

## การศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดกัญชาต่อการยับยั้งก้อนมะเร็งตับ ที่ปลูกถ่ายในหนูชนิดไมซ์

รัชชรส อินคำลือ<sup>\*§</sup>, ภัทรธิตาพร มุ่งเครือ<sup>\*</sup>, พรชัย สินเจริญโกไคย<sup>†</sup>, เสกขตกร บัวเบา<sup>‡</sup>,  
มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์<sup>\*</sup>, อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์<sup>\*</sup>, พิเชฐ บัญญัติ<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

<sup>†</sup>สถาบันสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

<sup>‡</sup>กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

<sup>§</sup>ผู้รับผิดชอบบทความ: ruchuros.i@dmasc.mail.go.th

### บทคัดย่อ

**บทนำและวัตถุประสงค์:** โรคมะเร็งตับถือเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในอันดับต้น ๆ ของคนไทย ซึ่งการใช้สารสกัดกัญชาในการรักษามะเร็งตับถือเป็นประเด็นที่น่าสนใจกันแพร่หลาย และยังคงต้องการข้อมูลด้านประสิทธิผลรวมทั้งผลข้างเคียงในการรักษา

**วิธีการศึกษา:** ทำการเหนี่ยวนำหนูชนิดไมซ์สายพันธุ์ BALB/c ด้วยการฉีดเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ความเข้มข้น  $10 \times 10^6$  cell/100  $\mu$ l ขึ้นใต้ผิวหนัง บริเวณสะโพก และป้อนสารสกัดใบกัญชาตะนาวศรีก้านแดง (CSRDI) ในขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 24 วัน แล้วทำการตรวจติดตามวัดขนาดก้อนมะเร็งด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์สัญญาณเรืองแสงในตัวสัตว์ทดลอง (*In vivo* imaging)

**ผลการศึกษา:** สารสกัดใบกัญชา CSRDI ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ด้วยการป้อนผ่านทางปากเป็นระยะเวลา 24 วัน พบฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีก้อนมะเร็งแต่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-Fluorouracil (5-FU) หรือสารสกัดใบกัญชา CSRDI ด้วยการติดตามการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งที่วัดได้จากภายนอกด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยการถ่ายภาพและวิเคราะห์สัญญาณเรืองแสงในตัวสัตว์ทดลอง (*In vivo* imaging)

**อภิปรายผล:** การให้สารสกัดใบกัญชา CSRDI มีผลลดขนาดก้อนมะเร็งตับที่ปลูกถ่ายในหนู ซึ่งอาจมีผลจากการทำงานผ่านตัวรับ Cannabinoid receptor 1 (CB1 receptor) ภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดกลไกการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง การยึดเกาะของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการแบ่งตัว หรือกระตุ้นให้เกิดตายของเซลล์มะเร็ง ผลการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดสอบ เนื่องจากพยาธิสภาพของมะเร็งเกิดภาวะพร่องออกซิเจน ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงด้วยเทคนิคดังกล่าว

**ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ:** สารสกัดใบกัญชา CSRDI มีผลต่อการลดขนาดของก้อนมะเร็งตับในหนูชนิดไมซ์

ได้ ซึ่งควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของฤทธิ์ที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อพัฒนาต่อยอดและยืนยันประสิทธิภาพของการยับยั้งมะเร็งตับสำหรับใช้เป็นแนวทางการใช้กัญชาทางการแพทย์ต่อไป

**คำสำคัญ:** สารสกัดใบกัญชา, สารสกัดใบกัญชา CSRD1, มะเร็งตับ, หนูถีรูด

## Antitumor Activity of *Cannabis sativa* L. Extract on Liver Cancer in Nude Mice Xenograft Model

Ruchuros Inkomlue<sup>\*,§</sup>, Pattidapron Moongkhru<sup>\*</sup>, Pornchai Sincharoenpokai<sup>†</sup>,  
Sekrachatakorn Buaboa<sup>†</sup>, Maskiet Boonyareth<sup>\*</sup>, Archawin Rojanawiwat<sup>\*</sup>, Phichet Banyati<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

<sup>†</sup>Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

<sup>‡</sup>Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

<sup>§</sup>**Corresponding author:** ruchuros.i@dmsc.mail.go.th

### Abstract

**Introduction and Objective:** The most common cancer among Thai people is liver cancer. The use of cannabis botanicals for liver cancer therapies has generated widespread interest. Concerns about efficacy and side effects need to be further investigated.

**Methods:** Liver cancer (HepG2 cell line) was induced in BALB/c nude mice by subcutaneously injecting  $10 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ l into the flank and Tanaosri Kan Daeng cannabis leaf extract (CSRD1) was fed to mice at doses of 1, 5, and 10 mg/kg/day for 24 days. Tumor growth was monitored by measuring with a vernier caliper and *in vivo* imaging technique.

**Results:** The study's findings demonstrated a significant reduction in the liver tumor size measured by vernier caliper in the nude mice xenograft model when 10 mg/kg/day of CSRD1 extract was given orally. However, no significant differences were found between the test groups compared to the control group by imaging and analyzing fluorescent signals in experimental animals (*in vivo* imaging).

**Discussion:** CSRD1 extract demonstrated a significant reduction in xenograft liver tumor size may be due to the effect of CB1 receptor on intracellular signaling pathways, which inhibits cancer cell migration, cell adhesion, cell proliferation and activates apoptosis. No significant differences were found in fluorescent signals analyzed using *in vivo* imaging technique due to the limitation of this method caused by tumor hypoxia.

**Conclusion and Recommendation:** CSRD1 extract has shown potential in reducing the size of liver tumors in nude mice xenograft models. Further study is required to investigate its inhibitory effects on metastatic cancer cells. This study could be beneficial in exploring the potential medical applications of cannabis extracts.

