ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากสมุนไพรไทยที่ใช้รักษาโรคมะเร็งตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน
ผู้เขียน	นางสาวอาทิมา แซ่ตั้ง
สาขาวิชา	เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา	2548

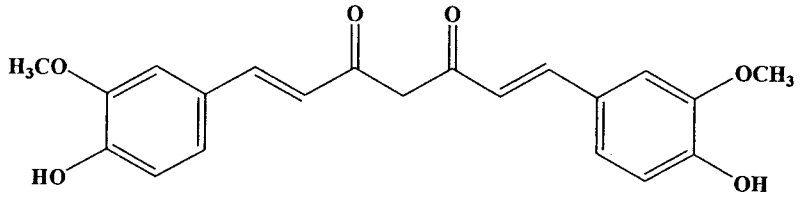
บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรจำนวน 12 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยารักษาโรคมะเร็งของภาคใต้ โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด (COR-L23) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC3) และเซลล์ปกติอีก 1 ชนิด ได้แก่ เซลล์ fibroblast (10FS) วิธีการศึกษาโดยการนำสมุนไพรมาสกัดด้วยน้ำและเอทานอลตามวิธีการสกัดที่หมอพื้นบ้านใช้ในการเตรียมยาเพื่อรักษาผู้ป่วย โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assay และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB (sulphorhodamine B) assay จากการทดลองพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของใบมะกา (*Bridelia ovata*), เหง้าขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*), เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*), หัวข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea*) และรากทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด (IC_{50}< 20 µg/ml) ซึ่งหัวข้าวเย็นใต้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดสูงสุด (IC_{50}= 4.63 µg/ml) และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากมีค่า IC_{50}เท่ากับ 17.55 µg/ml ขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดที่ IC_{50}เท่ากับ 6.05 µg/ml และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ IC_{50}เท่ากับ17.84 µg/ml โดยสารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อย (IC_{50}= 66.05 และ 55.05 µg/ml ตามลำดับ) และสารสกัดของพืชทั้งสองชนิดออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์แบบจำเพาะคือมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดได้ดีกว่ามะเร็งต่อมลูกหมาก และไม่มีฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติ ส่วนสารสกัดของรากทองพันชั่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากสูงที่สุด (IC_{50}= 2.1 µg/ml) รวมทั้งยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ปกติสูงอีกด้วย (IC_{50}= 5.1 และ 10.1 µg/ml ตามลำดับ) ส่วนสารสกัดชั้นน้ำของพืชทั้ง 12 ชนิดไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิด ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของต้นซาก (*Erythrophleum teysmannii*) และผลมะคำดีควาย (*Sapindus rarak*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากันคือ 0.625 µg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของเหง้าขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*), หัวข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea*), ต้นซาก (*Erythrophleum teysmannii*) และ หัวข้าวเย็นเหนือ

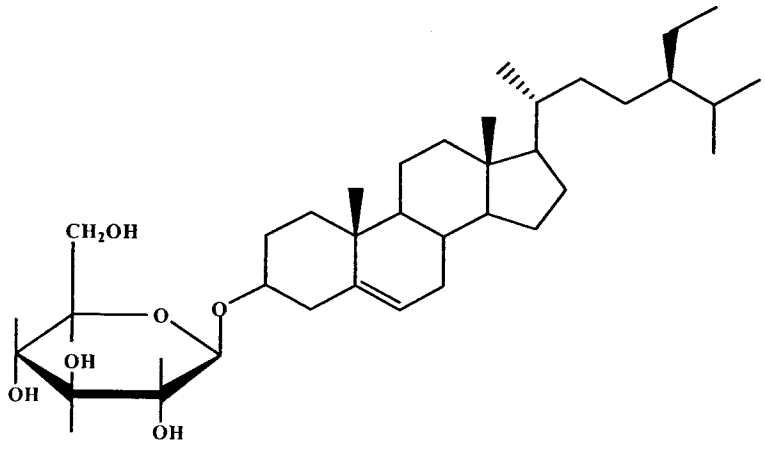
(*Smilax corbularia*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (EC_{50} < 20 μg/ml)

จากการศึกษาทางพฤษเคมีของสารสกัดชั้นเอทานอลของเหง้าขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) และหัวข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea*) สามารถแยกน้ำมัน (CZV), curcumin (CZS1) และ β-sitosterol 3-*O*-β-*D*-glucopyranoside (CZS2) ได้จากสารสกัดของเหง้าขมิ้นอ้อยและสามารถแยกสาร dioscorealide A (DMS2), dioscoreanone (DMS3) รวมทั้ง β-sitosterol 3-*O*-β-*D*-glucopyranoside (DMS1) จากสารสกัดของหัวข้าวเย็นใต้ จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดรวมทั้งสารบริสุทธิ์อีก 5 ชนิดได้แก่ dioscorealide B, stimasterol, β-sitosterol, diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1⟶2)-β-*D*-glucopyranoside และ diosgenin 3-*O*-β-*D*-glucopyranosyl(1⟶3)-β-*D*-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากหัวข้าวเย็นใต้ นำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง COR-L23, PC3 และเซลล์ปกติ (10FS) พบว่า curcumin มีความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์ PC3 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ18.29 μM และ dioscoreanone มีความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์ COR-L23 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.45 μM โดยสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อย

