

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทยต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

ศรายุทธ ระดาพงษ์¹ พราว ศุภจริยาวัตร¹ ตัญญาณี สาหิต¹ ณัฐภัทร หาญกิจ¹ กัญชริญา ภารเชษฐ¹ ปฎิภาณ พรหมพราย¹ พิเชฐ บัญญัติ¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์¹ พรชัย สันเจริญโกโคย¹ และ Kenneth J Ritchie²

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัย Liverpool John Moores, Byrom Street, ลิเวอร์พูล, สหราชอาณาจักร

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) จัดเป็นพืชเสพติดที่มีหลายสายพันธุ์ (strains) ปัจจุบันในประเทศไทยได้รับอนุญาตให้ใช้ประโยชน์ของกัญชาในทางการแพทย์และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สารสำคัญหลักที่พบมากในกัญชาเป็นแคนนาบินอยด์ที่พบมีสองชนิด คือ Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) ซึ่งรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC และ CBD โกล้เคียงกัน), PTC0602 (THC สูง) และ PTC0729 (CBD สูง) สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) วิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดกัญชาทั้ง 3 ชนิด แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด โดย PTC0729 ซึ่งมีสัดส่วน THC : CBD เท่ากับ 1 : 6 มีความจำเพาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งไต (A-498) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน PTC0602 ซึ่งมีสัดส่วน THC: CBD เท่ากับ 10 : 1 แสดงความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (A-549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) เซลล์มะเร็งสมอง (A-172) และมะเร็งตับอ่อน (PANC-1) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.92 ± 1.05 , 14.65 ± 2.05 , 15.11 ± 2.52 และ 19.19 ± 1.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ PTC0601 มีสัดส่วน THC: CBD เท่ากับ 2 : 1 มีพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ไม่จำเพาะกับเซลล์ใด จะเห็นได้ว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้และอาจพัฒนาไปเป็นยาต้านมะเร็งหรือยาร่วมกับยาต้านมะเร็งได้

คำสำคัญ: กัญชาพันธุ์ไทย, พิษต่อเซลล์, เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD)

Corresponding author E-mail: sarayut.r@dmsc.mail.go.th

Received: 12 July 2021

Revised: 24 August 2021

Accepted: 31 August 2021

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตสาเหตุหนึ่งทั่วโลก องค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) รายงานตัวเลขผู้เสียชีวิตกว่า 10 ล้านคน ในปี 2563 ซึ่งเสียชีวิตจากมะเร็ง 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งเต้านม สำหรับผู้ป่วยรายใหม่ในปี 2561 พบ 18.1 ล้านราย โดยผู้ชายมักพบมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ ในขณะที่ในผู้หญิงมักพบมะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ มีการคาดการณ์ในประมาณปี 2584 จะพบผู้ป่วยรายใหม่กว่า 30 ล้านราย และมีผู้เสียชีวิตกว่า 20 ล้านราย มะเร็งก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อชีวิต จิตใจ และผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ จากรายงานค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วยมะเร็งในสหรัฐอเมริกามีค่าใช้จ่ายสูงถึง 137.4 พันล้านดอลลาร์สหรัฐหรือประมาณ 4 ล้านล้านบาท ในปี 2553 และมีอัตราเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี รวมถึงค่ายาหรือวิธีการรักษาซึ่งมีผลข้างเคียงและราคาแพง⁽¹⁾ ในประเทศไทยโรคมะเร็งพบมากเป็นอันดับต้น ๆ เมื่อเทียบกับสาเหตุการตายอื่น ๆ ซึ่งการรักษาด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นทางเลือกที่นิยมใช้ในการรักษาเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง แต่พบว่าผู้ป่วยจำนวนมากได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยา ทำให้วงการแพทย์ไทยพยายามคิดค้นหาแนวทางรักษาและยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยการนำเอาสมุนไพรไทยมาพัฒนาและใช้ร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบันในการบำบัดรักษาโรคมะเร็ง มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำสารที่สกัดหรือสารสำคัญมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ เนื่องจากพืชและสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ มาแต่โบราณ การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งจึงเป็นที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูง และพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจจากประชาชนและได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลเพื่อนำมาใช้ทางการแพทย์อย่างถูกกฎหมายคือพืชสมุนไพรกัญชา