**Key words:** cannabis extract, CSRD extract, liver cancer, BALB/c nude mice

## บทนำและวัตถุประสงค์

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลก จากข้อมูลสถิติมะเร็งทั่วโลกในปี พ.ศ. 2563 ได้รายงานว่ามีมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 4 เมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดต่าง ๆ<sup>[1]</sup> ซึ่งทางสถาบันมะเร็งแห่งชาติของประเทศไทย พบว่ามีมะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับ 1 ที่เกิดขึ้นในเพศชาย<sup>[2]</sup> และยังเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของประเทศไทยติดต่อกันหลายปี แนวทางการรักษามะเร็ง มีทั้งการผ่าตัด ฉายรังสี และการใช้เคมีบำบัด อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการรักษาในรูปแบบต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง ทั้งการเลือกใช้เซลล์ภูมิคุ้มกัน การพัฒนายาใหม่ รวมทั้งการพัฒนาสมุนไพรเพื่อบำบัดรักษามะเร็ง โดยแนวทางการรักษามะเร็งนั้น แพทย์ทำการประเมินตามระยะของมะเร็ง พร้อมทั้งพิจารณาการรักษาด้วยวิธีเดียว หรือหลายวิธีร่วมกันได้<sup>[3]</sup> ทั้งนี้ในต่างประเทศมีข้อมูลการใช้สารสกัดกัญชาในผู้ป่วยมะเร็งร่วมกับการใช้เคมีบำบัด เพื่อช่วยลดอาการนอนไม่หลับ คลื่นไส้ อาเจียน รวมถึงความอยากอาหาร ซึ่งเป็นผลข้างเคียงจากการใช้เคมีบำบัด<sup>[4]</sup> จึงทำให้มีการศึกษาสารสกัดกัญชาอย่างแพร่หลาย ทั้งในส่วนของความปลอดภัยและผลข้างเคียงที่มีผลต่อผู้ป่วยมะเร็ง<sup>[5]</sup> ทั้งนี้ยังมีข้อมูลของการศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดกัญชาที่มีผลต่อมะเร็งชนิดต่าง ๆ ซึ่งพบว่าสารสกัดกัญชามีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (tumor cell proliferation) รวมถึงการตายของเซลล์มะเร็ง (tumor cell apoptosis) โดยผ่านกระบวนการจากการทำงานของตัวรับ (receptor) ชนิดต่าง ๆ ภายในระบบเอ็นโดแคนนาบินอยด์ (endocannabinoid system) ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์โดยรวมของสารสกัดกัญชา<sup>[6]</sup> ทั้งนี้ในประเทศไทยมีนโยบายสนับสนุนการใช้สาร

สกัดพืชกัญชาในทางการแพทย์ ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดช่อดอกพืชกัญชาพันธุ์ไทย ในปี พ.ศ. 2564 พบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาที่มีสัดส่วนของ  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC):cannabidiol (CBD) เท่ากับ 1:6 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ด้วยวิธี MTT assay<sup>[7]</sup> โดยสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยดังกล่าวอยู่ระหว่างการขอรับรองพันธุ์พืชกับกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

การศึกษานี้เป็นการทดสอบในระดับพรีคลินิก (preclinical study) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของสารสกัดช่อดอกพืชกัญชาพันธุ์ไทย ในการพัฒนาต่อยอดสมุนไพรไทยในทางการแพทย์ได้

## ระเบียบวิธีศึกษา

การศึกษานี้ผ่านการรับรองด้านจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขควบคุมโครงการ 66-003

### 1. วัสดุ

#### 1.1 สัตว์ทดลองสำหรับปลูกถ่ายก้อนมะเร็งตับ

หนูผู้ดสายพันธุ์ BALB/cAJcl-nu-nu (BALB/c) สั่งซื้อจากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด โดยใช้สัตว์ทดลองเพศผู้ จำนวน 36 ตัว ช่วงอายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนัก 18-24 กรัม

#### 1.2 เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงสำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

HepG2-Red-Fluc cell line (Bioware Brite

Cell line, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)<sup>®</sup> ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับ (human hepatocellular carcinoma cell line)

### 1.3 สารสกัดกัญชาสำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งตับ

สารสกัดกัญชาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ สารสกัดใบกัญชาตะนาวศรีก้านแดง RD 1 โดยวัตถุดิบใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง RD1 เป็นพันธุ์ที่ขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์พืช ตามหนังสือเลขที่ 1688/2564 และดำเนินการปลูกตามหนังสือสำคัญที่ 90/2564 (ปลูก)

## 2. วิธีการศึกษา

### 2.1 การจัดการในสัตว์ทดลอง

ทำการประเมินสุขภาพสัตว์แล้วทำการสุมหนูเข้ากรงเลี้ยงชนิด individual ventilated cage ในพื้นที่ทดสอบการเลี้ยงสัตว์ ABSL1 อาคาร 1 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งหนูทดลองได้รับการปรับสภาพก่อนการทดสอบอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนทำการศึกษา โดยภายในห้องเลี้ยงสัตว์มีการควบคุมอุณหภูมิ 20-26 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 30-70% ความมืด/สว่างสลับกัน 12 ชั่วโมง โดยมีการให้อาหารสำเร็จรูป (Teklad Certified Global 18% Protein Rodent Diet<sup>®</sup>) และมีการให้น้ำที่ผ่านระบบ Reverse Osmosis (R.O.) ตลอดการเลี้ยง

### 2.2 การเตรียมเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงสำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2-Red-Fluc cell line ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการเติม 10% Fetal Bovine Serum (10% FBS) ทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> โดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

### 2.3 การเตรียมสารสกัดกัญชาสำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งตับ

นำส่วนของใบกัญชาตะนาวศรีก้านแดง RD 1 หมักด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อัตราส่วน ผงใบ 800 กรัม ต่อ เอทานอล 1 ลิตร) เติสสารละลายผ่านกระดาษกรอง เพื่อเก็บสารละลายไว้ จากนั้นเติมเอทานอล เพื่อหมักต่อ อีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองส่วนกากออก และนำสารละลายทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนระเหยส่วนตัวทำละลายออกหมด จะได้สารสกัดใบกัญชาตะนาวศรีก้านแดง RD 1 (CSRD1) นำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณร้อยละของ cannabidiolic acid (CBDA), cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) และ tetrahydrocannabinol acid (THCA) ในสารสกัด ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC, model LC-40D, Shimadzu, Japan) มีตัวตรวจวัด UV-Vis ความยาวคลื่น 220 ± 4 nm คอลัมน์ 150 × 3.0 mm C18 InfinityLab Poroshell packed with 2.7 micron particles เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ (A) 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in water และ (B) 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in acetonitrile โดยนำสารสกัด 50 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol : chloroform ด้วยอัตราส่วน 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น ไปเปดมา 1 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter ขนาด 0.45 micron แล้วจึงนำสารละลายตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

### 2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดกัญชา

2.4.1 ขั้นตอนการเหนี่ยวนำก้อนมะเร็งตับในในสัตว์ทดลอง

ทำการฉีดเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ความเข้มข้น 10 × 10<sup>6</sup> cell/100 µl ในตำแหน่ง

ชั้นใต้ผิวหนังบริเวณสะโพก (subcutaneous xenografts) จากนั้นทำการสังเกตอาการและติดตามขนาดของก้อนมะเร็ง โดยทำการตรวจวัดขนาดก้อนมะเร็งด้วย vernier caliper ซึ่งการประเมินขนาดก้อนมะเร็งในหนูทดลองมีการใช้สูตร คือ ขนาดของก้อนมะเร็ง = [(ความกว้างของก้อนมะเร็ง × ความยาวของก้อนมะเร็ง × ความสูงของก้อนมะเร็ง)] × 0.5236 แสดงหน่วยเป็นลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm<sup>3</sup>)<sup>[9]</sup> เมื่อก้อนมะเร็งมีขนาดโดยประมาณ 200 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จึงทำการจัดเข้ากลุ่มเพื่อทำการทดสอบทั้งหมด 6 กลุ่ม

2.4.2 ขั้นตอนการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกัญชาต่อการยับยั้งมะเร็งตับในสัตว์ทดลอง

