



22 JUL 1992

THE STUDY OF ANTICANCER ACTIVITY AND THE IMMUNOSTIMULATING
EFFECT OF A WELL-KNOWN THAI FOLKLORIC REMEDY

SUCHITRA WIWATWITTAYA

ภัณฑ์นทการ

ชก

นางสุจิตรา วิวัฒน์วิฑิต

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(PHARMACOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1992

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งของสมุนไพรตำรับหนึ่ง : ทางระบบภูมิคุ้มกัน
ผู้วิจัย	สุจิตรา วิวัฒน์วิทยา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	กาญจนา เกษสอาด, พ.บ., Ph.D. มลวิภา วงษ์สกุล, Ph.D. พรทิพา พิษา, M.Sc. ปัญญา เต็มเจริญ, D.V.M., M.Sc.
วันที่สำเร็จการศึกษา	24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

ยาสมุนไพรไทยตำรับหนึ่ง ประกอบด้วยส่วนที่มาจากพืช 5 ชนิดและสัตว์ 5 ชนิด มีผู้ป่วยโรคมะเร็งจำนวนไม่น้อยในประเทศไทย (ประมาณ 800 คนต่อปี) รับประทานด้วยยาตำรับนี้ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาสมุนไพรตำรับนี้มาก่อนแล้วพบว่าสารสกัดของยาสมุนไพร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมในหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในระยะ 4 สัปดาห์แรก และมีผลช่วยยืดอายุ รวมทั้งเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการแพร่กระจายของมะเร็งลดลงครึ่งหนึ่งในหนูที่ได้รับสารสกัด คือ หนูที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 3 ตัว จาก 28 ตัว และในกลุ่มควบคุมพบว่ามี 6 ตัวจาก 29 ตัว อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (KB cells) ในหลอดทดลอง (cytotoxic activity) ยังไม่ถึงระดับมาตรฐานสากล ดังนั้นสารสกัดนี้อาจมีผลโดยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เพื่อต่อต้านมะเร็งในหนูทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งของสารสกัดนี้ โดยใช้หนูโกรน (nude mice) ซึ่งได้รับการปลูกมะเร็งปากมดลูกที่นำมาจากผู้ป่วยโดยใช้วิธี serial transplantation การทดลองครั้งนี้ใช้หนู 115 ตัว สามารถปลูกถ่ายมะเร็งให้เกิดในหนูได้ 89 ตัว (77%) แต่คัดเลือกหนูเข้าการทดลองได้จำนวน 48 ตัว คือเป็นหนูที่มีก้อน

มะเร็งในขนาดระหว่าง 7-16 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แบ่งหนูที่ได้ออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 16 ตัว โดยมีการกระจายของก้อนมะเร็งในขนาดตัดเทียมกันอยู่ในทุกกลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่ถูกบ้วนน้ำสกัดจากยาสมุนไพรตำรับนี้ (2 กรัม/5 มิลลิตร) ปริมาณสารสกัดที่บ้วนเท่ากับ 2580 มิลลิกรัม/ต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ต่อวัน เป็นเวลา 60 วัน กลุ่มที่สองให้ยาไมโตไมซิน-ซี 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าทางช่องท้อง กลุ่มที่สามเป็นกลุ่มควบคุม บ้วนน้ำกลั่นเท่านั้น

ผลการทดลองพบว่ายาสมุนไพรตำรับนี้ สามารถยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็ง ในระยะที่ได้รับยา วันที่ 10-60 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับการรักษาด้วยไมโตไมซิน-ซี พบว่าสามารถยับยั้งมะเร็งในช่วง วันที่ 14-60 ของการได้รับยา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ขณะเดียวกัน ยาไมโตไมซิน-ซี มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งมากกว่าสารสกัด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการประเมินผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง ด้วยอัตราส่วน T/C ตามเกณฑ์มาตรฐาน ต้องน้อยกว่า 75% ซึ่งพบว่าทั้งสารสกัดและและไมโตไมซิน-ซี มีฤทธิ์อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 7 และ 14 ของการรักษาจนสิ้นสุดการทดลองตามลำดับ และในการทดลองครั้งนี้พบว่า หนูโคโรนทั้งหมดที่ได้รับสารสกัด 16 ตัวยังมีชีวิตอยู่ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับไมโตไมซิน-ซี ตาย 5 ตัว จาก 16 ตัว

การศึกษาส่วนที่สอง ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทาง Natural Killer (NK) cells โดยสารสกัดสมุนไพรนี้เปรียบเทียบกับกลุ่มให้น้ำในระยะเวลาดังกล่าว กันด้วยวิธี ^{51}Cr release cytotoxicity assay ใช้หนู 3 กลุ่ม จำนวน 20, 22 และ 12 ตัว เพื่อการทดลองเป็นระยะเวลา 1, 2, 3 สัปดาห์ตามลำดับ หนูแต่ละกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 พวกเท่าๆ กัน เพื่อให้สารสกัดสมุนไพรพวกหนึ่งและให้น้ำกลั่นอีกพวกหนึ่ง ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่บ้วนสารสกัดเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์นั้น NK cells มีความสามารถในการทำลาย Yac-1 เซลล์ในหลอดทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความสามารถของ NK cells ของหนูกลุ่มที่บ้วนสารสกัด 3 สัปดาห์เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ้วนด้วยน้ำกลั่น