กัญชา (Cannabis, marijuana หรือ *Cannabis sativa* L.) เป็นพืชเสพติดที่มีการอนุญาตให้ใช้ทางการแพทย์หรือเพื่อสันทนาการอย่างถูกกฎหมายในหลายประเทศ ปัจจุบันในประเทศไทยได้มีความพยายามจากรัฐบาลในการผลักดันให้มีการใช้ประโยชน์จากพืชกัญชาอย่างถูกกฎหมาย โดยเฉพาะใช้ในทางการแพทย์ การศึกษาวิจัยผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอางและอาหาร มีประกาศพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 อนุญาตให้สามารถนำกัญชามาใช้ในกรณีจำเป็นเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัยและพัฒนาการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ได้⁽²⁾ นอกจากนี้ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ซึ่งลงประกาศในราชกิจจานุเบกษาแล้ว และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2563 เป็นต้นไป ระบุว่าสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชง ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก ของกัญชา และเมล็ดของกัญชง รวมถึงกากที่เหลือจากการสกัดกัญชาและกัญชง ต้องมีปริมาณ THC ไม่เกิน 0.2% เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย และการผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพ แต่ส่วนของช่อดอก ใบที่ติดกับช่อดอก และเมล็ดของกัญชา และช่อดอกของกัญชงยังคงจัดเป็นยาเสพติด⁽³⁾ ปัจจุบันได้มีประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร พ.ศ. 2564 ให้นำน้ำมันสารสกัดกัญชาในรูปแบบยาหยดในช่องปาก (Oromucosal drops) จำนวน 5 รายการ เป็นรายการยาเพื่อใช้ในการป้องกันหรือแก้ไขปัญหาด้านสุขภาพในสถานพยาบาลหรือหน่วยงานของรัฐที่ได้รับอนุญาต ถือได้ว่าเป็นการขับเคลื่อนและส่งเสริมการใช้กัญชาอย่างเป็นรูปธรรม ทำให้เกิดความมั่นคงระบบยาของประเทศ ลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายา สามารถสร้างมูลค่าและเพิ่มรายได้ให้เกิดขึ้นในประเทศ ประเทศไทยถือเป็นประเทศแรกในอาเซียนที่อนุญาตให้ใช้กัญชาอย่างถูกกฎหมายเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ จากรายงานของเครือข่ายพัฒนาประเทศไทยแบบเปิด (Open development Thailand) คาดว่ามูลค่าอุตสาหกรรมกัญชาทั่วโลกจะเติบโตอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง โดยอุตสาหกรรมกัญชาของประเทศไทยจะมีมูลค่าทางตลาดกว่า 21,000 ล้านบาท ภายในปี 2567⁽⁴⁾ นอกจากนี้ปัจจุบันเริ่มมีผู้ประกอบการกลุ่มอาหารและเครื่องดื่มรวมทั้งผลิตภัณฑ์สุขภาพ สนใจที่จะใช้สารสกัดจากกัญชาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กลุ่มดังกล่าว ส่งผลให้คาดว่ามูลค่าตลาดกัญชาโลกจะเติบโตและกระจายไปในหลายธุรกิจมากขึ้น

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* (Lam.)⁽⁵⁾ ในประเทศไทยยังพบกัญชง หรือ เฮมพ์ (Hemp) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันของปริมาณสารสำคัญหลักในกลุ่มแคนนาบินอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) ซึ่งใช้ประกอบในการจำแนกระหว่างกัญชาและกัญชง ในปัจจุบันพืชทั้งสองยังคงถูกจัดให้เป็นชนิด (species) เดียวกัน แต่มีความแตกต่างในระดับ sub-species หรือ variety เท่านั้น^(5, 6) สารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด ในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา⁽⁷⁾ โครงสร้างทางเคมีของแคนนาบินอยด์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไขมัน (lipid) อัลคิลเรสอร์ซินอล (alkylresorcinol) และเทอร์ปีน (terpenes) สารแคนนาบินอยด์ที่พบในกัญชาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ carboxylic acid เมื่อโดนแสงหรือความร้อนจะทำให้ถูก decarboxylated ให้อยู่ในรูปของ reduced form โดยสารสำคัญแคนนาบินอยด์ที่พบได้มาก คือ $\Delta 9$ -THC และ CBD ส่วนสารสำคัญแคนนาบินอยด์ที่พบได้น้อยกว่า เช่น $\Delta 8$ -THC, cannabinol (CBN) นอกจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์แล้ว ยังพบสารอื่น ๆ อีกมากกว่า 400 ชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ อัลเคน กรดไขมัน และน้ำตาล เป็นต้น^(8, 9) จากการทบทวนรายงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกัญชาโดยเน้นฤทธิ์ของสารสำคัญ ได้แก่ THC และ CBD พบว่า THC และอนุพันธ์ มีฤทธิ์แก้ปวด โดยเฉพาะอาการปวดจากโรคทางระบบประสาท กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง ส่วน CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติกหรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพติดกัญชา⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า THC CBD และอนุพันธ์แคนนาบินอยด์ เช่น cannabichromene, cannabigerol รวมถึงสารฟลาโวนอยด์ เช่น apigenin, chrysoeriol, kaempferol, luteolin, quercetin, vitexin และ cannflavins เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer cells) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งตับ (hepatocarcinoma) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (lymphocyte leukemia cells) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cells) และ มะเร็งผิวหนัง (melanoma cells)^(8, 11) รายงานรวบรวมฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของ CBD ในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือในสัตว์ทดลองพบว่ามีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7 and MDA-MB-231) เซลล์มะเร็งสมอง (U87-MG, U373, primary 3832 และ 387) เซลล์มะเร็งปอด (NSCLC, A549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29) เซลล์มะเร็งตับอ่อน เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3, DU-145, 22RV1, LNCaP) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Leukaemia/Lymphoma, Multiple myeloma) โดยกลไกหลักในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (proliferation) และเป็นแบบไม่อาศัยตัวรับ (receptor-independent manner) ผ่าน 3 เส้นทางหลัก (pathways) ได้แก่ extracellular-signal-regulated kinase (ERK), Reactive oxygen species (ROS) และ phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) ซึ่งควบคุมการเจริญและการโตของเซลล์ (growth, proliferation) การสร้างและสลายสาร (metabolism) การอยู่รอดของเซลล์ และกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis)⁽¹²⁾