เมื่อพบการโตของก้อนมะเร็งในหนูทดลอง ทำการแบ่งกลุ่มการทดลอง (สำหรับกลุ่มที่ 2-6) ดังนี้

**กลุ่มที่ 1** หนูผู้โตไม่ชั้ย สายพันธุ์ BALB/c ที่ไม่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc (กลุ่มหนูปกติ)

**กลุ่มที่ 2** หนูผู้โตไม่ชั้ย สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ไม่ได้รับยาต้านมะเร็งและไม่ได้รับสารสกัด CSRD1 แต่ได้รับตัวทำละลาย sesame oil ด้วยการป้อน

**กลุ่มที่ 3** หนูผู้โตไม่ชั้ย สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ได้รับยาต้านมะเร็งมาตรฐาน 5-Fluorouracil (5-FU) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (mg/kg)<sup>[9]</sup> สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (IP route)

**กลุ่มที่ 4** หนูผู้โตไม่ชั้ย สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ได้รับสารสกัด CSRD1 ด้วยการป้อนในขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (mg/kg/day)

**กลุ่มที่ 5** หนูผู้โตไม่ชั้ย สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ได้รับ

สารสกัด CSRD1 ด้วยการป้อนในขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (mg/kg/day)

**กลุ่มที่ 6** หนูผู้โตไม่ชั้ย สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ได้รับสารสกัด CSRD1 ด้วยการป้อนในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (mg/kg/day)

ทำการตรวจติดตามขนาดมะเร็งด้วยการวัดขนาดโดย vernier caliper พร้อมทั้งทำการตรวจติดตามด้วยการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงด้วยเทคนิค Optical *in vivo* imaging (Bioluminescent Living Image; BLI) แล้วทำการวิเคราะห์ภาพโดยใช้โปรแกรม Living Image 4.0 software ด้วยเครื่อง IVIS Lumina Series III (PerkinElmer®) ซึ่งเป็น software ของ เครื่อง IVIS® Lumina Series III ซึ่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย average radiance มีหน่วยเป็น p/s/cm<sup>2</sup>/sr ทำการตรวจติดตามภายหลังการให้สารสกัดกัญชาเพื่อสังเกตอาการสัตว์อย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง ทำการชั่งน้ำหนักสัตว์ น้ำหนักอาหารและน้ำตลอดการศึกษา และมีการบันทึกการตรวจติดตามขนาดของก้อนมะเร็ง และตรวจติดตามด้วยการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงด้วยเทคนิค Optical *in vivo* imaging (Bioluminescent Living Image Signal; BLI signal) สัปดาห์ละ 2 ครั้ง เมื่อสิ้นสุดการศึกษาทำการการุณยฆาตด้วยยาสลบ Isoflurane แล้วทำการผ่าซากเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อเพื่อทำการวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสีมาตรฐาน H&E

## 2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) และการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดสอบสมมติฐานข้อมูลโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความ

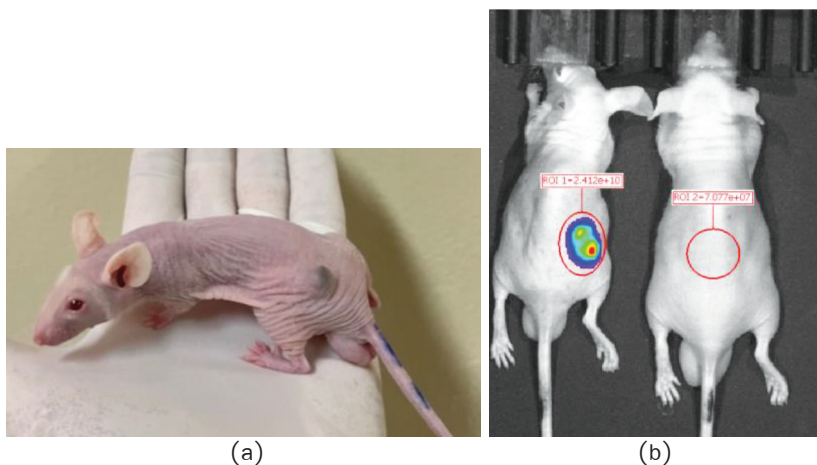
แปรปรวน (ANOVA) กำหนดระดับค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

### ผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของใบกัญชา ตระนาบศรีก้านแดง RD 1 เมื่อสกัดด้วยวิธีการหมักกับ 95% เอทานอล ได้ร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 12.5 และทำการวิเคราะห์หาปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัดดังกล่าว พบว่า สารสกัด CSRD1 มีปริมาณ CBDA, CBD, THC และ THCA เท่ากับ  $1.50 \pm 0.04$ ,  $5.28 \pm 0.16$ ,  $3.61 \pm 0.06$  และ  $0.28 \pm$

$0.01$  (%w/w) ตามลำดับ

ผลการศึกษาในหนูผู้ด้อย สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับเซลล์มะเร็งชนิด HepG2-Red-Fluc ระดับความเข้มข้น  $10 \times 10^6$  cell/100  $\mu$ l เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งที่ตำแหน่งชั้นใต้ผิวหนังบริเวณ สะโพก สามารถค้นพบก้อนเนื้อจากภายนอกภายหลังการเหนี่ยวนำภายใน 58 วัน ก้อนมะเร็งมีขนาดโดยประมาณ 200 ลูกบาศก์เมตร [Figure 1 (a)] จากการตรวจติดตามด้วยการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงด้วยเทคนิค Optical *in vivo* imaging (BLI signal) [Figure 1 (b)]



**Figure 1** (a) Implanted tumor in the left flank of BALB/c nude mice  
(b) Comparison of BLI signal imaging in tumor-bearing BALB/c nude mice and control BALB/c nude mice

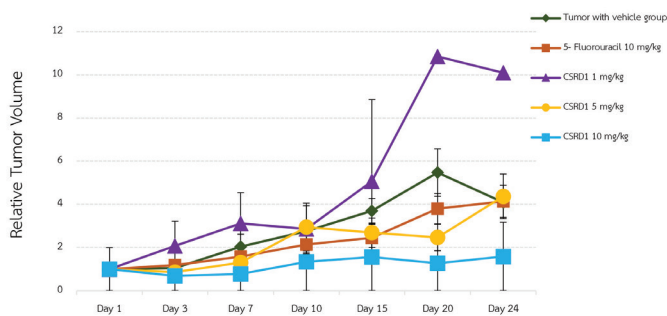
ทำการจัดกลุ่มหนูผู้ด้อย สายพันธุ์ BALB/c ที่เหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งทั้งหมด 21 ตัว โดยแบ่งเป็นกลุ่มหนูทดสอบทำการป้อนสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 mg/kg จำนวน 4 ตัว และขนาด 5, 10 mg/kg/day จำนวน 5 ตัว และกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU ขนาด 10 mg/kg จำนวน 4 ตัว กลุ่มหนูควบคุมที่เหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งโดยไม่ได้รับสารสกัด CSRD1 และยาต้านมะเร็ง 5-FU จำนวน