เมื่อนำสาร curcumin, dioscoreanone และ diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1⟶2)-β-*D*-glucopyranoside ซึ่งมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบฤทธิ์การตายของเซลล์ (apoptosis)โดยวิธี TUNEL assay พบว่าสาร curcumin ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 μg/ml สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ COR-L23 ได้ 4.64% และ 21.40% ตามลำดับ ส่วนสารสกัด dioscoreanone ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ COR-L23 ได้ 7.75% การทดสอบฤทธิ์การตายของเซลล์ PC3 พบว่าสาร curcumin ที่ความเข้มข้น 10 μg/ml สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ได้ 4.26% ส่วนสาร dioscoreanone และ diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1⟶2)-β-*D*-glucopyranoside ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 μM สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ได้ 3.37%, 3.71%, 3.43% และ 7.29% ตามลำดับ โดยสาร diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1⟶2)-β-*D*-glucopyranoside สามารถชักนำให้เซลล์ตายโดยการเกิด apoptosis ได้เฉพาะในเซลล์ PC3

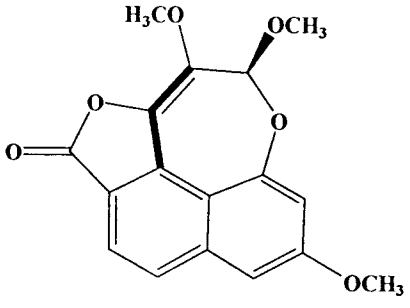


CZS1 (Curcumin)

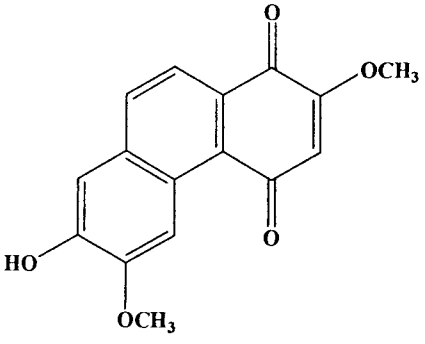


CZS2 and DMS1

(β-Sitosterol 3-*O*-β-*D*-glucopyranoside)



DMS2 (Dioscorealide A)



DMS3 (Dioscoreanone)

Thesis Title	Study on Cytotoxicity of Thai Medicinal Plants Used Traditionally to Treat Cancer
Author	Miss Athima Saetung
Major Program	Pharmaceutical Sciences
Academic Year	2005

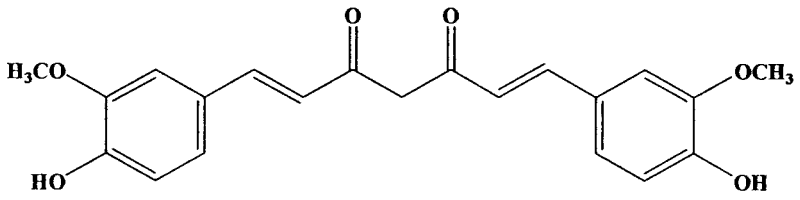
ABSTRACT

Twelve Thai medicinal plants, as the ingredients of a Southern Thai traditional formula for cancer treatment, were selected to test antioxidant activity and cytotoxic activity against two types of human cancer cell lines; large cell lung carcinoma (COR-L23) and prostate cancer (PC3) cell lines and one type of normal human cell line, fibroblast cells (10FS). DPPH assay which is a total antioxidant screening assay was used to test free radical scavenging activity and SRB assay was used to test cytotoxic activity against all of the cell types. The two extract procedures used water and ethanolic were similar to those practiced by Thai traditional doctors. The results found that the ethanolic extracts of five plants showed cytotoxic activity ($IC_{50} < 20$ μg/ml) against lung and prostate cancer cell lines (*Bridelia ovata, Curcuma zedoaria, Derris scandens, Dioscorea membranacea,* and *Rhinacanthus nasutus*). *Dioscorea membranacea* roots showed the highest cytotoxic activity against lung cancer cell lines (IC_{50} = 4.63 μg/ml) but it exhibited low cytotoxic activity against prostate cancer cell lines (IC_{50} = 17.55 μg/ml). *Curcuma zedoaria* showed cytotoxic activity against lung and prostate cancer (IC_{50} = 6.05 and 17.84 μg/ml, respectively). Two ethanolic extracts (*Dioscorea membranacea* and *Curcuma zedoaria*) showed specific activity against lung cancer cell lines and less cytotoxic activity against normal cell (IC_{50} = 66.05 and 55.05 μg/ml, respectively). *Rhinacanthus nasutus* root extract showed the highest cytotoxic activity against PC3 (IC_{50} = 2.1 μg/ml) and its extract also showed high activity against COR-L23 and 10FS (IC_{50} = 5.05 and 10.1 μg/ml, respectively). The water extract of all plants exhibited no activity against all types of human cells. The result of antioxidant activity found that the water extracts of *Erythrophleum teysmannii* and *Sapindus rarak* showed the highest antioxidant