การทดสอบในสัตว์ทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในกัญชาทั้งแคนนาบินอยด์และสารอื่นที่ไม่ใช่แคนนาบินอยด์ (non-cannabinoids) สามารถยับยั้ง cell proliferation กระตุ้นโปรแกรมเซลล์ตาย (apoptosis) ชัดขวาง angiogenesis และการแพร่กระจายของมะเร็ง (tumor invasion/metastasis)^(8, 13, 14) ปัจจุบันองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (The US Food and Drug Administration, FDA) อนุญาตให้มีการใช้ยา Dronabinol (Marinol[®]) และ Nabilone (Cesamet[®]) ซึ่งมี THC เป็นส่วนประกอบหลัก ให้ใช้ในผู้ป่วยมะเร็งที่มีอาการวิงเวียน คลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหารจากการใช้ยาเคมีบำบัด ส่วน Nabiximols (Sativex[®]) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบกัญชา (มี THC : CBD = 1 : 1) ใช้ในรูปแบบสเปรย์พ่นในช่องปาก (Oromucosal spray) ใช้บรรเทาอาการปวดที่เกิดจากมะเร็ง อยู่ระหว่างการทดสอบทางคลินิกในสหรัฐอเมริกา ยานี้ได้รับการขึ้นทะเบียนรับรองแล้วในแคนาดา เม็กซิโก และบางประเทศในแถบยุโรป⁽¹⁵⁾ การใช้สารสกัดหรือสารสำคัญในกัญชาเพื่อใช้รักษาหรือฆ่าเซลล์มะเร็งโดยตรงนั้น

ยังต้องการองค์ความรู้ใหม่จากการวิจัยเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งหรือลดความเสี่ยงจากผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้

กัญชาพันธุ์ไทยที่ได้รับยกย่องว่าเป็นพันธุ์ที่ดีที่สุดในโลกพันธุ์หนึ่ง คือ พันธุ์ทางกระรอก (Thai Stick) แต่มีแนวโน้มที่มีปริมาณ THC สูง⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามกัญชาพันธุ์ไทยจากรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีการเก็บรวบรวมพันธุ์กัญชาสามารถจำแนกตามปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ที่ตรวจพบ แบ่งเป็น 3 พันธุ์ ได้แก่ กัญชาพันธุ์ที่มีปริมาณ THC สูง (รหัสตัวอย่าง PTC0602) พันธุ์กัญชาที่ให้ค่า THC และ CBD สัดส่วนใกล้เคียงกัน (รหัสตัวอย่าง PTC0601) และ พันธุ์กัญชาที่ให้ CBD สูง (รหัสตัวอย่าง PTC0729) ขณะนี้กัญชาทั้ง 3 พันธุ์ อยู่ระหว่างขอรับรองพันธุ์พืชกับกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์⁽¹⁷⁾ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนากัญชาพันธุ์ไทยเป็นยาต้านมะเร็งหรือยาใช้ในผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารละลาย

Sodium bicarbonate, Sodium chloride, Potassium chloride, Potassium dihydrogen phosphate, Di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate และ EDTA Disodium Salt, Dihydrate (MERCK, Darmstadt, Germany), 0.25% Trypsin (Gibco, New York, USA), Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Oregon, USA), Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Invitrogen, Oregon, USA), Doxorubicin (MERCK, St. Louis, USA), Fetal Bovine Serum (Gibco, Paisley, UK), Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) และ Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Gibco, New York, USA).