3 ตัว และกลุ่มหนูควบคุมที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง จำนวน 6 ตัว

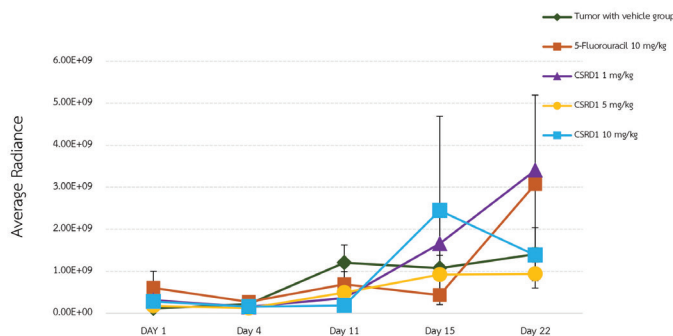
ผลทดสอบด้วยการป้อนสารสกัด CSRD1 จนครบ 24 วัน พบว่าค่าขนาดเนื้องอกสัมพัทธ์ (relative tumor volume) ด้วยการวัด vernier caliper และคำนวณเทียบค่าจากตัวสัตว์ทดลองก่อนได้รับตัวอย่างทดสอบ พบว่า กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ปริมาณ 1 mg/kg/day มีค่าขนาดเนื้องอกสัมพัทธ์

มากกว่ากลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดในขนาดอื่น ๆ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าขนาดเนื้องอกสัมพัทธ์ในกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 10 mg/kg/day มีค่าน้อยกว่าค่าขนาดเนื้องอกสัมพัทธ์ในกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 และ 5 mg/kg/day อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$  ตามลำดับ) อีกทั้งเมื่อเทียบกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 10 mg/kg/day กับกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU และกลุ่มหนูควบคุมที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็งและไม่ได้รับสารสกัด CSRD1 แต่ได้รับตัวทำละลาย sesame oil ก็พบว่าค่า relative tumor volume ที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.006$ ,  $p < 0.001$  ตามลำดับ) (Figure 2) เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความเข้มสัมพัทธ์ของการแผ่สัญญาณต่อความเข้มของสารเรืองแสงไบโอลูมิเนสเซนส์ (rela-

tive average radiance) จากการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสง (BLI signal) ด้วยเทคนิค Optical in vivo imaging ที่มาจากเซลล์มะเร็งพบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 5 mg/kg/day พบแนวโน้มของค่า relative average radiance น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU ขนาด 10 mg/kg และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 5 และ 10 mg/kg/day กับกลุ่มหนูควบคุมที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็งและไม่ได้รับสารสกัด CSRD1 แต่ได้รับตัวทำละลาย sesame oil แล้ว พบว่าแนวโน้มของค่า relative average radiance น้อยกว่าเช่นกัน ทั้งนี้ค่าแนวโน้มที่น้อยกว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดสอบทั้งหมด (Figure 3)



**Figure 2** Mean  $\pm$  S.E. of the relative tumor volume was determined by measuring with a vernier caliper



**Figure 3** Mean  $\pm$  S.E. of the relative average radiance was determined BLI signal by Optical in vivo imaging

เมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักตัว พบว่า กลุ่มหนูควบคุมที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็งและไม่ได้รับสารสกัด CSRD1 แต่ได้รับตัวทำละลาย sesame oil มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1, 5

และ 10 mg/kg/day ( $p < 0.001$ ) โดยพบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 mg/kg/day มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูควบคุม ( $p < 0.001$ ) และกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU ( $p = 0.017$ ) (Table 1)

**Table 1** Mean  $\pm$  S.E. of the body weight

| Group                                      | Mean $\pm$ S.E. (grams) |
|--------------------------------------------|-------------------------|
| Control                                    | 27.32 $\pm$ 0.36        |
| Tumor-bearing mice with vehicle            | 25.70 $\pm$ 0.57        |
| Tumor-bearing mice with 5-FU drug          | 25.99 $\pm$ 0.50        |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 1 mg/kg/day  | 23.62 $\pm$ 0.58        |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 5 mg/kg/day  | 24.91 $\pm$ 0.42        |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 10 mg/kg/day | 24.80 $\pm$ 0.47        |

ค่าเฉลี่ยการกินอาหารของกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ทั้ง 3 ขนาด พบว่ามีค่าที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU ( $p < 0.001$ ) และพบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 mg/kg/day มีค่าเฉลี่ยการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มหนูอื่น ๆ ที่ได้รับสารสกัด ส่วนกลุ่มหนูมะเร็งที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU และไม่ได้รับสารสกัด พบการกินอาหารที่น้อยกว่าอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU ( $p < 0.001$ ) ส่วนค่าเฉลี่ยการกินน้ำของกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ทั้ง 3 ขนาดพบค่าเฉลี่ยดังกล่าวน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูมะเร็งที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU และไม่ได้รับสารสกัด CSRD1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$  ตามลำดับ) (Table 2)

**Table 2** Mean  $\pm$  S.E. of the feeding and watering consumption

| Group                                      | Feeding (grams) | Watering (ml)   |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                            | Mean $\pm$ S.E. | Mean $\pm$ S.E. |
| Control                                    | 3.09 $\pm$ 0.10 | 6.32 $\pm$ 0.25 |
| Tumor-bearing mice with vehicle            | 2.05 $\pm$ 0.16 | 7.79 $\pm$ 0.40 |
| Tumor-bearing mice with 5-FU drug          | 3.52 $\pm$ 0.14 | 6.80 $\pm$ 0.35 |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 1 mg/kg/day  | 1.99 $\pm$ 0.14 | 5.71 $\pm$ 0.35 |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 5 mg/kg/day  | 2.50 $\pm$ 0.13 | 5.33 $\pm$ 0.31 |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 10 mg/kg/day | 2.64 $\pm$ 0.13 | 5.72 $\pm$ 0.31 |

เมื่อสิ้นสุดการศึกษาการผ่าซากและเก็บตัวอย่างเลือด ทั้งนี้ระหว่างการเก็บตัวอย่างเลือดไม่สามารถเก็บตัวอย่างจากกลุ่มหนูทดสอบที่มีการปลูกถ่ายมะเร็งได้ครบทุกตัว เนื่องจากสุขภาพของหนูระหว่าง

การทดสอบและเมื่อนำค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบนั้น พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการทดสอบทั้งหมด (Table 3, 4) ส่วนรอยโรคทาง

