด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinchona ledgeriana* Moens.) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$, CCD (ชิงโคนาแห้ง) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$, และ AED 1 (พลิงกาสา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia elliptica* Thunb.) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาว PBMCs ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ cells ในหลอดทดลอง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (paired *t*-test, $p < 0.005$) เมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs ในสภาวะควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร

Table 2 Percentages of K-562 CCL-243™ cells killed upon stimulation with herbal extracts.

Herbal extracts	% K-562 CCL-243™ cells killed (Mean ± S.D.)			
	Control	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
HID	23.78 ± 3.69	29.59 ± 8.71	38.23 ± 5.30*	41.53 ± 6.84*
HSF (fresh)	23.78 ± 3.69	28.19 ± 9.70	33.65 ± 9.86	40.18 ± 5.00
HSD (dried)	23.78 ± 3.69	28.53 ± 8.41	33.45 ± 9.81	44.47 ± 6.81
CCF (fresh)	24.75 ± 2.13	33.95 ± 5.14*	38.67 ± 6.34*	43.97 ± 10.29
CCD (dried)	24.75 ± 2.13	30.45 ± 4.18	37.08 ± 4.97*	43.20 ± 8.01*
ATD 01	28.10 ± 5.52	34.68 ± 5.83	35.31 ± 5.02	34.40 ± 2.06
TTF (fresh)	34.24 ± 5.74	36.98 ± 5.91	36.45 ± 1.87	38.32 ± 2.61
TTD (dried)	34.24 ± 5.74	37.73 ± 6.39	35.86 ± 3.83	35.62 ± 1.74
KPF (fresh)	34.24 ± 5.74	30.71 ± 7.24	32.49 ± 3.10	35.91 ± 2.44
KPD (dried)	34.24 ± 5.74	35.96 ± 5.81	37.11 ± 5.59	37.88 ± 9.77
PND	34.24 ± 5.74	34.05 ± 0.87	34.32 ± 3.40	34.34 ± 2.60
Y5RW	34.24 ± 5.74	39.64 ± 7.03	38.12 ± 2.74	35.81 ± 3.83
CSS	23.78 ± 3.69	34.94 ± 7.50*	46.85 ± 8.81*	39.33 ± 7.73*
RCS	34.24 ± 5.74	39.00 ± 8.13	36.51 ± 2.84	36.38 ± 4.25
PSPW	34.24 ± 5.74	36.58 ± 5.62	36.17 ± 4.19	34.46 ± 2.11
PSPE	34.24 ± 5.74	37.10 ± 4.540	34.46 ± 4.88	33.97 ± 3.80
AED 1	28.10 ± 5.52	38.03 ± 1.94*	25.86 ± 5.28	36.49 ± 9.24

*Statistically significant at level $p < 0.05$; Paired t -test

Remark: Experiments were conducted using PBMC samples from three donors in triplicate, and the results are expressed as the Mean ± Standard Deviation.

สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นเม็ดเลือดขาว PBMCs ให้ทำลายเป้าหมายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™

Table 3 แสดงผลทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพร HID (โปปิต ชื่อวิทยาศาสตร์ *Helicteres isora* L. สารสกัดน้ำ), CSS (กัญชา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cannabis sativa* L.), CCF (ชิงโคนาสด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinchona ledgeriana* Moens.), CCD (ชิงโคนาแห้ง) และ AED 1 (ฟิลังกาสา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia elliptica* Thunb.) กระตุ้นเม็ดเลือดขาว PBMCs จากอาสาสมัครแต่ละราย จำนวน 3 ราย ให้ทำลายเซลล์

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ ได้

Figure 1 แสดงผลการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ จาก PBMCs อาสาสมัครรายที่ 1 ทดสอบกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร พบว่ากระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร HID (โปปิต ชื่อวิทยาศาสตร์ *Helicteres isora* L. สารสกัดน้ำ) ทำลายเซลล์ K-562 CCL-243™ ได้ 34.63%, สารสกัด CSS (กัญชา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cannabis sativa* L.) ทำลายได้ 33.77%, สารสกัด CCF (ชิงโคนาสด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinchona ledgeriana* Moens.) ทำลายได้ 31.85%, สารสกัด CCD (ชิงโคนา

แห้ง) 37.22% และ สารสกัด AED 1 (พื้งกาสา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia elliptica* Thunb.) ทำลายได้ 35.06%

ทั้งนี้ ความคุมการทดสอบโดย negative control คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ ร่วมกับ PBMCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร พบการตาย

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง 24.37% และ positive control คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ ร่วมกับ PBMCs และถูกกระตุ้นด้วย phytohaemagglutinin (PHA) พบเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ ถูกทำลาย 48.55% และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K-562 CCL-243™ กลุ่มควบคุม พบการตาย 13.38%

Table 3 Percentages of K-562 CCL-243™ cells killed upon stimulation with herbal extracts in three donors' PBMCs.