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ A-549 (เซลล์มะเร็งปอด), HepG2 (เซลล์มะเร็งตับ), A-498 (เซลล์มะเร็งไต), A-172 (เซลล์มะเร็งสมอง), PANC-1 (เซลล์มะเร็งตับอ่อน), Caco-2 (เซลล์มะเร็งลำไส้) และ MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) ซื้อมาจากบริษัท CLS Cell line service GmbH, Eppelheim, ประเทศเยอรมนี เซลล์ A-549 และ A-172 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ส่วนเซลล์ HepG2 A-498 Caco-2 PANC-1 และ MCF-7 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM ที่มี 2mM L-Glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acid, 1 mM Sodium pyruvate และ Fetal bovine serum ร้อยละ 10 บ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 °C

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง, Biological Safety Cabinet (BSC Class II), Circulating water bath, ตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์, เครื่อง Elisa microplate reader, เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge), เครื่อง Sonicator, 96 well plate, Micropipette ขนาด 10-100, 20-200, 100-1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร, Micropipette tip ขนาด 20, 200, 1,000, 5,000 และ 10,000 ไมโครลิตร, Multi-channel pipette ขนาด 300 ไมโครลิตร, หลอด centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, ซ้อนตักสาร, กระดาษซั่งสาร, Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, กล่องแช่แข็งเซลล์ (Cool box), เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ, กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope), เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

วัตถุดิบดอกกัญชา

ตัวอย่างสมุนไพรช่อดอกเพศเมียกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 รหัสตัวอย่าง PTC0602 (พันธุ์ที่ให้ THC สูง) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่ให้ CBD สูง) เก็บมาจากแหล่งเพาะปลูกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หนังสือสำคัญยาเสพติดประเภท 5 อนุญาตปลูกเลขที่ 90/2564 (ปลูก)

ขั้นตอนการสกัดกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย PTC0601, จำนวน 132 กรัม, PTC0602 และ PTC0729 ปริมาณ 132, 126 และ 100 กรัมตามลำดับ บดหยาบ สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวดโดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Spe-ed SFE บริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลาย แรงดัน 250 bar อุณหภูมิของตู้อบ (oven) 40 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 กรัม, 8.95 กรัม และ 7.07 กรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณ THC และ CBD 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 เฟสเคลื่อนที่ใช้ (A) 0.085% H_3PO_4 in Water และ (B) 0.085% H_3PO_4 in Acetonitrile รันแบบ isocratic 30%(A) : 70%(B) เตรียมตัวอย่างโดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol : chloroform 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 micron

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดกัญชาความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น โดยการเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ความเข้มข้นสูงสุดของสารทดสอบเท่ากับ 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ (0.5% v/v DMSO) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ($n = 3$) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์ ดูดสารละลายอาหารออกจากเพลท จากนั้นปิเปตสารละลายทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในเพลทที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBS 2 ครั้ง เติม MTT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มเพลทในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ปิเปตสารละลาย MTT ออก ให้เหลือเฉพาะผลึก Formazan เติม DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก Formazan เขย่าเพลทประมาณ 1 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารทดสอบ) ในการทดสอบใช้ Doxorubicin เป็น positive control

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่า IC_{50} โดยใช้ความสัมพันธ์แบบ non-linear regression ระหว่าง %viability และความเข้มข้นที่ทดสอบ ส่วนการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในเซลล์แต่ละชนิด ใช้สถิติ One-way ANOVA วิธี Tukey's multiple comparisons test โดยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.0.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

ปริมาณสารสกัดกัญชาและแคนนาบินอยด์

สารสกัดช่อดอกเพศเมียของกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้สารสกัดที่มีสีกึ่งแข็งกึ่งเหลวสีเหลืองน้ำตาล การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม cannabinoids ได้ปริมาณ THC และ CBD ดังแสดงในตารางที่ 1 PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ให้ค่า yield ใกล้เคียงกันเท่ากับ 8.27, 7.10 และ 7.07% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี HPLC THC มีปริมาณเท่ากับ 20.08, 38.03 และ 4.28% ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณ CBD มีค่าเท่ากับ 12.18, 3.55 และ 25.89 % ตามลำดับ เมื่อเทียบสัดส่วนระหว่าง THC : CBD พบว่า PTC0602 ให้ค่า THC ในสัดส่วน 10 : 1 ในขณะที่ PTC0729 ให้ค่า CBD ในสัดส่วนสูงกว่าพันธุ์อื่นมีค่า 1 : 6 ส่วนตัวอย่าง PTC0601 มีค่าสัดส่วนของสารที่ใกล้เคียงกันประมาณ 2 : 1