**Table 3** Hematological profile in this study

| Group                                                    | Parameter                                     |              |            |                     |             |                |                                                     |                      |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------|------------|---------------------|-------------|----------------|-----------------------------------------------------|----------------------|
|                                                          | RBC<br>( $\times 10^6$ cell/mm <sup>3</sup> ) | HB<br>(g/dl) | HCT<br>(%) | Indices MCV<br>(fl) | MCH<br>(pg) | MCHC<br>(g/dl) | Platelets<br>( $\times 10^3$ cell/mm <sup>3</sup> ) | Reticulocytes<br>(%) |
| Control<br>(n = 6)                                       | 9.87                                          | 14.80        | 45.80      | 46.40               | 15.00       | 32.30          | 856.00                                              | 3.00                 |
|                                                          | 8.35                                          | 12.70        | 41.00      | 49.10               | 15.20       | 31.00          | 930.00                                              | 1.60                 |
|                                                          | 8.39                                          | 13.00        | 40.50      | 48.30               | 15.50       | 32.10          | 937.00                                              | 3.80                 |
|                                                          | 8.98                                          | 14.10        | 44.60      | 49.70               | 15.70       | 31.70          | 647.00                                              | 3.80                 |
|                                                          | 9.44                                          | 14.70        | 44.30      | 47.00               | 15.50       | 33.10          | 978.00                                              | 2.20                 |
|                                                          | 9.12                                          | 13.90        | 43.50      | 47.70               | 15.30       | 32.00          | 1226.00                                             | 1.30                 |
| Tumor-bearing mice with vehicle<br>(n = 1)               | 9.59                                          | 14.70        | 46.00      | 47.90               | 15.30       | 31.90          | 903.00                                              | 5.60                 |
| Tumor-bearing mice with 5-FU<br>(n = 3)                  | 7.30                                          | 11.20        | 34.60      | 47.40               | 15.40       | 32.50          | 268.00                                              | 2.90                 |
| Tumor-bearing mice with CSRD1<br>1 mg/kg/day<br>(n = 3)  | 8.94                                          | 13.90        | 41.90      | 46.80               | 15.50       | 33.00          | 616.00                                              | 5.10                 |
|                                                          | 7.86                                          | 13.50        | 41.20      | 52.40               | 17.20       | 32.90          | 360.00                                              | 29.00                |
|                                                          | 9.67                                          | 14.60        | 45.20      | 46.80               | 15.10       | 32.20          | 763.00                                              | 16.80                |
| Tumor-bearing mice with CSRD1<br>5 mg/kg/day<br>(n = 4)  | 12.24                                         | 17.60        | 54.80      | 44.80               | 14.40       | 32.20          | 955.00                                              | 6.90                 |
|                                                          | 8.80                                          | 13.90        | 41.50      | 47.20               | 15.80       | 33.40          | 851.00                                              | 1.70                 |
|                                                          | 6.49                                          | 9.90         | 32.00      | 49.30               | 15.40       | 31.20          | 520.00                                              | 7.20                 |
|                                                          | 10.40                                         | 12.90        | 43.00      | 41.30               | 12.40       | 30.00          | 892.00                                              | 15.50                |
| Tumor-bearing mice with CSRD1<br>10 mg/kg/day<br>(n = 3) | 8.07                                          | 10.90        | 36.00      | 44.60               | 13.50       | 30.20          | 970.00                                              | 14.30                |
|                                                          | 9.75                                          | 14.90        | 43.20      | 44.30               | 15.30       | 34.40          | 829.00                                              | 14.40                |
|                                                          | 9.80                                          | 14.30        | 43.70      | 44.60               | 14.60       | 32.70          | 804.00                                              | 8.80                 |
| Tumor-bearing mice with CSRD1<br>10 mg/kg/day<br>(n = 3) | 8.08                                          | 12.20        | 39.10      | 48.40               | 15.20       | 31.30          | 856.00                                              | 6.40                 |
|                                                          | 8.31                                          | 12.80        | 40.30      | 48.50               | 15.30       | 31.70          | 200.00                                              | 5.60                 |

Note for abbreviation:

RBC: red blood cell, HB: hemoglobin, HCT: hematocrit, Indices MCV: indices mean corpuscular volume, MCH: mean cell hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

Table 4 Biochemistry profile in this study

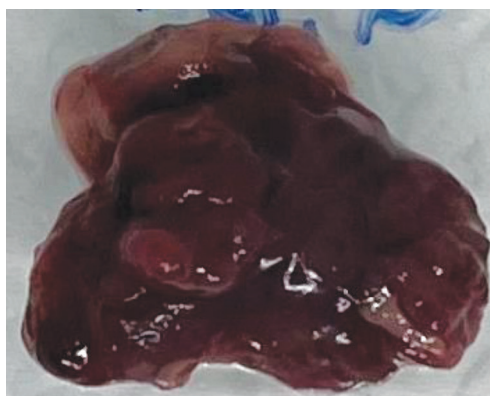
| Group                                                     | Parameter     |              |              |              |                 |                |               |                 |                |                |                 |                |              |                |
|-----------------------------------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|--------------|----------------|
|                                                           | ALB<br>(g/dL) | ALP<br>(μ/L) | ALT<br>(μ/L) | AMY<br>(μ/L) | TBIL<br>(mg/dL) | BUN<br>(mg/dL) | CA<br>(mg/dL) | PHOS<br>(mg/dL) | CRE<br>(mg/dL) | GLU<br>(mg/dL) | NA+<br>(mmol/L) | K+<br>(mmol/L) | TP<br>(g/dL) | GLOB<br>(g/dL) |
| Control (n = 6)                                           | 3.2           | 32           | 36           | 1012         | 0.2             | 14             | 9.8           | 5.2             | <0.2           | 257            | 143             | 6              | 5.2          | 2              |
|                                                           | 3.3           | 69           | 38           | 924          | 0.2             | 15             | 9.5           | 7.7             | <0.2           | 268            | 146             | 5.1            | 4.7          | 1.4            |
|                                                           | 3.4           | 18           | 40           | 881          | 0.2             | 14             | 9.8           | 6.7             | <0.2           | 176            | 151             | HEM            | 5.2          | 1.8            |
|                                                           | 3.6           | 46           | 40           | 773          | 0.2             | 13             | 9.6           | 7.8             | <0.2           | 132            | 144             | 5.7            | 5.4          | 1.8            |
|                                                           | 3.6           | 63           | 39           | 740          | 0.2             | 15             | 9.5           | 5.9             | <0.2           | 136            | 142             | 5.6            | 4.9          | 1.3            |
|                                                           | 2.9           | 22           | 268          | 3012         | 1.3             | 13             | 10.3          | 11.6            | <0.2           | 160            | 154             | 7.9            | 4.3          | 1.4            |
| Tumor-bearing mice<br>with vehicle (n = 1)                | 3.3           | 32           | 50           | 2414         | 0.6             | 16             | 10            | 10.3            | 0.4            | 136            | 160             | 6.9            | 4.8          | 1.5            |
|                                                           | 3.3           | 38           | 30           | 718          | 0.2             | 12             | 9.2           | 6.2             | <0.2           | 185            | 144             | 6.3            | 5.2          | 1.8            |
| Tumor-bearing mice<br>with 5-FU<br>(n = 3)                | 3.3           | 34           | 52           | 1388         | 0.3             | 13             | 9.5           | 7.5             | <0.2           | 281            | 144             | 5.2            | 4.8          | 1.5            |
|                                                           | 4.1           | 42           | 52           | 819          | 0.2             | 11             | 10            | 7.4             | <0.2           | 228            | 148             | 5.7            | 5.2          | 1.2            |
| Tumor-bearing mice with<br>CSR1 1 mg/kg/day<br>(n = 3)    | 3.5           | 29           | 153          | 763          | 0.2             | 22             | 9.4           | 9.6             | 0.4            | 122            | 152             | 7.1            | 4.5          | 1.1            |
|                                                           | 3.7           | 62           | 42           | 723          | 0.3             | 11             | 9.7           | 4.3             | 0.2            | 137            | 138             | 5.1            | 5            | 1.3            |
| Tumor-bearing mice<br>with CSR1<br>5 mg/kg/day<br>(n = 4) | 3.7           | 51           | 31           | 748          | 0.3             | 10             | 9.2           | 6.5             | <0.2           | 188            | 146             | 6.5            | 4.8          | 1.1            |
|                                                           | 3.4           | 46           | 94           | 1696         | 0.4             | 13             | 9.6           | 8.6             | 0.2            | 205            | 150             | 6              | 4.7          | 1.3            |
| Tumor-bearing mice<br>with CSR1<br>10 mg/kg/day (n = 3)   | 3.5           | 51           | 79           | >40000       | 0.5             | 12             | 10.4          | 11.5            | 0.2            | 206            | 155             | 6.9            | 4.7          | 1.2            |
|                                                           | 3.3           | 62           | 40           | 741          | 0.3             | 20             | 9.2           | 5.2             | <0.2           | 135            | 154             | 5.5            | 4.7          | 1.4            |
| Tumor-bearing mice<br>with CSR1                           | 4.1           | 41           | 37           | 793          | 0.2             | 13             | 10.1          | 7.1             | <0.2           | 180            | 149             | 5.4            | 5.8          | 1.7            |
| Tumor-bearing mice<br>with CSR1                           | 3.5           | 45           | 27           | 646          | 0.2             | 11             | 8.9           | 6.9             | <0.2           | 151            | 150             | 5.8            | 4.5          | 1              |
|                                                           | 3.8           | 73           | 40           | 813          | 0.3             | 17             | 9.5           | 7.8             | <0.2           | 178            | 149             | 6.2            | 4.8          | 1              |
| Tumor-bearing mice<br>with CSR1                           | 3.4           | 48           | 32           | 870          | 0.3             | 20             | 9.7           | 8.3             | 0.4            | 196            | 144             | 5.8            | 4.7          | 1.3            |

