ฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาต่อการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

กันต์กนิษฐ์ สุริยะจันทร์ วท.บ., วท.ม, สมชาย ธนะสิทธิชัย พ.บ.
สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

Abstract: In Vitro Anti-Proliferative Activity of Cannabis Extract on Human Cancer Cell Lines

Kankanit Suriyachan, B.Sc., M.Sc., Somchai Thanasitthichai, M.D.
Institute of Medical Research and Technology Assessment, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000
(E-mail: kwankankanit@gmail.com)
(Received: August 6, 2020; Revised: June 16, 2021; Accepted: June 25, 2021)

Background: Cannabis is classified as a Schedule 5 substance under the Narcotics Act B.E. 2522. Among with various modulatory effects of cannabinoids on body functions, two major cannabinoids are known to be used as medicines. They are a psychoactive delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and non-psychoactive cannabidiol (CBD). Currently, THC and CBD are advised to be used for treatment of a variety of medical conditions. Such as cell growth inhibition, anti-inflammatory effects and tumor regression. Although, potential benefit can be found in the medical condition above mentioned. The use of cannabis in some disease states such as cancer remain to be clinically evaluated in both efficacy and safety aspects through systematic research before being generalized for routine use. **Objective:** The purpose of this study to investigate the *In vitro* effects of cannabis extracts on 10 types of human cancer cell line. **Methods:** Two cannabis extracts (high THC level and high CBD level) were kept in sterile bottles, in refrigerator, until further use when it was dissolved in DMSO to give a stock solution, filtered and stored at 4 °C. The small percentage of DMSO present in the wells (maximal 0.1%) was found not to affect the experiment. The anti-proliferative activities of cannabis extract on cancer cell lines was determined by MTT assay. **Results:** To evaluate the anti-proliferative activity of the cannabis extracts on 10 types of cancer cell line (lung cancer, breast cancer, colorectal cancer, gastric cancer, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, pancreatic cancer, cholangiocarcinoma cancer, lymphoma cancer), the cells were treated with different concentrations of high THC level and high CBD level for 72h and cell viability was determined using MTT assay. The results showed that all of cancer cell lines viability significantly reduced in concentration and time dependent manner following treatment with the extract. The IC_{50} of the high THC level values ranging from 10.80 ±1.03 to 54.60±1.27 µg/mL, and exhibited very strong activity against RBE with IC_{50} values of 10.80±1.03 µg/mL. The IC_{50} of the high CBD level values ranging from 6.00±1.16 to 26.00±1.37 µg/mL, and exhibited very strong activity against NCI-N87 with IC_{50} values of 6.00±1.16 µg/mL. **Conclusions:** The results suggest that high THC level and high CBD level is a potent human cancer cells proliferation. Further investigations are needed to elucidate the mechanism of anticancer actions.

Keywords: delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), Cannabis extract, Anti-proliferative, Human cancer cell

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: กัญชาถูกจัดให้อยู่ในรายการยาเสพติด ประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ต่อมามีการศึกษาพบว่าสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์มีฤทธิ์ต่อร่างกายหลายประการ โดยสารสำคัญที่อยู่ในความสนใจ คือ ทีเอชซี (delta-9-tetrahydrocannabinol; THC) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อจิตประสาท และซีบีดี (cannabidiol; CBD) ที่ไม่มีฤทธิ์ต่อจิตประสาท ปัจจุบันมีรายงานวิจัยว่าสารทั้งสองชนิดสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและอาการแสดงได้หลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง แม้ว่าข้อมูลนี้สามารถชี้ศักยภาพของกัญชาที่จะใช้เป็นยา แต่กัญชามีทั้งประโยชน์และโทษจึงต้องมีการวิจัยเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้มีการใช้รักษาโรคอย่างถูกต้องและปลอดภัยโดยเฉพาะโรคมะเร็ง **วัตถุประสงค์:** การศึกษานี้จึงมุ่งทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง **วิธีการ:** สารสกัดกัญชาที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สาร THC และสาร CBD ในปริมาณสูง จะเก็บไว้ในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิทซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนเริ่มการทดสอบให้นำสารสกัดกัญชามาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นกรองและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง โดยทดสอบในเซลล์ไลน์มะเร็งทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งรังไข่ เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งตับอ่อน และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการทดสอบการวัดปริมาณ dehydrogenase enzyme ในเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT assay **ผล:** จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาที่มีสาร THC และสาร CBD ในปริมาณสูง พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้ทั้ง 10 ชนิด ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นไปตามระยะเวลาและระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น โดยสารสกัดกัญชาที่มีสาร THC ในปริมาณสูงมีค่า IC_{50} ± SD ตั้งแต่ 10.80 ± 1.03 ถึง 54.60 ± 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสายพันธุ์ RBE ดีได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าโดยสารสกัดกัญชาที่มีสาร CBD ในปริมาณสูง มีค่า IC_{50} ± SD ตั้งแต่ 6.00 ± 1.16 ถึง 26.00 ± 1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารสายพันธุ์ NCI-N87 ได้ดีที่สุด **สรุป:** จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดกัญชาที่ใช้ในการทดสอบมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สามารถป้องกัน รักษา หรือกำจัดเซลล์มะเร็ง และจากผลการทดลองดังกล่าวยังจำเป็นที่จะต้องศึกษากลไกโดยละเอียด และการศึกษาทางคลินิกเพื่อยืนยันต่อไป