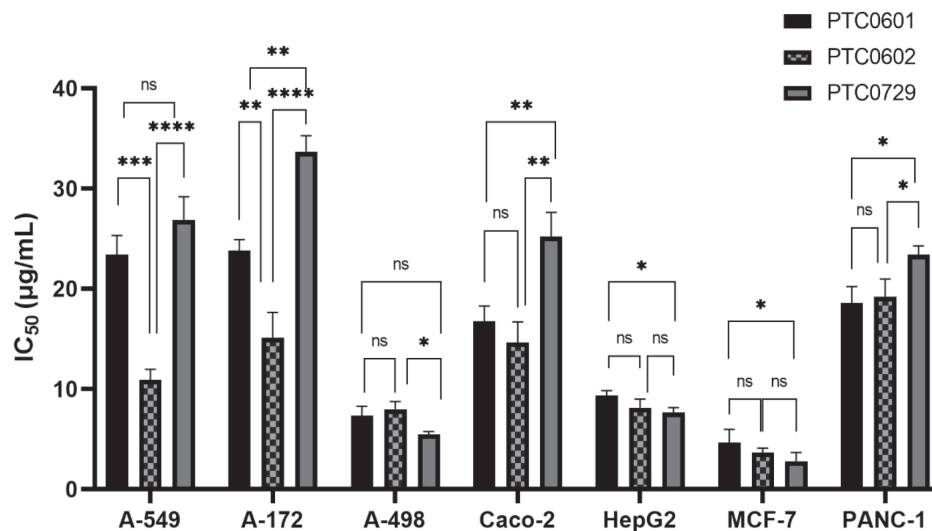
ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัด (% yield) THC และ CBD ในตัวอย่างกัญชา

รหัสตัวอย่างสารสกัด	Yield (%)	Total THC (%)	Total CBD (%)	THC: CBD
PTC0601	8.27	20.08	12.18	2: 1
PTC0602	7.10	38.03	3.55	10: 1
PTC0729	7.07	4.28	25.89	1: 6

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay

สารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 พันธุ์ สามารถยับยั้งหรือฆ่าเซลล์มะเร็งได้โดยมีค่าความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่ฆ่าเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด ได้มากกว่า 90% เทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่มีค่าต่ำกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด จะอยู่ในช่วง 0.78-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำค่าร้อยละการมีชีวิตและความเข้มข้นของสาร วิเคราะห์แบบ non-linear regression คำนวณค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้ง 7 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ยา doxorubicin ซึ่งเป็น positive control ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ อยู่ในช่วง 0.10-1.43 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า IC_{50} ของ PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์ MCF-7 ซึ่งมีค่าต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ เท่ากับ 4.67 ± 1.31 , 3.66 ± 0.43 และ 2.81 ± 0.85 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ A-498 ให้ค่า 7.35 ± 0.92 , 7.97 ± 0.79 และ 5.48 ± 0.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าในเซลล์ HepG2 เล็กน้อย ให้ค่าเท่ากับ 9.36 ± 0.48 , 8.13 ± 0.86 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ Caco-2 และ PANC-1 ให้ค่า IC_{50} ของสาร PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ใกล้เคียงกัน โดยในเซลล์ Caco-2 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.7 ± 1.50 , 14.65 ± 2.05 และ 25.21 ± 2.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ PANC-1 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 18.58 ± 1.65 , 19.19 ± 1.79 และ 23.40 ± 0.88 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ A-549 และ A-172 มีแนวโน้มที่จะถูกยับยั้งด้วยตัวอย่างสารสกัดที่มี THC สูงในเซลล์ A-549 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 23.41 ± 1.91 , 10.92 ± 1.05 และ 26.90 ± 2.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ A-172 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 23.81 ± 1.10 , 15.11 ± 2.52 และ 33.68 ± 1.59 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 3 พันธุ์โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test ดังแสดงในภาพที่ 1 สารสกัดกัญชาทั้ง 3 ชนิด มีพิษต่อเซลล์ MCF-7 สูงสุด (ให้ค่า IC_{50} ต่ำสุด) ซึ่งมีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างตัวอย่าง PTC0729 และ PTC0601 และระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสารสกัดทั้ง 3 พันธุ์ ยังมีความเหมือนกันในเซลล์ HepG2 ($p < 0.05$ ระหว่างตัวอย่าง PTC0729 และ PTC0601) ส่วนในเซลล์ A-549 A-172 และ Caco-2 สารสกัด PTC0602 ให้ค่า IC_{50} ต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสองชนิด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$ และ $p < 0.005$) เมื่อเทียบกับสารสกัด PTC0729