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาพิษวิทยาของสารสกัดตำรับนี้ในหนูโคโรน โดยบ้วนน้ำสกัดปริมาณ 2580 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน ไม่พบการเกิดพิษของยาสมุนไพรในหนูโคโรน ทั้งลักษณะภายนอกและผลการตรวจทาง histopathology

โดยสรุป ยาสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการปลูกถ่ายในหนูโกรนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผลต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ามีการเพิ่มความสามารถของ NK cells ต่อการทำลาย Yac-1 เซลล์ (lymphoma cells) ในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นผลของการยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็งของสารสกัดนี้อาจเนื่องมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทาง NK cells การศึกษาฤทธิ์ของยาสมุนไพรตำรับนี้ต่อเซลล์ชนิดอื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ความสามารถของ T lymphocytes และ macrophages รวมทั้งประสิทธิภาพในการสังเคราะห์และหลั่งสาร lymphokines และ monokines เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งต่อไป

Thesis Title	The Study of Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of a Well-Known Thai Folkloric Remedy
Name	Suchitra Wiwatwittaya
Degree	Master of Science (Pharmacology)
Thesis Supervisory Committee	Kanchana Ketsa-ard, M.D., Ph.D. Molvibha Vongsakul, Ph.D. Porntipa Picha, M.Sc. Punya Temcharoen, D.V.M., M.Sc.
Date of Graduation	24 February B. E. 2535 (1992)

ABSTRACT

A full recipe of a well-known Thai folkloric remedy consists of parts of five species of plants and five species of animals. This concoction has been prescribed to some cancer patients in Thailand. A previous study on anticancer activity of the extract of this Thai folkloric remedy has found that the extract could significantly inhibit tumor growth in the first 4 weeks, prolonged survival time, and increased survival rate of tumor-bearing rats. The rate of metastasis was decreased to about half in the treated group. However, in the in vitro study against KB-cytotoxic system, the activity of this extract did not reach the standard criteria for cytotoxic activity. Thus, the extract may stimulate the activity of immune system resulting in the inhibition of cancer growth.

This study was carried out in two parts. The first part was the study of the anticancer activity of the extract on serially transplanted human cervical cancer in nude mice. In this protocol, 115 nude mice were used, but after transplantation the tumor took place in only 89 mice. Finally, only 48 mice with the tumor volume of 7-16 mm³ were recruited. They were divided into 3 equal groups having similar distribution of the tumor size. The experimental group was fed daily with the extract solution equivalent to the dose of 2580 mg/kg for 60 days. The extract solution was prepared by dissolving 2 g of dried extract in 5 ml of sterile water. The control group was fed daily with the equivalent amount of water. The third group was injected intraperitoneally with mitomycin-c (MMC) at the dose of 1 mg/kg in day 1 and day 5 every other week. The result showed that the extract could significantly inhibit tumor growth during the 10th-60th day of treatment, in comparison with the control group ($p < 0.05$). There was no significant difference in tumor growth inhibition between the MMC-treated group and the extract-treated group ($p > 0.05$). MMC clearly showed statistically significant inhibition of tumor growth during the 14th-60th day of treatment, in comparison with that in the control group ($p < 0.05$). From the standard criteria of anticancer activity, T/C must be less than 75% before the antitumor activity of the tested substance could be accepted. These criteria could be met by both the extract and the MMC beginning at 7th day and 14th day after the initiation of treatment, respectively, until the end of the experiment. All nude mice in the extract-treated group survived but in the MMC-treated group five of them died.

The second part was the study of the stimulating effect of the extract on the immune response. This experiment studied the effect of the extract on natural killer cells by ^{51}Cr release cytotoxicity assay. The extract was fed to three groups of nude mice containing 10, 11 and 6 animals for 1, 2 and 3 weeks, respectively. The results in each group were compared with those in the control group fed with sterile water with the same numbers of animals. The result showed significant increase ($p < 0.05$) in the natural killer cell activity in the two groups fed with the extract for 1 and 2 weeks compared with the control groups. The natural killer cell activity of nude mice fed with the extract for 3 weeks was increased but did not show statistical significance when compared with the control group.

The extract demonstrated no definite toxicity from a daily oral dose of 2580 mg/kg for three months in six nude mice.

In conclusion, the extract could significantly ($p < 0.05$) inhibit the growth of cervical cancer in tumor-bearing nude mice. In addition, the extract significantly ($p < 0.05$) affected immune response by increasing cytotoxic activity of natural killer cells against yac-1 cell (lymphoma cells) in vitro. Thus, the inhibitory effect of the extract in tumor growth may be due to the immunomodulation of the effector mechanisms, i.e. natural killer cell activity.

Further study was suggested to investigate the activity of T lymphocytes and macrophages and also their efficiency in the synthesis and release of lymphokines or monokines.