Herbal extracts		% K-562 CCL-243™ cells killed			
		Control	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
HID	Donor 1	24.31	26.64	32.69	35.03
	Donor 2	19.86	22.73	38.75	40.89
	Donor 3	27.18	39.39	43.26	48.66
	Mean ± S.D.	23.78 ± 3.69	29.59 ± 8.71	38.23 ± 5.30*	41.53 ± 6.84*
	p-value	NA	0.212	0.044*	0.037*
CSS	Donor 1	24.31	32.63	44.87	33.99
	Donor 2	19.86	28.87	39.20	35.81
	Donor 3	27.18	43.33	56.49	48.20
	Mean ± S.D.	23.78 ± 3.69	34.94 ± 7.50*	46.85 ± 8.81*	39.33 ± 7.73*
	p-value	NA	0.047*	0.018*	0.042*
CCF (fresh)	Donor 1	23.97	29.76	33.87	37.65
	Donor 2	27.16	39.68	45.87	55.85
	Donor 3	23.12	32.41	36.28	38.42
	Mean ± S.D.	24.75 ± 2.13	33.95 ± 5.14*	38.67 ± 6.34*	43.97 ± 10.29
	p-value	NA	0.042*	0.032*	0.056
CCD (dried)	Donor 1	23.97	25.64	32.04	40.56
	Donor 2	27.16	33.19	41.98	52.20
	Donor 3	23.12	32.52	37.22	36.84
	Mean ± S.D.	24.75 ± 2.13	30.45 ± 4.18	37.08 ± 4.97*	43.20 ± 8.01*
	p-value	NA	0.126	0.029*	0.032*
AED 1	Donor 1	34.04	39.68	31.95	29.32
	Donor 2	27.16	38.52	22.54	33.23
	Donor 3	23.12	35.90	23.09	46.91
	Mean ± S.D.	28.10 ± 5.52	38.03 ± 1.94*	25.86 ± 5.28	36.49 ± 9.24
	p-value	NA	0.045*	0.233	0.419

* Statistically significant at level $p < 0.05$; Paired t -test

Remark: All experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as the mean. NA: Not Applicable.

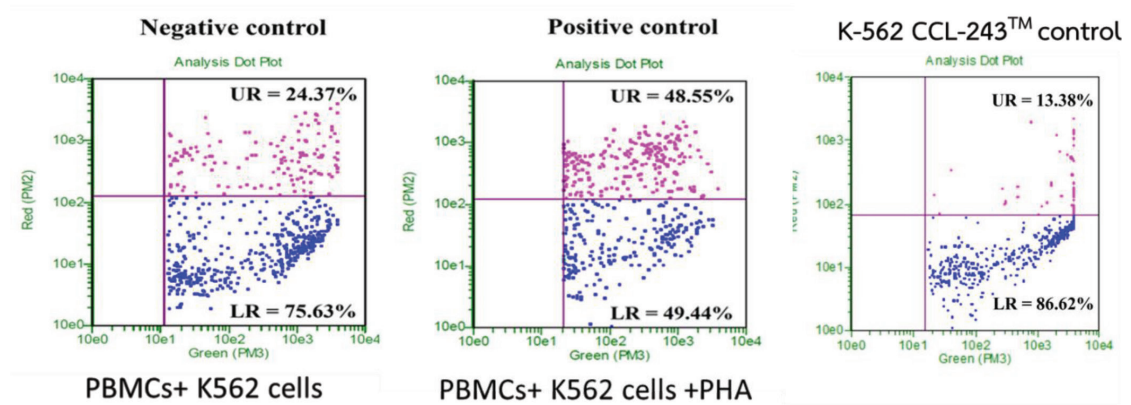
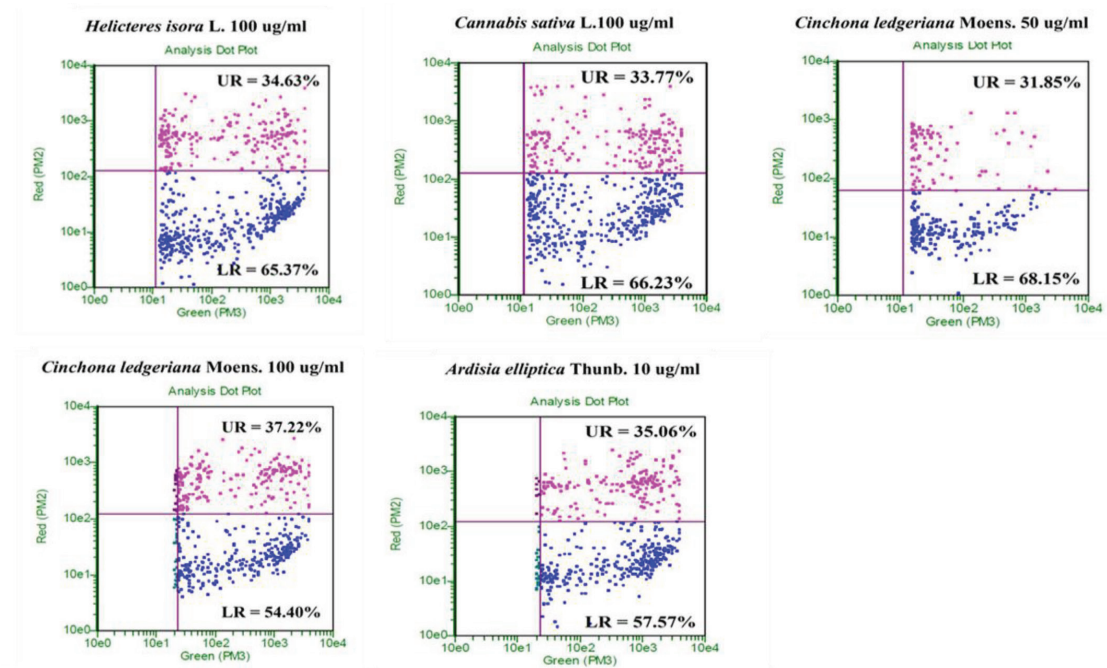
(A) The culture of K562 leukemia cell and controls**(B)** The culture of K562 leukemia cells treated with herbal extracts

Figure 1 Results illustrating the destruction of cultured leukemia cells (K-562 CCL-243TM) following stimulation with herbal extracts measured by a CFSE-based flow cytometry assay.

(A) The experiment includes both a negative control, where K-562 leukemia cells are cultured in cell culture medium without stimulation, and a positive control, where K-562 leukemia cells are cultured with PBMCs stimulated with Phytohaemagglutinin (PHA). K-562 CCL-243TM control were also shown.

(B) The death of cultured leukemia cells (K-562 CCL-243TM) following stimulation with herbal extracts. The dead K-562 CCL-243TM target cells were identified in the Upper right (UR) quadrant, CFSE-positive and PI-positive. The live K-562 CCL-243TM target cells were identified as CFSE-positive and PI-negative, Lower right (LR). Only the CFSE-positive cells were gated, as shown by no plotted cells in the Lower left and Upper left quadrant. The data presented are from donor 1 out of 3 independent experiments.

อภิปรายผล

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อช่วยป้องกันหรือควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหรือยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการวิจัยทางการแพทย์ในปัจจุบัน การศึกษานี้ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ สายพันธุ์ชนิด K-562 CCL-243TM การวิจัยครั้งนี้ยืนยันสรรพคุณฤทธิ์สมุนไพรไทย สารสกัดสมุนไพรอบิด สารสกัดกัญชา สารสกัดชิงโคนาสด สารสกัดชิงโคนาแห้ง และ สารสกัดพิลังกาส่า สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243TM ในระดับหลอดทดลอง

สารสกัดสมุนไพรอบิด HID (ปอบิด *Helicteres isora* L.) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยและคณะพบว่า สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยท์ได้ในหลอดทดลอง^[13] ดังนั้นสารสำคัญ Rosemarinic acid จึงควรนำมาทดสอบวิจัยกลไกการออกฤทธิ์เพื่อพัฒนาได้ต่อไป จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดกัญชาที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และจากรายงานศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การเตรียมและสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำในตัวกลางที่เป็นน้ำโดยใช้สารสกัดจากใบกัญชา *Cannabis sativa* L. สามารถต่อต้านมะเร็งเม็ดเลือดชนิดเฉียบพลันและต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด lymphoblastic อีกทั้งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้^[14] สารสกัดแคนนาบีไดออล (CBD) ออกฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ K-562 CCL-243TM ในหลอดทดลองได้

โดยมีการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ K-562 CCL-243TM ในหลอดทดลอง^[15] และมีประสิทธิผลในการรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอนฮอดจ์กิน และฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง^[16-17] ดังนั้นจึงควรศึกษาวิจัยกลไกและขนาดที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ เพื่อเป็นข้อมูลก่อนการศึกษาวิจัยทางคลินิกที่ปลอดภัยได้ต่อไป ผลการศึกษาค้นนี้พบว่า สารสกัดชิงโคนาทั้งสดและแห้ง มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ มีรายงานการศึกษาสารอัลคาลอยด์ควินิน มีคุณสมบัติออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบิน ในโรคธาลัสซีเมีย^[18] และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ รวมทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว^[19]

ผลทดสอบครั้งนี้พบสารสกัดพิลังกาส่ามีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมีรายงานฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม^[20] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านอาการท้องเสีย^[21] และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและสารต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดเมธานอลจากใบและผลของพิลังกาส่า^[22] นอกจากนี้ยังมีรายงานในการต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งตับของสารสกัดจากชาจากใบของพิลังกาส่า หกสายพันธุ์^[23] และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้^[24] จึงควรทดสอบหาสารสำคัญต่อไป

การวิจัยครั้งนี้นอกจากจะเพิ่มองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์แล้ว ยังมีบทบาทสำคัญต่อการตรวจยืนยันสรรพคุณของสมุนไพรต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สารสำคัญจากสมุนไพรแต่ละชนิดจึงควรทดสอบยืนยันกลไกการออกฤทธิ์และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและปลอดภัย เพื่อนำไปสู่การพัฒนาในการผลิตเป็นยาในการดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ

ภาพเสริมสร้างสุขภาพได้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไป

ข้อสรุป

การวิจัยครั้งนี้ยืนยันสรรพคุณฤทธิ์สมุนไพรรไทย สารสกัดสมุนไพรรอบิด สารสกัดกัญชา สารสกัดชิงโคนาสด สารสกัดชิงโคนาแห้ง และ สารสกัดพิลังกาส่า สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซต์ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243TMในระดับหลอดทดลองในห้องปฏิบัติการ ทำให้เพิ่มองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และสามารถพัฒนาศึกษาสารสำคัญและกลไกการออกฤทธิ์ต่อยอดนำไปสู่การพัฒนาศักยภาพในการผลิตสมุนไพรรไทยเป็นยาสำหรับดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มจำนวนอาสาสมัครและทดสอบกระตุ้นเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของผลทดสอบต่อไป
2. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 CCL-243TM เป็นเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่ถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด natural killer cell (NK cell) ดังนั้นจึงควรแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิด NK cells และนำมาทดสอบกระตุ้นยืนยันฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรรไทย เพื่อการพัฒนาเพาะเลี้ยง NK cells ในหลอดทดลองให้สามารถนำไปรักษาและกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งอื่น ๆ ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินงบประมาณ

จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณนายไกรสิทธิ์ ลิ้มประเสริฐ นายกสมาคมเวชกรรมไทย ในการจัดเตรียมยาตำรับห้าารากและยาตำรับประสะเปราะใหญ่ นายศักดิ์วิชัย อ่อนทอง ห้องปฏิบัติการฟิสิคัลเคมีพีช สถาบันวิจัยสมุนไพรรไทย ในการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชสมุนไพรรไทยในการวิจัย

References

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1136-52.
2. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. N Engl J Med. 2015;373(16):1541-52.
3. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. Am J Hematol. 2014;89(5):547-56.
4. Cervantes J. Indoor marijuana horticulture: the medical, legal, cultivation encyclopedia for 2001 and beyond: United States of America: The Author; 2002 [cited 2024 Aug 1]. Available from: <https://archive.org/details/indoormarijuanah0000cerv/page/364/mode/2up>
5. Guy GW, Whittle BA, Robson P. The medicinal uses of cannabis and cannabinoids. London, UK: Pharmaceutical Press; 2004.
6. Stasiłowicz A, Tomala A, Podolak I, Cielecka-Piontek J. *Cannabis sativa* L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. International journal of molecular sciences. 2021;22(2):778.
7. Jemma. Cinchona and treating malaria. Herbology Manchester [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan 2]. Available from: <https://herbologymanchester.wordpress.com/2015/05/27/cinchona-and-treating-malaria/>.
8. Hariyanti H, Mauludin R, Sumirtapura YC, Kurniati NF. A Review: Pharmacological activities of Quinoline Alkaloid of *Cinchona* sp. 2022.
9. Lim TK. Edible medicinal and non-medicinal plants: Springer; 2012.
10. Alias NZ, Kamisah N, Ishak M, editors. Chemical constituents and bioactivity studies of *Ardisia elliptica*. The Open Conference Proceedings Journal; 2014.
11. Abrams S, Brahmi Z, editors. Mechanism of K562-induced human natural killer cell inactivation using highly enriched effector cells isolated via a new single-step

- sheep erythrocyte rosette assay. *Annales de l'Institut Pasteur/Immunologie*; 1988: Elsevier.
12. Abrams S, Brahmi Z. Target cell directed NK inactivation. Concomitant loss of NK and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950). 1988;140(6):2090-5.
 13. Suparak S, Ngueanchanthong K, Unpol P, Pimpa Chisholm S, Jomjunyoung S, Thanyacharn W, Sinchaoenpokai P, Rojanawiwat A, Wongsinkongman P, Banyati P. Screening for determination of immunomodulatory activities of medicinal plants using lymphocyte proliferation assay. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*. 2023;21(1):119-30. (in Thai).
 14. Chang Y, Zheng C, Chinnathambi A, Alahmadi TA, Alharbi SA. Cytotoxicity, anti-acute leukemia, and antioxidant properties of gold nanoparticles green-synthesized using *Cannabis sativa* L leaf aqueous extract. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(4):103060.
 15. Anceschi L, Codeluppi A, Brighenti V, Tassinari R, Taglioli V, Marchetti L, Roncati L, Alessandrini A, Corsi L, Pellati F. Chemical characterization of non-psychoactive *Cannabis sativa* L. extracts, *in vitro* antiproliferative activity and induction of apoptosis in chronic myelogenous leukaemia cancer cells. *Phytotherapy Research*. 2022;36(2):914-27.
 16. Lal S, Shekher A, Narula AS, Abrahamse H, Gupta SC. Cannabis and its constituents for cancer: History, biogenesis, chemistry and pharmacological activities. *Pharmacological Research*. 2021;163:105302.
 17. Peeri H, Koltai H. Cannabis biomolecule effects on cancer cells and cancer stem cells: Cytotoxic, anti-proliferative, and anti-migratory activities. *Biomolecules*. 2022;12(4):491.
 18. Zuccato C, Cosenza L, Carmela Zurlo M, Lampronti I, Borgatti M, Scapoli C, Gambari R, Finotti A. Treatment of erythroid precursor cells from β -thalassemia patients with cinchona alkaloids: induction of fetal hemoglobin production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(24):13433.
 19. Cheng G-G, Cai X-H, Zhang B-H, Li Y, Gu J, Bao M-F, Liu Y-P, Luo X-D. Cinchona alkaloids from *Cinchona succirubra* and *Cinchona ledgeriana*. *Planta medica*. 2014;80(02/03):223-30.
 20. Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia*. 2004;75(3):375-7.
 21. Dey SK, Hira A, Howlader MSI, Ahmed A, Hossain H, Jahan IA. Antioxidant and antidiarrheal activities of ethanol extract of *Ardisia elliptica* fruits. *Pharmaceutical biology*. 2014;52(2):213-20.
 22. Al-Abd NM, Nor ZM, Mansor M, Zajmi A, Hasan MS, Azhar F, Kassim M. Phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ardisia elliptica*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2017;7(6):569-76.
 23. Newell AM, Yousef GG, Lila MA, Ramírez-Mares MV, de Mejia EG. Comparative *in vitro* bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;130(3):536-44.
 24. Ondee S, Sithisarn P, Mangmool S, Rojsanga P. Chemical standardization and anti-proliferative activity of *Ardisia elliptica* fruit against the HCT116 human colon cancer cell line. *Molecules*. 2020;25(5):1023.