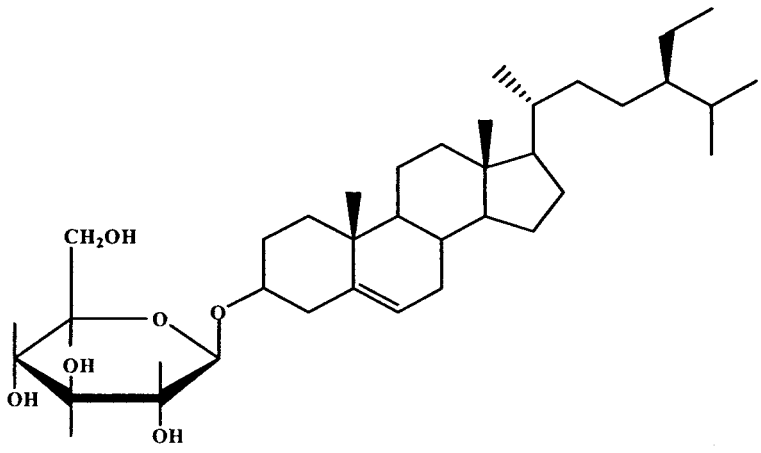
activity in this test (EC_{50} = 0.625 and 0.625 μg/ml, respectively) and four ethanolic extracts (*Curcuma zedoaria*, *Dioscorea membranacea*, *Erythrophleum teysmannii* and *Smilax corbularia*) showed strong antioxidant activity (EC_{50} < 20 μg/ml).

Bioassay guided fractionation was used for isolation of *Curcuma zedoaria* and *Dioscorea membranacea*. The oil (CZV) and curcumin (CZS1) were isolated from the ethanolic extract of *Curcuma zedoaria*. Dioscorealide A (DMS2) and dioscoreanone (DMS3) were isolated from the ethanolic extract of *Dioscorea membranacea*. β-Sitosterol 3-*O*-β-*D*-glucopyranoside (CZS2 or DMS1) was isolated from both extracts. These four compounds, dioscorealide B, stimasterol, β-sitosterol, diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1→2)-β-*D*-glucopyranoside, diosgenin 3-*O*-β-*D*-glucopyranosyl(1→3)-β-*D*-glucopyranoside and volatile oil were tested for cytotoxicity. Among them, curcumin was specifically cytotoxic against prostate cancer cell line (IC_{50} 18.29 μM) and dioscoreanone was specific for cytotoxicity against lung cancer cell line (IC_{50} = 2.45 μM) but both compounds showed less toxic in human fibroblast cell line.

Curcumin, dioscoreanone and diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl (1→2)-β-*D*-glucopyranoside as cytotoxic compound were tested for apoptosis by the TUNEL assay. The results showed 5 and 10 μM of curcumin induced 4.64% and 21.40% apoptosis respectively and dioscoreanone (10 μM) induced 7.75% apoptosis in lung cancer cell line. Curcumin (10 μM) induced 4.26% apoptosis in prostate cancer cell line. Dioscoreanone and diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl-glucopyranoside at 5 and 10 μM induced 3.37%, 3.71%, 3.43% and 7.29% apoptosis respectively in prostate cancer cell lines. Interestingly, diosgenin 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl (1→2)-β-*D*-glucopyranoside induced cell death via apoptosis only in prostate cancer cell line.

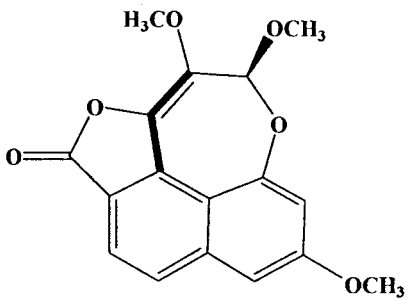


CZS1 (Curcumin)

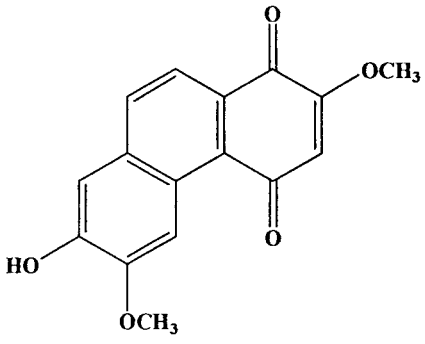


CZS2 and DMS1

(β-Sitosterol 3-*O*-β-*D*-glucopyranoside)



DMS2 (Dioscorealide A)



DMS3 (Dioscoreanone)