คำสำคัญ: เดลต้า-9-เตตราไฮโดรแคนนาบินอล แคนนาบิไดออล สารสกัดกัญชา ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

บทนำ

มะเร็งเกิดจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่สารพันธุกรรมส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์รวดเร็วและมากกว่าปกติ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติและส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยงเพราะการเจริญเติบโตของหลอดเลือด ถ้าเซลล์พวกนี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น จากการรายงานขณะนี้มะเร็งที่พบในร่างกายมนุษย์มีมากกว่า 100 ชนิด มะเร็งแต่ละชนิดมีการดำเนินของโรคไม่เหมือนกัน เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง จะมีการดำเนินโรคที่รุนแรง ผู้ป่วยจะมีชีวิตการอยู่รอดสั้นกว่าผู้ป่วยมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น ดังนั้นการรักษามะเร็งแต่ละชนิดจะมีวิธีการรักษาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เป็นมะเร็ง ระยะของมะเร็ง สภาพร่างกาย และความเหมาะสมของผู้ป่วยมะเร็ง ปัจจุบันวิธีการรักษาใช้รูปแบบของการผสมผสานทั้ง 3 วิธี ได้แก่ การผ่าตัด การฉายรังสี และการให้ยาเคมีบำบัด แต่เนื่องจากการรักษาด้วยเคมีบำบัดก่อให้เกิดอาการข้างเคียงต่อสุขภาพผู้ป่วย จากสาเหตุดังกล่าวข้างต้นทำให้การแพทย์ทางเลือกเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยและพบว่าปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งจำนวนมาก

ปัจจุบันกัญชาถูกจัดให้อยู่ในรายการยาเสพติด ประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 หากมีไว้ครอบครองมากกว่าสิบกิโลกรัม ถือว่ามีไว้ครอบครองเพื่อจำหน่าย หากผลิต นำเข้า หรือส่งออก จะได้รับโทษจำคุก 2 ถึง 15 ปี และปรับตั้งแต่ 200,000 ถึง 1,500,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ ในปี พ.ศ. 2559 ที่ผ่านมามีความพยายามจากหลายฝ่ายในการเสนอให้รัฐบาลถอดกัญชาออกจากบัญชียาเสพติด โดยผู้สนับสนุนได้ให้เหตุผลถึงประโยชน์ทางการแพทย์รวมถึงเหตุผลทางเศรษฐกิจ และเมื่อต้นปี พ.ศ. 2560 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกกฎกระทรวง เรื่อง การขออนุญาตและการอนุญาตผลิต จำหน่าย นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง และได้ประกาศในราชกิจจานุเบกษาเมื่อวันที่ 6 มกราคม พ.ศ. 2560 โดยให้รัฐมนตรีกระทรวงสามารถอนุญาตให้มีการเพาะปลูกพืชกัญชงเพื่อสกัดเป็นยารักษาโรคในพื้นที่ที่รัฐมนตรีกำหนดได้และในวันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ. 2561 มีการประชุมสภานิติบัญญัติแห่งชาติ เพื่อพิจารณาร่างพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษฉบับใหม่ (ฉบับที่ 7) และเห็นชอบให้กัญชาซึ่งเป็นยาเสพติดประเภท 5 สามารถถูกนำไปศึกษาวิจัยเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ และสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคภายใต้การควบคุมดูแลเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์เท่านั้น ล่าสุดได้มีการประกาศเป็นพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 ในวันที่ 18 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 ซึ่งสามารถนำกัญชามาใช้ในกรณีจำเป็นเพื่อประโยชน์ของทางราชการ การแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัยและพัฒนาการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ได้[1]

