

โครงการย่อยที่ 4

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากหัวข้าวเย็นเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ
ในผู้ป่วย มะเร็งและเอดส์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริศมี ปิ่นสุวรรณ

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ของหัวข้าวเย็นทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้เป็นสมุนไพรต้านมะเร็งโดยหมอพื้นบ้านไทย ได้แก่ *Dioscorea membranacea*, *Dioscorea birmanica*, *Smilax corbularia*, *Smilax glabra* และ *Pygmaeopremna herbacea* โดยการสกัดเลียนแบบหมอพื้นบ้าน คือ ต้มกับน้ำ และ แช่วใน alcohol นำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 8 ชนิด (ปากมดลูก ตับ เต้านม 2 ชนิด โพรงจุก ปอด ต่อมลูกหมาก และ ลำไส้) ด้วยวิธี SRB assay ผลปรากฏว่า สารสกัดชั้น alcohol ของ *Dioscorea membranacea* และ *Dioscorea birmanica* ออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง ดีที่สุด ยกเว้น มะเร็ง โพรงจุก และ มะเร็งเต้านม ส่วนสารสกัดชั้น น้ำของ *Dioscorea membranacea* ออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง โพรงจุกและมะเร็งเต้านม ดีที่สุด การศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก แบบ apoptosis โดยใช้ tunnel assay นั้น พบว่า สารสกัดชั้น แอลกอฮอล์ของ *Dioscorea burmanica* Prain et Burkill ที่ความเข้มข้น 50 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เกิด apoptosis = 6.55% และ 3.89% ตามลำดับ สารสกัดชั้นแอลกอฮอล์ของ *Dioscorea membranacea* Pierre ที่ความเข้มข้น 50 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เกิด apoptosis = 6.81% และ 4.07% ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งเอ็นไซม์ 5-lipoxygenase พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของ หัวข้าวเย็นชนิด *Smilax glabra* Roxb. (500 $\mu\text{g/ml}$) และสารสกัดชั้น ethanol ของ *Dioscorea membranacea* Pierre (100 $\mu\text{g/ml}$) มีฤทธิ์ต้านอักเสบสูงสุด โดยมีค่า %inhibition เท่ากับ 280, 110 ตามลำดับ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้าน HIV กับหัวข้าวเย็น ทั้ง 5 ชนิด พบว่า หัวข้าวเย็นชนิด *Dioscorea membranacea* ชั้น เอทานอล ให้ผลต่อ HIV protease ดีที่สุด ($\text{IC}_{50} = 48 \mu\text{g/ml}$) และ *Smilax corbularia* ให้ผลต่อ HIV integrase ($\text{IC}_{50} = 1.9 \mu\text{g/ml}$) ดีที่สุด และจากการศึกษาฤทธิ์ต่อ virus herpes simplex โดยวิธีการของ Skehan 1990 พบว่าสารสกัดชั้น 95% ethanol ของ DM ให้ผลดีที่สุด คือ $\text{IC}_{50} = 7.1 \mu\text{g/ml}$

การศึกษาศักยภาพเสริมการรักษามะเร็ง และเอดส์ เช่น ฤทธิ์ Antioxidant พบว่าชนิดสารสกัดชั้นเอทานอลของ *Dioscorea membranacea* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้ง 2 assay (lipid peroxidation และ DPPH) มีค่า $\text{EC}_{50} = 7.1$ และ $7.34 \mu\text{g/ml}$ สารสกัดชั้นเอทานอล ของ *Dioscorea membranacea* แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ แบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง *S. aureus* ดีที่สุด

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากเหง้าหัวข้าวเย็นชนิด *Dioscorea membranacea* ในหนู การตอบสนองต่อการอักเสบซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีนิในหนูขาว ผลการระงับปวด โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดความปวดด้วยกรดอะเซติก ความร้อน และฟอร์มอลินในหนูถีบจักร และผลต่อการลดไข้ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดไข้ด้วยยีสต์ในหนูขาว เมื่อป้อนสารสกัดด้วยเอทานอลที่ขนาด 1600 มก./กก. เข้าทางปากในหนูขาว พบว่าสามารถลดการบวมอย่างมีนัยสำคัญที่อุ้งเท้าซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีนิ สารสกัดด้วยน้ำ (1600 มก./กก.) สามารถลดการบวมอย่างมีนัยสำคัญที่อุ้งเท้าซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีนิได้เช่นกัน ไม่มีสารสกัดใดจากเหง้าของหัวข้าวเย็น ที่สามารถลดอาการปวดในการทดสอบฤทธิ์แก้ปวดในหนูถีบจักร และลดไข้ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยยีสต์ในหนูขาว จากผลการทดลองนี้ชี้แนะว่า สารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากเหง้าของหัวข้าวเย็นชนิด *Dioscorea membranacea* มีฤทธิ์แก้อักเสบ แต่ไม่มีฤทธิ์แก้ปวด หรือแก้ไข้

เมื่อนำสารสกัดด้วยเอทานอล และน้ำจากเหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือชนิด *Smilax corbularia* ทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยสังเกตผลของสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำต่อฤทธิ์ลดการบวมที่อุ้งเท้าซึ่งเกิด

จากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจินินในหนูขาว ผลการระงับปวด ซึ่งเกิดจากกรดอะเซติกในหนูถีบจักร และผลต่อการลดไข้ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำโดยยีสต์ในหนูขาว เมื่อป้อนสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากเหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือ (400-1600 มก./กก.) เข้าทางปากในหนูทดลอง พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลที่ขนาด 1600 มก./กก. สามารถลดการบวมอย่างมีนัยสำคัญที่อุ้งเท้าซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจินินในหนูขาว ไม่มีสารสกัดใดจากเหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือ ที่สามารถลดอาการปวดในการทดสอบฤทธิ์แก้ปวดในหนูถีบจักร และลดไข้ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยยีสต์ในหนูขาว จากผลการทดลองนี้เสนอว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือ มีฤทธิ์แก้ปวด โดยมียกลไกการออกฤทธิ์ต่อการอักเสบที่แตกต่างจากแอสไพริน

จากการทดสอบเบื้องต้นของหัวข้าวเย็น 5 ชนิด สรุปว่า *Dioscorea membranacea* เป็นชนิดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในทุกฤทธิ์ โดยเฉพาะมะเร็งคั่งนั้น การแยกสารจึงแยกสารในสารสกัดชั้น ethanol ของ *Dioscorea membranacea* ด้วยวิธี bioassay guild fractionation ได้สารทั้งหมด 8 สารคือ สารใหม่ที่เป็นสารในกลุ่ม naphthofuranoxepins derivatives (dioscorealide A 1 and dioscorealide B 2), สารใหม่ในกลุ่ม 1,4-phenanthraquinone (dioscoreanone 3), stigmasterol 4, β -sitosterol 5, β -sitosteryl 3-O- β -D glucopyranoside 6, สารกลุ่ม Saponin 2 ชนิด คือ diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside 7 and diosgenin-3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-3)- β -D-glucopyranoside] 8 พบว่า สาร dioscorealide B มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมดีที่สุดคั่งนั้นจึงใช้เป็น marker ในการวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัด

คั่งนั้นจึงนำมาศึกษาความคงตัวของสาร Dioscorealide B ซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดหัวข้าวเย็นใต้ภายใต้สภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% การเก็บสารสกัดหัวข้าวเย็นใต้ไว้ภายใต้สภาวะนี้เป็นเวลาติดต่อกัน 120 วันหรือ 4 เดือน นั้นพบว่าปริมาณสาร Dioscorealide B คงเหลือเพียง 64.28% จึงแสดงให้เห็นว่าสาร Dioscorealide B มีความไวต่อการสลายตัวเมื่อสัมผัสกับความชื้น จึงควรเก็บรักษาสารสกัดหัวข้าวเย็นใต้ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

จากผลการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาแนวทางในการขยายพันธุ์ต้นหัวข้าวเย็น โดยใช้ตาข้างเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงสามารถสรุปได้ดังนี้ การเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น โดยเลือกใช้ตาข้างตาข้างที่ 3-8 ในการเพาะเลี้ยง จะทำให้ยอดที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงชนิดแข็งสูตร MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 4.0 mg/l เป็นสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็นได้ดีที่สุด โดยยอดที่ได้จะมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 และ 6.0 mg/l BA โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 60 วัน จะได้จำนวนยอดเฉลี่ยประมาณ 2 ยอดต่อ 1 ตาข้าง หลังจากเพาะเลี้ยงครบ 60 วัน จะต้องทำการย้ายยอดลงอาหารใหม่ (subculture) มิฉะนั้นยอดจะเริ่มเหี่ยวและตายไป ส่วนการเหนี่ยวนำให้เกิดรากของหัวข้าวเย็นใช้อาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 4 mg/l อายุ 2 เดือน มาเหนี่ยวนำให้เกิดรากในสูตรอาหาร hormone-free MS และ MS เสริมด้วยฮอร์โมน NAA 2.0 - 8.0 mg/l และ MS เสริมด้วยฮอร์โมน IBA 2.0 - 8.0 mg/l และ hormone-free MS เสริมด้วยsucrose 30, 60, 90 และ 120 g/l พบว่าทุกสูตรอาหารที่ทำการทดลองไม่สามารถเหนี่ยวนำให้ยอดหัวข้าวเย็นเกิดรากได้ แต่มีสูตรอาหาร hormone-free MS ที่เสริมด้วยน้ำตาล sucrose 120 g/l เท่านั้นที่พบว่าส่วนของลำต้นที่อยู่ใต้ดินจะมีขนาดใหญ่ขึ้นคล้ายกับการเกิดหัวใต้ดินซึ่งอาจจะพัฒนาไปเป็นหัวใต้ดินเมื่อมีอายุมากขึ้นต่อไป

ABSTRACT

The objectives of this research are the investigation of five kinds of Thai plants named “Hua-Khao-Yen” commonly used as ingredients in traditional remedies for cancer in Thailand such as *Dioscorea membranacea*, *Dioscorea birmanica*, *Smilax corbularia*, *Smilax glabra* and *Pygmaeopremna herbacea*. The extraction procedures used were similar to those practiced by Thai traditional doctors were boiling in water and maceration in ethanol. All extract were tested cytotoxic activity against eight types of cancer cells (cervical , liver, 2 types of breast, keratinocyte, lung, prostate, colon by SRB assay. The ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* and *Dioscorea birmanica* showed the highest cytotoxic activity against all cells except nasopharyn (KB) cancer cell and breast cancer cell (BC). The water extract of only one type of Hua khao Yen as *Dioscorea membranacea* showed the highest cytotoxic activity against breast and nasophryn cancer cell. Thus the apoptosis mechanism was also study on cervical cancer cells by tunnel assay , the ethanolic extract of *Dioscorea burmanica* Prain et Burkill at concentration 50 and 10 µg/ml showed apoptosis (6.55% and 3.89% respectively) the ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* Pierre at concentration 50 and 10 µg/ml showed apoptosis (6.81% and 4.07%, respectively). Antiinflammatory activity by inhibitory 5-Lipoxigenase was tested, the water extract of *Smilax glabra* Roxb.(500 µg/ml) and the ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* Pierre (100 µg/ml) showed the highest anti-inflammatory activity, %inhibition as 280 and 110 % respectively .

Anti-HIV-Integrase and Protease activities were also studied. The ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* rhizome showed highest anti-HIV-1 protease activity ($IC_{50}= 48\mu\text{g/ml}$). The ethanolic extract of *Smilax corbularia* showed the highest anti-HIV-1 Integrase activity ($IC_{50}= 1.9\mu\text{g/ml}$). Antivirus herpes simplex by Skehan assay was found that the ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* rhizome showed highest activity ($IC_{50}= 7.1\mu\text{g/ml}$).