Note for abbreviation:

ALB: albumin, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine transaminase, AMY: amylase, TBIL: total bilirubin, BUN: blood urea nitrogen, CA: calcium, PHOS: phosphorus, CRE: creatinine, GLU: glucose, NA+: sodium, K+: potassium, TP: total protein, GLOB: globulin

มหัพยาวิทยา (macroscopic lesion) ของก้อนมะเร็งตับ พบลักษณะการกระจายของก้อนเนื้อเล็ก ๆ หลายก้อน (nodule) ภายในชิ้นเนื้อมะเร็ง [Figure 4 (a)] โดยรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (microscopic lesion) นั้นพบลักษณะที่บ่งบอกเซลล์มะเร็งตับ มีลักษณะเซลล์ที่มีการติดสีของนิวเคลียสที่เข้มขึ้น (prominent nucleoli) รูปร่างของนิวเคลียสที่ผิดปกติ (nuclear irregularity) ลักษณะของการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) รวมถึงการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ (mitotic figure) [Figure

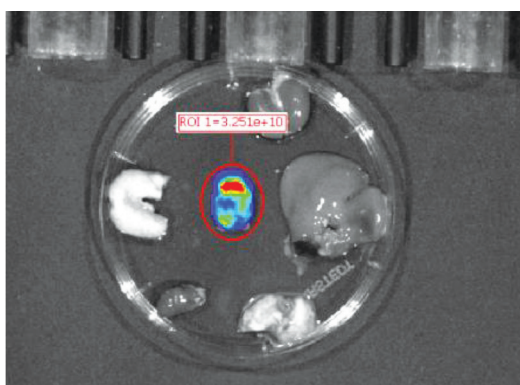
4 (b)] ตามลำดับ แต่ไม่พบการกระจายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวไปยังอวัยวะอื่นๆ (metastatic cancer) ทั้งนี้การพบลักษณะภาวะปอดอักเสบ (interstitial pneumonia) ในกลุ่มหนูที่ได้รับสาร cannabinoid ขนาด 1 mg/kg/day และกลุ่มหนูที่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU รวมถึงกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็ง 5-FU และไม่ได้รับสาร cannabinoid (Table 5) โดยทำการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงด้วยวิธี Ex vivo ก็ไม่พบลักษณะ metastatic cancer เช่นกัน [Figure 4 (c)]



(a)



(b)



(c)

**Figure 4** (a) Macroscopic lesions shown multiple nodules at the tumor mass  
(b) Microscopic lesions shown prominent irregularity in nucleoli with mitotic figures  
(c) BLI signal imaging in tumor mass (Ex vivo)

**Table 5** Macroscopic lesions in this study

| กลุ่ม                                              | Organ |      |       |        |         |           |
|----------------------------------------------------|-------|------|-------|--------|---------|-----------|
|                                                    | Heart | Lung | Liver | Kidney | Stomach | Intestine |
| Control (n = 6)                                    | N     | N    | N     | N      | N       | N         |
| Tumor-bearing mice with vehicle (n = 3)            | N     | 2/3* | N     | N      | N       | N         |
| Tumor-bearing mice with 5-FU (n = 4)               | N     | 2/4* | N     | N      | N       | N         |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 1 mg/kg/day (n = 4)  | N     | 1/4* | N     | N      | N       | N         |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 5 mg/kg/day (n = 5)  | N     | N    | N     | N      | N       | N         |
| Tumor-bearing mice with CSRD1 10 mg/kg/day (n = 5) | N     | N    | N     | N      | N       | N         |

N : No lesion, \* : interstitial pneumonia

## อภิปรายผล

จากการศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดกัญชา CSRD1 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับที่ปลูกถ่ายในหนูชนิดไมซ์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised mice) ด้วยการป้อนในขนาด 10 mg/kg/day พบว่ามีผลต่อขนาดก้อนมะเร็งตับที่มีการโตที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในหนูชนิดไมซ์ที่ได้รับสาร CBD ขนาด 40 mg/kg/day วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์<sup>[10]</sup> ทั้งนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานของตัวรับ cannabinoid receptor 1 (CB1 receptor) ที่เป็นองค์ประกอบของหน่วยรับที่จับคู่กับจีโปรตีน (G-Protein coupled receptor (GPCR) family) ซึ่งมีผลต่อกระบวนการทำงานภายในเซลล์ (intracellular signaling pathway) ทำให้เกิดกลไกการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (cancer cell migration) การยึดเกาะของเซลล์มะเร็ง (cancer cell adhesion) ยับยั้งการแบ่งตัว (anti-proliferative) และกระตุ้นให้เกิดตายของเซลล์มะเร็ง (apoptosis) รวมถึงมีรายงานผลต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือด

เลือด (anti-angiogenesis) อีกด้วย<sup>[11]</sup> และพบว่าการรักษามะเร็งตับในมนุษย์โดยการได้รับสาร cannabinoid นั้น เมื่อได้ทำการศึกษาในระดับตัวรับของเซลล์ (receptor) พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับตัวรับที่มีการทำงานส่งผ่านไอออนในเยื่อหุ้มเซลล์ชนิด transient receptor potential vanilloid 2 receptor (TRPV 2 receptor) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (tumor cell growth) และการยึดเกาะของเซลล์มะเร็ง (cancer cell adhesion) โดยสาร cannabinoid นั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของตัวรับดังกล่าว ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งเซลล์มะเร็ง<sup>[12]</sup> การศึกษาสาร cannabinoid ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งในระดับ receptor ถือว่าเป็นเป้าหมายต่อการใช้สารสกัดกัญชาในเชิงการรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าหมายยิ่งขึ้น ปัจจุบันเทคนิคการถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพสัณฐานด้วยระบบแสง (Optical in vivo imaging) นั้น ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการติดตามฤทธิ์ในการทดสอบ โดยสามารถติดตามผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในตัวสัตว์ทดลองได้อย่างต่อเนื่องในขณะที่มีชีวิต ซึ่งในการศึกษาค้างนี้ได้ทำการตรวจ

ติดตามความเข้มของสารเรืองแสงของเซลล์ที่มีชีวิตชนิดไบโอลูมิเนสเซนซ์ (Bioluminescence, BLI signal) ที่เป็นบริเวณก่อนมะเร็งระดับที่ได้ทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เทคนิคดังกล่าวเป็นการตรวจติดตามบริเวณที่มียีนรายงานผล (gene reporter) ที่สนใจ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ในระดับโปรตีน โดยแสดงออกเป็นรูปภาพที่มีลักษณะเรืองแสง ซึ่งวิธีการตรวจติดตามสัญญาณเรืองแสง BLI signal ถือว่าเป็นวิธีที่มีความไว และมีสัญญาณภาพแทรก (background noise) ต่ำ ทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยสัญญาณเรืองแสงชนิด Fluorescence living image (FLI) ที่มีโอกาสตรวจพบลักษณะการเรืองแสงโดยอัตโนมัติ (autofluorescence) ซึ่งสามารถตรวจพบตามอวัยวะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่งผลให้เกิดผลบวกเทียม (false positive)<sup>[13]</sup> วิธีการตรวจติดตามสัญญาณเรืองแสง BLI signal นั้นได้มีรายงานไว้ว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณเรืองแสงกับขนาดของก้อนมะเร็งที่ตรวจพบได้ในสัตว์ทดลอง<sup>[14]</sup> ทั้งนี้การศึกษารังนี้พบว่าการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสง BLI signal ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดสอบ โดยหลักการของการตรวจติดตามก้อนมะเร็งด้วยเทคนิค Optical in vivo imaging นี้ อาศัยการเปล่งแสงเรืองแสงที่มีความจำเพาะในบริเวณที่ต้องการศึกษา ซึ่งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปของก้อนมะเร็งนั้น จะเกิดภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) ร่วมด้วย ส่งผลให้เมตาบอลิซึมผิดปกติ จึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาของมะเร็ง และส่งผลให้เซลล์มะเร็งทำการบุกรุกต่อเซลล์ปกติได้มากยิ่งขึ้น จึงทำให้เกิดภาวะที่เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ตามมา ภาวะ hypoxia ของก้อนมะเร็งนั้น ถือเป็นข้อจำกัดในการ

ตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสง BLI signal ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคดังกล่าว ทั้งนี้ควรมีการตรวจวัดภาวะ hypoxia ที่เกิดขึ้นร่วมด้วย โดยทั่วไปนิยมใช้การตรวจวัดปริมาณโปรตีนชนิดหนึ่งในเซลล์ที่ชื่อว่า hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) และการตรวจวัดหาสารกระตุ้นการสร้างหลอดเลือด [vascular endothelial growth factor (VEGF)] ซึ่งเป็น biomarker ที่ใช้เพิ่มเติมในการศึกษาลักษณะการเจริญของก้อนมะเร็ง<sup>[15]</sup> เพื่อตรวจติดตามความเข้มของสารเรืองแสงให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น จากการศึกษาในกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดกัญชา CSRD1 ขนาด 10 mg/kg/day มีขนาดของก้อนมะเร็งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 mg/kg/day ซึ่งกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 mg/kg/day นี้ ยังมีร่างกายที่ซูบผอม พบภาวะแห้งน้ำ (dehydration) มีผลจากการโตของก้อนมะเร็งซึ่งสาร cannabinoid มีผลให้ความอยากอาหารลดลง โดยผ่านการทำงานของ CB1 receptor<sup>[16]</sup> ซึ่ง receptor ดังกล่าว มีรายงานว่าสามารถตรวจพบได้ในปริมาณมากในเซลล์มะเร็งระดับ จึงกระตุ้นการทำงานของ CB1 receptor ที่มากขึ้น ทำให้ส่งผลต่อความอยากอาหารที่ลดลง<sup>[17]</sup> และมีผลต่อสุขภาพโดยรวมให้แย่ลง ทั้งนี้จึงเห็นได้ว่า จากผลการศึกษาในครั้งนี้โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CSRD1 ขนาด 1 mg/kg/day ซึ่งเป็นขนาดของการใช้สารสกัดที่ต่ำที่สุด มีผลทั้งต่อการโตของก้อนมะเร็งและมีผลเสียต่อสุขภาพโดยรวม จึงทำให้เห็นได้ว่าการคัดเลือกปริมาณขนาดของสารสกัดกัญชาในระดับต่ำ ๆ ต้องพึงระวัง แต่ทั้งนี้ยังมีรายงานการให้สาร cannabinoid ในระยะสั้น ๆ สามารถใช้เป็นการกระตุ้นความอยากอาหารได้<sup>[18]</sup> สำหรับผลการทดสอบของค่าโลหิต

วิทยาและค่าชีวเคมีไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดสอบ ทั้งนี้อาจมีผลจากจำนวนตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ระหว่างกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากภาวะขาดน้ำ (dehydration) ทั้งนี้มีรายงานการให้สาร cannabinoid ขนาด 3-30 mg/kg/day เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่ส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมี<sup>[6]</sup> หากคำนึงถึงค่าตรวจวิเคราะห์ที่มาจากตัวอย่างเลือดของหนูชนิดไมซ์ ระยะเวลาการทดสอบให้สาร cannabinoid เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ก็เพียงพอ<sup>[5,10]</sup> ซึ่งการศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดจากกัญชาต่อการยับยั้งมะเร็งตับครั้งนี้ ไม่พบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับไปยังอวัยวะอื่นๆ เนื่องจากการเลือกใช้รูปแบบการปลูกฝังเซลล์ในชั้นใต้ผิวหนัง subcutaneous xenografts ด้วยการฉีดเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ที่เป็น human hepatocellular carcinoma cell line ในหนูบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน (immunocompromised mice) ที่ชั้นใต้ผิวหนัง เป็นเทคนิคที่สามารถปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลองได้ไม่ยุ่งยาก แต่ก้อนมะเร็งที่ปลูกถ่ายนั้นจะโตขึ้นในชั้น stroma ซึ่งเป็นบริเวณที่มี connective tissue และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงไม่มาก จึงทำให้การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่ออวัยวะข้างเคียงมีโอกาสเกิดขึ้นค่อนข้างน้อย จึงเป็นข้อจำกัดด้วยเทคนิคดังกล่าวหากต้องการศึกษา metastatic cancer ร่วมด้วย<sup>[19]</sup> ทั้งนี้ยังมีเทคนิคการนำชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยนำมาปลูกถ่ายในหนู immunocompromised (patient-derived tumor xenograft model) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีรายงานความสัมพันธ์กันทั้งในส่วน of immunohistochemistry biomarker และระดับ genetic อย่างใกล้ชิด จึงเป็นรูปแบบทางเลือก

เพื่อศึกษาประสิทธิผลของการใช้ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองที่ต้องการความจำเพาะต่อการรักษาเฉพาะบุคคลมากยิ่งขึ้น (personalized cancer therapy)<sup>[20]</sup>

## ข้อสรุป

การให้สารสกัดกัญชา CSRD1 ขนาด 10 mg/kg/day โดยการป้อนติดต่อกันเป็นระยะเวลา 24 วัน ในหนูชนิดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ พบว่าเมโนมที่ช่วยลดการโตของก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ ทั้งนี้กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกัญชา CSRD1 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านกลไกที่เกิดขึ้นของสารสกัดกัญชา CSRD1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการโตของก้อนมะเร็งตับ และคัดเลือกรูปแบบการเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของฤทธิ์ที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง รวมถึงระยะเวลาการให้สารในสัตว์ทดลอง และจำนวนสัตว์ทดลองเพื่อให้แต่ละกลุ่มเพียงพอเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ทั้งนี้ควรพึงระวังในการเลือกใช้ขนาดของสารสกัดกัญชาในระดับต่ำๆ เพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดกัญชาควรทำการศึกษาและพัฒนาต่อยอดในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งตับ โดยต้องคำนึงปริมาณของสารสกัดกัญชาให้เหมาะสม เพื่อเป็นแนวทางการใช้กัญชาทางการแพทย์ที่เป็นประโยชน์ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยสมุนไพรที่ได้อนุเคราะห์สารสกัดกัญชาสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

## References

1. WHO. All Cancer. [Internet]. 2020 [cite 2023 Aug 18]; [1 screen], Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>
2. National Cancer Institute. Hospital-based cancer registry. [Internet]. 2021. [cited 2023 Aug 9]; Available from: [https://www.nci.go.th/e\\_book/hosbased\\_2564/index.html](https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2564/index.html) (in Thai)
3. Vogel A, Martinelli E, Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, Nault JC, Neumann U, Ricke J, Sangro B, Schirmacher P, Verslype C, Zech CJ, Arnold D, Martinelli E. Updated treatment recommendations for hepatocellular carcinoma (HCC) from the ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol*. 2021;32(6):801-5.
4. Cherkasova V, Wang B, Gerasymchuk M, Fiselier A, Kovalchuk O, Kovalchuk I. Use of cannabis and cannabinoids for treatment of cancer. *Cancers*. 2022;14(20):5142.
5. Iffland K, Grotenhermen F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017;2(1):139-54.
6. Hinz B, Ramer R. Cannabinoids as anticancer drugs: current status of preclinical research. *Br J Cancer*. 2022;127(1):1-13.
7. Radapong S, Suppajariyawat P, Sahad T, Harnkit N, Phankhajon K, Primprai P, Banyati P, Chaisomboonpan S, Sincharoenpokai P, Ritchie KJ. Investigation of the cytotoxicity of Thai cannabis extracts on various cancer cell Lines. *Bull Dept Med Sci*. 2021;63(3):456-66. (in Thai)
8. Sugar E, Pascoe AJ, Azad N. Reporting of preclinical tumor-graft cancer therapeutic studies. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(13):1262-8.
9. Cao Z, Zhang Z, Huang Z, Wang R, Yang A, Liao L, Du J. Antitumor and immunomodulatory effects of low-dose 5-FU on hepatoma 22 tumor-bearing mice. *Oncol Lett*. 2014;7(4):1260-4.
10. Shangguan F, Zhou H, Ma N, Wu S, Huang H, Jin G, Wu S, Huang H, Jin G, Wu S, Hong W, Zhuang W, Xia H, Lan L. A novel mechanism of cannabidiol in suppressing hepatocellular carcinoma by inducing GSDME dependent pyroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:697832.
11. Kis B, Ifrim FC, Buda V, Avram S, Pavel IZ, Antal D, Virgil P, Dehelean CA, Ardelean CA, Diaconeasa Z, Soica C, Dancia C. Cannabidiol-from plant to human body: A promising bioactive molecule with multi-target effects in cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5905.
12. Hosami F, Ghadimkhah MH, Salimi V, Ghorbanhosseini SS, Tavakoli-Yaraki M. The strengths and limits of cannabinoids and their receptors in cancer: insights into the role of tumorigenesis-underlying mechanisms and therapeutic aspects. *Biomed Pharmacother*. 2021;144:112279.
13. Choy G, Choyke P, Libutti SK. Current advances in molecular imaging: noninvasive *in vivo* bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. *Mol Imaging*. 2003;2(4):303-12.
14. Puaux AL, Ong LC, Jin Y, Teh I, Hong M, Chow PKH, Golay X, Abastado JP. A comparison of imaging techniques to monitor tumor growth and cancer progression in living animals. *Int J Mol Imaging*. 2011;2011:1-12.
15. Daimiel I. Insights into Hypoxia: Non-invasive assessment through imaging modalities and its application in breast cancer. *J Breast Cancer*. 2019;22(2):155.
16. Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR. CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice: CB1 modulation of food intake. *Br J Pharmacol*. 2005;145(3):293-300.
17. Suk KT, Mederacke I, Gwak GY, Cho SW, Adeyemi A, Friedman R, Schwabe RF. Opposite roles of cannabinoid receptors 1 and 2 in hepatocarcinogenesis. *Gut*. 2016;65(10):1721-32.
18. Cluny NL, Keenan CM, Reimer RA, Le Foll B, Sharkey KA. Prevention of diet-induced obesity effects on body weight and gut microbiota in mice treated chronically with  $\delta$ 9-tetrahydrocannabinol. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0144270.
19. Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biol*. 2017;39(3):101042831769592.
20. Jung J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicol Res*. 2014;30(1):1-5.