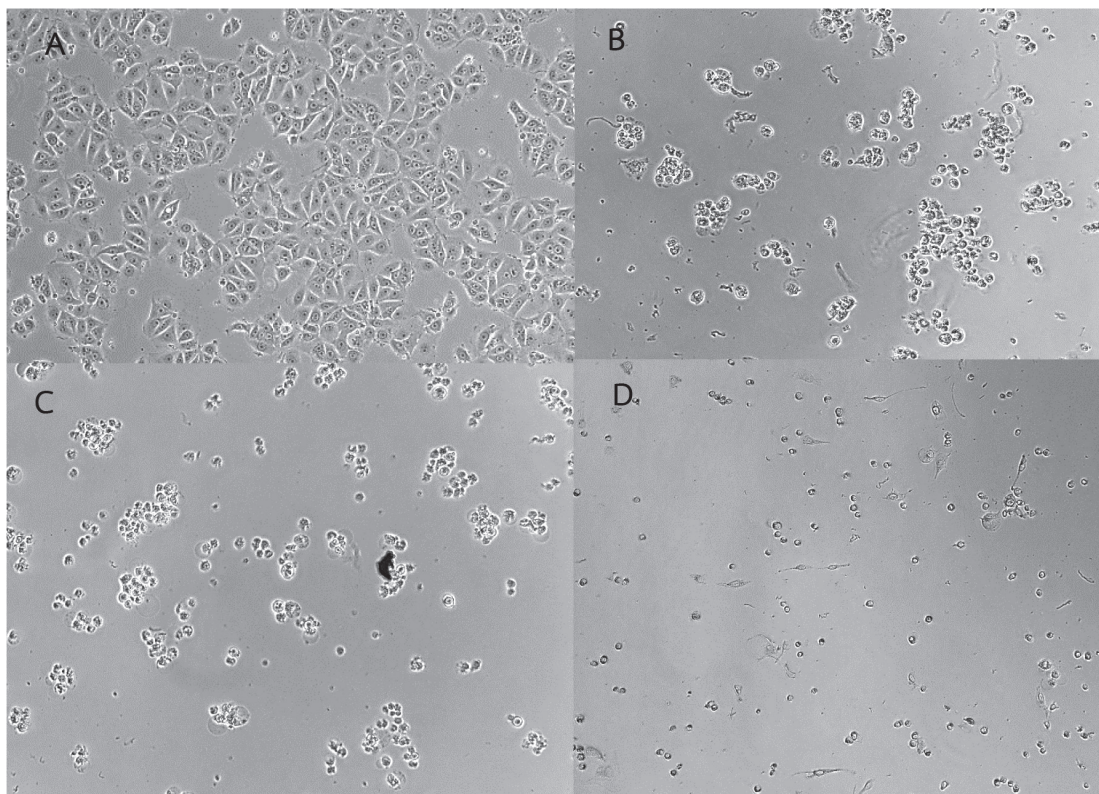
ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดกัญชาไทย PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 7 ชนิด ค่า IC₅₀ แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสารในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test (ns = not significant, *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 และ ****p < 0.0001)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 กลุ่มควบคุมและหลังการบ่มในสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า จะเห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์ควบคุมซึ่งไม่เติมสารทดสอบเซลล์มีรูปร่างปกติแบบเซลล์เยื่อ (epithelial-like) มีหัวท้าย รูปเหลี่ยม สามารถสังเกตเห็นขอบเขตเซลล์และนิวเคลียส มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณร้อยละ 75-80 ของพื้นที่ ส่วนเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดกัญชาทั้ง 3 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้เซลล์ตาย (เซลล์ตายประมาณร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้เซลล์หดตัว ลักษณะกลมผิวขรุขระ เกาะกลุ่มหรือเป็นเซลล์เดี่ยวทั้งบนผิวขวดเลี้ยงเซลล์และในอาหารเลี้ยง โดยในสารสกัด PTC0601 และ PTC0602 เซลล์ที่ตรวจพบจะมีลักษณะคล้ายกันเป็นกลุ่มเซลล์หดตัว กระจายบนพื้นผิวขวดน้อยกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ ส่วนสารสกัด PTC0729 จะเห็นเซลล์หดตัวกลม ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว กระจายตัวน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดกัญชา PTC0601 PTC0602 PTC0729 และยา Doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 7 ชนิด

Cell lines	IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)*			
	PTC0601	PTC0602	PTC0729	Doxorubicin
A-549	23.41 ± 1.91	10.92 ± 1.05	26.90 ± 2.27	0.18 ± 0.04
A-172	23.8 ± 1.10	15.11 ± 2.52	33.68 ± 1.59	0.44 ± 0.15
A-498	7.35 ± 0.92	7.97 ± 0.79	5.48 ± 0.27	0.16 ± 0.01
Caco-2	16.77 ± 1.50	14.65 ± 2.05	25.21 ± 2.41	1.43 ± 0.02
HepG2	9.36 ± 0.48	8.13 ± 0.86	7.65 ± 0.49	0.15 ± 0.03
MCF-7	4.67 ± 1.31	3.66 ± 0.43	2.81 ± 0.85	0.10 ± 0.01
PANC-1	18.58 ± 1.65	19.19 ± 1.79	23.40 ± 0.88	0.31 ± 0.01

*ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 กลุ่มควบคุมและหลังการบ่มกับสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า (A) ภาพเซลล์กลุ่มควบคุม (B) ภาพเซลล์ที่ทดสอบกับสาร PTC0601 (C) ภาพเซลล์ที่ทดสอบกับสาร PTC0602 และ (D) ภาพเซลล์ที่ทดสอบกับสาร PTC0729