The DPPH and lipid peroxidation of liposomes assays were used to test for antioxidant activity of the 5 plant extracts. The ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* rhizome showed high antioxidant activity with both liposome and DPPH assays ($EC_{50}= 7.10$ and $7.34\mu\text{g/ml}$ respectively). The antimicrobial assay was used with 5 plant extracts and it was found that the ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* rhizome showed highest activity against with *S. aureus* , *B.subtilis* and *E. floccosum*.

The effects of the ethanol and aqueous extracts from the rhizome of *Dioscorea membranacea* Pierre (*D. membranacea*) on inflammatory response using carrageenin-induced paw edema in rats, were examined. Antinociceptive activity using writhing, hot plate and formalin test in mice and the antipyretic activity in yeast-induced fever in rats, were also examined. Oral administration of the ethanol extract at the dose of 1600 mg/kg significantly decreased the paw edema induced by carrageenin in rats. The aqueous extract (1600

mg/kg) also significantly suppressed the carrageenin-induced paw edema in rats. The ethanol extract had no significant effects on antinociceptive response in writhing, formalin and hot plate tests and antipyretic activities in yeast-induced fever in rats. No any significant effects on writhing test and yeast-induced fever were observed after oral administration of the aqueous extract in experimental animals. These results suggest that the ethanol and aqueous extracts of *D. membranacea* rhizome possess the anti-inflammatory action but no analgesic or antipyretic actions.

The rhizomes of *Smilax corbularia* Kunth (*S. corbularia*) has extracted with ethanol and water to give ethanol and aqueous extracts, respectively. The effects of the ethanol extract and aqueous extract on anti-inflammatory activity in carrageenin-induced edema in rats, antinociceptive activity using writhing, hot plate and formalin tests in mice and the antipyretic activity in yeast-induced fever were examined. Oral administration of the ethanol extract of *S. corbularia* rhizomes significantly suppressed the paw edema induced by carrageenin in rats while the aqueous extract had no effect. Neither the ethanol extract nor aqueous extract significantly affected the antinociceptive tests in mice and yeast-induced fever in rats. These results suggest that the ethanol extract of *S. corbularia* rhizomes possess anti-inflammatory activity, which its actions on the inflammation may be different from those of the aspirin.

Two novel naphthofuranoxepins derivatives (dioscorealide A **1** and dioscorealide B **2**), a novel 1,4-phenanthraquinone (dioscoreanone **3**), stigmasterol **4**, β -sitosterol **5**, β -sitosteryl 3-O- β -D glucopyranoside **6**, two known saponin glycoside were diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside **7** and diosgenin-3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-3)- β -D-glucopyranoside] **8** were isolated from the ethanolic extract from *Dioscorea membranacea*. Three compounds **2**, **3** and **7** exhibited high cytotoxic activity, **2** and **3** showed selective cytotoxicity for breast and lung cancer cells.

Dioscorea membranacea were examined for their inhibitory activities against nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cell lines induced by lipopolysaccharide (LPS). Among these plant species, the ethanolic extract of *Dioscorea membranacea* exhibited the most potent inhibitory activity with an IC_{50} value of 23.6 μ g/ml. Diosgenin-3-O- α -L-rhamnosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside possessed the highest activity (IC_{50} = 3.5 μ M), followed by dioscoreanone, IC_{50} = 9.8 μ M) and dioscorealide B (IC_{50} = 24.9 μ M), whereas other compounds exhibited moderate and mild activities.

These finding concluded that *Dioscorea membranacea* is the best species named 'Hua-Khao-Yen' for the treatment of cancer patients. The stability test of dioscorealide B was carried out and result revealed that 64.28% of Dioscorealide B remain after been treated under accelerate condition of 45°C, 75%RH for 4 months. Dioscorealide B is sensitive with heat accelerated. Thus, it should be kept in freeze.

The plant tissue culture was established by growing of the lateral bud of *Dioscorea membranacea* stem (third until eighth bud from shoot). These bud showed the better grown in media with MS , BA 4.0 mg/l than MS and 2.0 or 6.0 mg/l BA with in 60 days. The mean of apical appeared as two per one bud. The roots were induced by MS and BA 4 mg/l for 2 months. After that hormone-free MS plus 120 g/l media was apply and stem and rhizome growth showed.