การศึกษานี้จึงได้มุ่งเน้นไปที่การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ซึ่งหากมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็งก็จะเป็นการเพิ่มคุณค่าให้แก่ทรัพยากรพืชที่มีอยู่ และนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยารักษาโรคมะเร็งต่อไป เพื่อลดอาการข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด รวมทั้งลดงบประมาณและค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อยาและเครื่องมือในการรักษามะเร็งซึ่งส่วนใหญ่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ

วัตถุและวิธีการ

1. เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ

1.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

สายพันธุ์ HT-29 (ATCC® HTB-38™)

สายพันธุ์ HCT116 (ATCC® CCL-247™)

1.2 เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร

สายพันธุ์ NCI-N87 (ATCC® CRL-5822™)

สายพันธุ์ AGS (ATCC® CRL-1739™)

1.3 เซลล์มะเร็งปอด

สายพันธุ์ NCI-H1975 (ATCC® CRL-5908™)

สายพันธุ์ NCI-H2170 (ATCC® CRL-5928™)

สายพันธุ์ A549 (ATCC® CCL-185™)

1.4 เซลล์มะเร็งเต้านม

สายพันธุ์ MCF-7 (ATCC® CRL-3435™)

สายพันธุ์ HCC1954 (ATCC® CRL-2338™)

สายพันธุ์ HCC1937 (ATCC® CRL-2336™)

1.5 เซลล์มะเร็งปากมดลูก

สายพันธุ์ HeLa (ATCC® CCL-2™)

1.6 เซลล์มะเร็งรังไข่

สายพันธุ์ SK-OV-3 (ATCC® HTB-77™)

1.7 เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง

สายพันธุ์ RL (ATCC® CRL-2261™)

1.8 เซลล์มะเร็งตับ

สายพันธุ์ Hep G2 (ATCC® HB-8065™)

1.9 เซลล์มะเร็งตับอ่อน

สายพันธุ์ Capan-2 (ATCC® HTB-80™)

1.10 เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

สายพันธุ์ RBE (RCB1292)

1.11 เซลล์ปกติ

สายพันธุ์ IMR-90 (ATCC® CCL-186™)

2. การเตรียมสารละลายตั้งต้นสารสกัดกัญชา

สารสกัดกัญชา ได้รับจากสถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม โดยขั้นตอนการสกัดจะนำส่วนดอกของกัญชามาสกัดด้วยทำตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้องการทดสอบให้นำสารสกัดกัญชาที่ได้มาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วทำการกรองด้วย Sartorius Minisart® zyringe fillter ขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนนำมาทดสอบ

โดยสารสกัดกัญชาที่ใช้ในการทดสอบ มีดังนี้

2.1 สารสกัดกัญชาที่มีสาร delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) ในปริมาณสูง (87.79% w/w)

2.2 สารสกัดกัญชาที่มีสาร Cannabidiol (CBD) ในปริมาณสูง (76.38% w/w)

การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดกัญชา THC และ CBD จะเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1,000 ไมโครลิตร แล้วเจือจางสารสกัดกัญชาแบบ 2 เท่า (2-fold dilution) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการใช้ในการทดสอบ

3. การเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์

นำเซลล์ไลน์มะเร็งทั้ง 10 ชนิด ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานจาก American Type Culture Collection; ATCC มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม ได้แก่ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC® 30-2003™), RPMI-1640 Medium (ATCC® 30-2001™), McCoy's 5A Medium (ATCC® 30-2007™) และ F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) (ATCC® 30-2004™) ที่ผสมด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) (ATCC® 302020™) 10 เปอร์เซ็นต์ และ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco®) 1 เปอร์เซ็นต์ บนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน ตรวจดูการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนเซลล์เจริญเรียงตัวเป็นชั้นเดียว หนาแน่นประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์บนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงเข้าสู่การ subculture หรือ pass cell/tissue เพื่อขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4. การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยเทคนิค MTT Assay[16]

เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของมะเร็งแต่ละชนิดให้มีปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการทดลอง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์และปรับความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดกัญชาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นละ 3 หลุม นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ดูดสารสกัดกัญชาทิ้งแล้วเติมสาร 3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ดูดสารทิ้ง จากนั้นเติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร

100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cytoviability) ที่ความเข้มข้นของแต่ละสารที่ใช้ในการทดลอง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดกัญชาที่มีความเป็นพิษและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

สถิติการคำนวณ

$$\% \text{ Cytoviability} = \frac{\text{OD ของสารตัวอย่าง} \times 100}{\text{OD ของกลุ่มควบคุมลบ}}$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cells viability) และร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (% cells inhibition) นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจากตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละการมีชีวิตของเซลล์และร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสารสกัดกัญชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย one-way ANOVA จากโปรแกรม SPSS ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.01$)

ผล

American National Cancer Institute ได้กำหนดเกณฑ์ในการทดสอบพืชที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง โดยจะพิจารณาระดับการออกฤทธิ์ของสารที่ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ คือ ต้องมีความเข้มข้นของสารสกัดไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[2,20,21]

จากการทดสอบสารสกัดกัญชาที่มีสาร delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) ในปริมาณสูงต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งรังไข่ เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งตับอ่อน และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดกัญชาที่เป็นพิษและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} (50% Inhibition concentration)

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดกัญชาที่มีสาร THC ในปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RBE ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10.80±1.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 14.40±1.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิด Capan-2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15.00±0.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SK-OV-3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15.40±0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20.40±0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 1)

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดกัญชาที่มีสาร Cannabidiol (CBD) ในปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด NCI-N87 ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6.00±1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RBE ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 7.70±0.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด HCC 1937 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 9.80±0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิด Capan-2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10.20±0.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 11.20±0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SK-OV-3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 12.40±0.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด AGS ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 13.00±0.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด HCC 1954 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 14.40±0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 14.50±1.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15.20±0.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H1975 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15.40±1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H2170 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 17.20±2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT 29 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 18.60±1.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 19.8 ±0.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลค่าความเข้มข้นของสารสกัดกัญชาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50

ลำดับที่	ชนิดเซลล์มะเร็ง	สายพันธุ์	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดกัญชาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 50% Inhibition Concentration (IC_{50}) (µg/ml)	
			สารสกัดกัญชาที่มี THC ในปริมาณสูง	สารสกัดกัญชาที่มี CBD ในปริมาณสูง
1	มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	HT-29	30.00±0.64	18.60±1.07
		HCT-116	40.20±1.68	12.80±1.90

ตารางที่ 1 ผลค่าความเข้มข้นของสารสกัดกัญชาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (ต่อ)

ลำดับที่	ชนิดเซลล์มะเร็ง	สายพันธุ์	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดกัญชาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 50% Inhibition Concentration (IC_{50}) (µg/ml)	
			สารสกัดกัญชาที่มี THC ในปริมาณสูง	สารสกัดกัญชาที่มี CBD ในปริมาณสูง
2	มะเร็งกระเพาะอาหาร	NCI-N87	42.20±1.16	6.00±1.16
		AGS	22.40±1.32	13.00±0.31
3	เซลล์มะเร็งปอด	NCI-H1975	21.20±0.38	15.40±1.39
		NCI-H2170	41.60±1.04	17.20±2.00
		A549	26.80±1.94	15.20±0.55
4	เซลล์มะเร็งเต้านม	MCF-7	20.40±0.16	11.20±0.88
		HCC 1954	22.00±1.03	14.40±0.58
		HCC 1937	27.80±1.47	9.80±0.20
5	เซลล์มะเร็งปากมดลูก	HeLa	14.40±1.39	14.50±1.33
6	เซลล์มะเร็งรังไข่	SK-OV-3	15.40±0.27	12.40±0.90
7	เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง	RL	54.60±1.27	26.00±1.38
8	เซลล์มะเร็งตับ	HepG2	38.60±1.92	19.80±0.62
9	เซลล์มะเร็งตับอ่อน	Capan-2	15.00±0.14	10.20±0.71
10	เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	RBE	10.80±1.03	7.70±0.68
11	เซลล์ปกติ	Vero	62.50±0.45	14.20±0.99
		IMR-90	46.40±0.67	13.80±0.87

วิจารณ์

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง สารสกัดกัญชาที่ใช้ในการทดสอบ คือ สารในกลุ่ม Cannabinoids ได้แก่ สารสกัดกัญชาที่มีสาร delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) ในปริมาณสูง และสารสกัดกัญชาที่มีสาร Cannabidiol (CBD) ในปริมาณสูง ทำการทดสอบใน Human cancer cell lines ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักสายพันธุ์ HT-29 และ HCT-116 เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารสายพันธุ์ NCI-N87 และ AGS เซลล์มะเร็งปอดสายพันธุ์ NCI-H1975, NCI-H2170 และ A549 เซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7, HCC 1954 และ HCC 1937 เซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ HeLa เซลล์มะเร็งรังไข่สายพันธุ์ SK-OV-3 เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองสายพันธุ์ RL เซลล์มะเร็งตับสายพันธุ์ HepG2 เซลล์มะเร็งตับอ่อนสายพันธุ์ Capan-2 และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสายพันธุ์ RBE เมื่อทดสอบวัดการเจริญเติบโตของเซลล์เพื่อดูการรอดชีวิตและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay (3-(4,5-dimethylyhiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) จากผลการทดสอบพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาที่มีสาร THC และ CBD ในปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้ทั้ง 10 ชนิดมะเร็ง

สารสกัดกัญชาที่มีสาร THC ในปริมาณสูง มีค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ตั้งแต่ 10.80 ±1.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 54.60± 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น (dose dependent manner) ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาอื่น ที่พบว่าสาร THC มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์มะเร็งเต้านม[5,13,19] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์มะเร็งปอด[3,11] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งตับอ่อน[6,12] นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THC สามารถชักนำให้เซลล์เต้านม เซลล์มะเร็งตับอ่อน และเซลล์มะเร็งลำไส้ เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสด้วย[4,10,12]

สารสกัดกัญชาที่มีสาร CBD ในปริมาณสูง ที่ระดับความเข้มข้น 3.906-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ตั้งแต่ 6.00±1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 26.00±1.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น (dose dependent manner) ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ โดยพบว่าสาร CBD สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์มะเร็งเต้านม[8] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์มะเร็งสมอง[15] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนใน

เซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก[7] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งรังไข่[9,14] นอกจากนี้ยังพบว่าสาร CBD สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์มะเร็งรังไข่ เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสด้วย[9,14,17,18]

สรุป

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง ผลการทดสอบพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาที่มีสาร THC และ CBD ในปริมาณสูง ที่ระดับความเข้มข้น 3.906-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้ทั้ง 10 ชนิดมะเร็ง โดยสารสกัดกัญชาที่มีสาร THC ในปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสายพันธุ์ RBE ได้ดีที่สุด โดยมีค่า มีค่า IC_{50}± SD เท่ากับ 10.80±1.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าโดยสารสกัดกัญชาที่มีสาร CBD ในปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารสายพันธุ์ NCI-N87 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า มีค่า IC_{50} ± SD เท่ากับ 6.00±1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารกลุ่มนี้ยังจัดเป็นวัตถุเสพติดในประเทศไทย แม้เพิ่งอนุญาตให้สามารถนำมาทำการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ได้ การทำการวิจัยจึงไม่แพร่หลายมากนัก ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดกัญชาที่ใช้ในการทดสอบ มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเหตุผลดังกล่าวทำให้สามารถประเมินคุณค่าทางสรรพคุณทางยาของกัญชาว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาหรืออาหารเสริมได้หรือไม่ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์อันจะเป็นแนวทางนำไปสู่การวิจัยทางคลินิก เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาสำหรับใช้ในการรักษาหรือให้คำแนะนำแก่ประชาชนที่ใช้สมุนไพรดังกล่าวในการรักษาโรคได้อย่างถูกต้อง ซึ่งจะเป็นการช่วยส่งเสริมการใช้สมุนไพรทางด้านสาธารณสุขมูลฐานต่อไป

References

1. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ ๗) พ.ศ. ๒๕๖๒. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนที่ 19 ก วันที่18 กุมภาพันธ์ 2562 [อินเทอร์เน็ต].[เข้าถึงเมื่อ1 พ.ค.2563]. เข้าถึงได้จาก:http://wwwwww.ratchakitcha.soc.go.th / DATA/PDF/2562/A/019/T_0001.PDF
2. Abdel-Hameed ESS, Bazaid SA, Shohayeb MM, El-Sayed MM, El-Wakil EA. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of Conocarpus erectus L. Growing in Taif, Saudi Arabia. Eur J Med Plants 2012; 93-112.
3. Baram L, Peled E, Berman P, Yellin B, Besser E, Benami M, et al. The heterogeneity and complexity of Cannabis extracts as antitumor agents. Oncotarget 2019; 10:4091–106.
4. Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. Cancer Res 2006; 66:6615–21.
5. Caffarel MM, Moreno-Bueno G, Cerutti C, Palacios J, Guzman M, Mechta-Grigoriou F, et al. JunD is involved in the antiproliferative effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on human breast cancer cells. Oncogene 2008; 27:5033–44.
6. Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, et al. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. Cancer Res 2006; 66:6748–55.
7. De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, et al. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. Br J Pharmacol 2013; 168:79–102.
8. Elbaz M, Nasser MW, Ravi J, Wani NA, Ahirwar DK, Zhao H, et al. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: Novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. Mol Oncol 2015; 9:906–19.
9. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Cannabinoid-induced cell death in endometrial cancer cells: involvement of TRPV1 receptors in apoptosis. J Physiol Biochem 2018; 74:261–72.
10. Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. Int J Cancer 2007; 121:2172–80.
11. Hart S, Fischer OM, Ullrich A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. Cancer Res 2004; 64:1943–50.
12. Leelawat S, Leelawat K, Narong S, Matangkasombut O. The dual effects of delta(9)-tetrahydrocannabinol on cholangiocarcinoma cells: anti-invasion activity at low concentration and apoptosis induction at high concentration. Cancer Invest 2010; 28:357–63.
13. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. J Pharmacol Exp Ther 2006; 318:1375–87.
14. Lukhele ST, Motadi LR. Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. BMC Complement Altern Med 2016;16:335.
15. Marcu JP. Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Horowitz MP, Lee J, et al. Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. Mol Cancer Ther 2010; 9:180–9.
16. Noor R, Astuti I, Mustofa. Cytotoxicity of α-terpineol in Hela cell line and its effects to apoptosis and cell cycle. J Med Sci 2014; 46:1–9.
17. Ramer R., Heinemann K., Merkord J., Rohde H., Salamon A., Linnebacher M., Hinz B. COX-2 and PPAR-γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. Mol Cancer Ther2013;12:69–82.
18. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. Mol Cancer Ther 2011; 10:1161–72.
19. Takeda S, Yoshida K, Nishimura H, Harada M, Okajima S, Miyoshi H, et al. Δ9-Tetrahydrocannabinol disrupts estrogen-signaling through up-regulation of estrogen receptor β (ERβ). Chem Res Toxicol 2013; 26:1073–9.
20. Tanamatayarat T. Cytotoxic activity screening of some rubiaceae plants in Northern Thailand. Thesis of Master of Phamacy in Phamaceutical Chemistry, Chiang Mai University, Chiang Mai; 2002.
21. Widiyastuti Y, Sholikhah IYM, Haryanti S. Cytotoxic activities of ethanolic and dichloromethane extract of leaves, stems, and flowers of Jarong [Stachytarpheta jamaicensis (L.) Vahl.] on HeLa and T47D cancer cell line. ICSAS 2019; 2202: 020101.