วิจารณ์

สารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 ตัวอย่าง สกัดได้จากกัญชาที่มีปริมาณสารแคนนาบินอยด์ THC และ CBD แตกต่างกันด้วยวิธี HPLC สารสกัด PTC0602 มีปริมาณ THC สูงกว่า (THC: CBD = 10:1) ส่วน PTC0729 มีปริมาณ CBD สูงกว่า (THC: CBD = 1:6) และ PTC0601 เป็นพันธุ์ THC และ CBD ใกล้เคียงกัน (THC: CBD = 2:1) จากการผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสารสกัดกัญชาสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิดได้ดี โดยมีประสิทธิภาพสูงสุด 3 อันดับแรก ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งไต (A-498) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) สารสกัด PTC0729 ซึ่งเป็นตัวอย่างกัญชาที่มีปริมาณ CBD สูง มีความจำเพาะและเป็นพิษสูงสุดให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PTC0601 หรือ PTC0602 พบว่ามีปริมาณ CBD ต่ำกว่า สอดคล้องกับรายงานการทดสอบ CBD สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด ErbB2-positive โดยการกระตุ้นการแสดงออกของ cannabinoid receptor 2 (CB2), ELK1, Tyrosine kinase C-Src TRPV1 ยับยั้งการเจริญของเซลล์⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ตามมีการรวบรวมงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า CBD ยับยั้งเซลล์มะเร็งสมอง (U87-MG, T98G, SF126, U251MG) อย่างได้ผล โดยยับยั้งการเจริญและการรุกราน (invasion) ของเซลล์⁽¹¹⁾ ส่วนสารสกัด PTC0602 ซึ่งมีปริมาณ THC สูง จะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (A-549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) เซลล์มะเร็งสมอง (A-172) และมะเร็งตับอ่อน (PANC-1) ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า PTC0601 และ PTC0729 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลอง

จะสังเกตได้ว่าสารสกัด PTC0601 ซึ่งมีสัดส่วนของ THC และ CBD ใกล้เคียงกันไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดใดเลย หากกลไกในการต้านมะเร็งของสารสกัดกัญชาผ่านการแสดงออกของ CB1 และ CB2 เป็นหลัก CBD ซึ่งปกติกลไกการออกฤทธิ์จะไม่ได้เข้าจับกับ CB1 โดยตรง แต่จะทำตัวเป็น competitor ขัดขวาง THC ในการจับกับเซลล์ตัวรับ⁽¹⁹⁾ ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลง อย่างไรก็ตามในสารสกัดกัญชายังมีสารอื่นๆ นอกจากสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์มะเร็ง จากฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายาต้านมะเร็งต่อไปได้ รวมถึงควรมีการศึกษาพิษวิทยาในสัตว์ทดลองเพื่อให้เกิดความปลอดภัย น่าเชื่อถือ เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการศึกษาวิจัยหรือพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุป

สารสกัดช่อดอกของกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC : CBD=2 : 1), PTC0602 (THC: CBD=10 : 1) และ PTC0729 (THC : CBD=1: 6) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด โดย PTC0729 ซึ่งมีปริมาณ CBD สูง มีความจำเพาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งไต (A-498) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วน PTC0602 ซึ่งมีปริมาณ THC สูง แสดงความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (A-549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) เซลล์มะเร็งสมอง (A-172) และมะเร็งตับอ่อน (PANC-1) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.92 ± 1.05 , 14.65 ± 2.05 , 15.11 ± 2.52 และ 19.19 ± 1.79 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ PTC0601 มีพิษต่อเซลล์เฉพาะเลี้ยงแต่ไม่จำเพาะกับเซลล์ใด จะเห็นได้ว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้ เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในช่อดอกกัญชา ซึ่งยังจัดเป็นยาเสพติด ดังนั้นผลการทดลองไม่ได้สะท้อนไปถึงการใช้ส่วนอื่นๆ ของกัญชา ซึ่งผู้วิจัยจะมีการศึกษาส่วนต่างๆ ของกัญชา เช่น ใบ กิ่ง ก้าน ลำต้น ราก ของกัญชาและเมล็ดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืชในการจัดหาตัวอย่างกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 ตัวอย่าง ภก. เสกสรรค์ บัวเบา เจ้าหน้าที่ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรในการวิเคราะห์ปริมาณสารทางเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. National Cancer Institute. Cancer statistics. [online]. 2020; [cited 2021 Jun 30]; [4 screens]. Available from : URL : <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
2. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2562). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนที่ 19 ก (วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562). หน้า 1.
3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 290 ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
4. Bangkok Post. Thai cannabis market worth B21bn by 2024. [online]. 2019; [cited 2021 Jun 30]; [2 screens]. Available from : URL : <https://www.bangkokpost.com/business/1674900/thai-cannabis-market-worth-b21bn-by-2024>.

5. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4) : 405-35.
6. Piomelli D, Russo EB. The Cannabis sativa versus Cannabis indica debate : an interview with Ethan Russo, MD. Cannabis Cannabinoid Res 2016; 1(1) : 44-6.
7. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliatalata-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids : a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12) : 1357-92.
8. Moreau M, Ibeh U, Decosmo K, Bih N, Yasmin-Karim S, Toyang N, et al. Flavonoid derivative of Cannabis demonstrates therapeutic potential in preclinical models of metastatic pancreatic cancer. Front Oncol 2019; 9 : 660. (9 pages).
9. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabis sativa : a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. J Ethnopharmacol 2018; 227 : 300-15.
10. ศรายุทธ รัตตพงษ์, พรราว ศุภจริยาวัตร, เมธิณ ผดุงกิจ.ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา. ว กรมวิทย์ พ 2564; 63(1) : 219-32.
11. Daris B, Verboten MT, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment : therapeutic potential and legislation. Bosn J Basic Med Sci 2019; 19(1) : 14-23.
12. Zhelyazkova M, Kirilov B, Momkov G. The pharmacological basis for application of cannabidiol in cancer chemotherapy. Pharmacia 2020; 67(4) : 239-52.
13. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer : current status and future implications. Oncotarget 2014; 5(15) : 5852-72.
14. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Endocannabinoids and cancer. Handb Exp Pharmacol 2015; 231 : 449-72.
15. American Cancer Society. Marijuana and cancer. [online]. 2020; [cited 2021 Jun 30]; [9 screens]. Available from : URL : <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/complementary-and-alternative-medicine/marijuana-and-cancer.html>.
16. ส. สุทธิพันธ์. กัญชา สรรพยาแห่งความหวัง. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 5 พ.ย. 2563]; [23 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : https://www.satapornbooks.co.th/imgadmins/product_pdf/201910_01_Kaancha.pdf.
17. กัญชากัญชา.COM. รวบรวมทะเบียน “กัญชาพันธุ์ไทย” อีก 4 พันธุ์ พร้อมใช้ประโยชน์ทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 30 มิ.ย. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.xn--12carlcod7zem.com/31/599/>.
18. Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Pérez-Gómez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, et al. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. Mol Cancer 2010; 9:196. (11 pages).
19. Lu HC, Mackie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. Biol Psychiatry 2016; 79(7) : 516-25.

Investigation of the Cytotoxicity of Thai Cannabis Extracts on Various Cancer Cell Lines

Sarayut Radapong¹ Praw Suppajariyawat¹ Tiyanee Sahad¹ Nathaphat Harnkit¹
Kanchariya Phankhajon¹ Phatipan Primprai¹ Phichet Banyati¹ Siriwan Chaisomboonpan¹
Pornchai Sincharoenpokai¹ and Kenneth J Ritchie²

¹Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Muang, Nonthaburi 11000, Thailand

²Liverpool John Moores University, Byrom Street, Liverpool L3 3AF, United Kingdom

ABSTRACT Cannabis (*Cannabis sativa* L.) is an addictive plant. Currently, in Thailand, the plant is legalized for medical use and scientific research. It consists of two main active cannabinoids; Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), both of which report a wide range of pharmacological effects. This research aims to study the toxicity of Thai cannabis female inflorescence extracts on seven cancer cell lines. The three cannabis strains, namely PTC0601, PTC0602 (THC dominant) and PTC0729 (CBD dominant), were extracted using supercritical fluid extraction and then quantitatively analyzed using HPLC. Cytotoxicity was investigated by MTT assay. The results showed that all three extracts posed toxicity to all seven cancerous cell lines. PTC0729; (THC: CBD=1:6), demonstrated significantly different toxicity and specificity to breast cancer cell lines (MCF-7), renal carcinoma (A-498) and hepatocellular carcinoma (HepG2) with IC_{50} values of 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 and 7.65 ± 0.49 μ g/mL, respectively. PTC0602; (THC: CBD=10:1), showed specific toxicity against lung cancer cells (A-549), colon cancer cells (Caco-2), brain cancer cells (A-172) and pancreatic cancer (PANC-1) with IC_{50} values of 10.92 ± 1.05 , 14.65 ± 2.05 , 15.11 ± 2.52 and 19.19 ± 1.79 μ g/mL, respectively. Whereas, PTC0601 (THC: CBD=2:1) was cytotoxic but not specific to any cell lines. In conclusion, the three Thai cannabis extracts exhibited cytotoxicity towards several cancer cell lines and may have the potential to be developed as anti-cancer drugs.

Keywords: Thai cannabis, Cytotoxicity, Cancer cells, Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD)