



## โครงการวิจัย

เรื่องการศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ในต้นแบบสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Study of Anti-tumor Effects of Benja Amarit Recipe on

Cholangiocarcinoma Xenograft Model

โดย

รศ.ดร.พญ.รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย

ดร.ฤทธิเบศร์ ยาประเสริฐ

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งบประมาณจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทย

และการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

งบประมาณ ปี 2563

## บทคัดย่อ

ในประเทศไทยมะเร็งท่อน้ำดีมีอุบัติการณ์และความชุกสูงที่สุดในโลก โดยผู้ป่วยมากกว่าร้อยละเจ็ดสิบ ได้รับการแนะนำให้รักษาด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดเนื่องจากการวินิจฉัยโรคที่ล่าช้า อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมักต้องทนทุกข์ทรมานจากผลข้างเคียงของการรักษา อีกทั้งความชุกของการดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เพิ่มมากขึ้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาวิธีการใหม่หรือการบำบัดทางเลือกสำหรับการรักษา มะเร็งท่อน้ำดี

ตำรับยาเบญจอำมฤตย์เป็นสูตรสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคตับและลำไส้ใหญ่รวมทั้งการรักษา มะเร็งมานานกว่าศตวรรษในประเทศไทย ปัจจุบันมีการใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับในโรงพยาบาลแพทย์แผนไทยหลายแห่งและอยู่ระหว่างการทดลองทางคลินิกระยะที่ 2 อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้าน มะเร็งท่อน้ำดี ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการต้านมะเร็งท่อน้ำดีและรูปแบบการออกฤทธิ์ ของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในสัตว์ทดลอง

โดยทำการสกัดตำรับยาเบญจอำมฤตย์ด้วย 95% เอทานอล จากนั้นจึงวิเคราะห์สารประกอบทางเคมี ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) และลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS) พบว่า พิเพอริน (piperine) แซนโททอกซอล (xanthotoxol) และกรดไดไฮโดรแกมโบจิก (dihydrogambogic acid) เป็นองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่โดดเด่นของสารสกัดตำรับยาเบญจอำมฤตย์ การศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในต้นแบบสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ดำเนินการโดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดแพร่กระจายสูง (KKU-213) บริเวณใต้ผิวหนังของหนูไร้ขน (nude mice) และทำการให้สารสกัดที่ขนาด 25 และ 50 มก./กก. เป็นเวลา 20 วัน ผลการศึกษาพบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาตรเนื้องอกและน้ำหนักของเนื้องอกเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลดลงและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ใน ขณะเดียวกันสารสกัดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง อีกทั้งยังพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อ เซลล์เม็ดเลือด การทำหัตถ์ของไตและตับในสัตว์ทดลอง ผลของการย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) แสดงให้เห็นว่าพังผืดที่เกิดจากการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งภายในเนื้อเยื่อของเนื้องอกเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและมวลเนื้องอกที่ยังมีชีวิตลดลงเกือบ 80% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ รับสารสกัด การย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (IHC) พบว่าสารสกัดดังกล่าวช่วยเพิ่มระดับการแสดงออกของ โปรตีนโปร-อะพอพโทติก ได้แก่ Bax และ active Caspase-3 ในขณะที่ระดับการแสดงออกของโปรตีนแอนติ-อะพอพโทติก ได้แก่ Bcl-xL ลดลง ซึ่งให้เห็นว่าตำรับยาเบญจอำมฤตย์ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งท่อน้ำดีในสัตว์ทดลองโดยกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส สรุปได้ว่าตำรับยาเบญจอำมฤตย์มี ประสิทธิภาพสูงในการต้านมะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่มีผลข้างเคียงในต้นแบบหนูไร้ขนที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง ดังนั้น จึงพิจารณาได้ว่าสารสกัดตำรับยาเบญจอำมฤตย์มีศักยภาพสูงที่จะใช้เพื่อเป็นการแพทย์ทางเลือกในการรักษา ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

## Abstract

In Thailand, cholangiocarcinoma (CCA) is the highest incidence and prevalence of the world. More than seventy percent of CCA patients are recommended for chemotherapy due to its frequently late diagnosis. However, the patients always suffer from their adverse side effects and the increasing prevalence of chemotherapeutic resistance of CCA cells, which requires further study to develop the novel or alternative therapy for CCA treatment.

Benja Amarit recipe is a Thai traditional herbal formula which has been used for treating liver and colon diseases as well as cancer treatment for more than a century in Thailand. At the present, it is used in several Thai traditional hospitals for treatment of the liver cancer patients and are during clinical trial phase 2. However, the antitumor activity on CCA have not yet been investigated. In this study the *in vivo* anticancer potential of Benja Amarit recipe on CCA and their mode of actions have been demonstrated.

The recipe was extracted by 95% ethanol, then the phytochemical compounds were analyzed by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results revealed that piperine, xanthotoxol and dihydrogambogic acid were the dominant phytochemical constituents of Benja Amarit recipe extract. The antitumor potential *in vivo* was performed by using mice xenograft model. The high-invasive cholangiocarcinoma KKU-213 cell lines were inoculated subcutaneously in nude mice and then the mice were treated with the extract at 25 and 50 mg/kg for 20 days. The results showed that the increasing rate of tumor volume and tumor weight at the end of experiment in treatment groups were significantly lower and different from the control group. Meanwhile, the extract did not affect animal body weight and behavior. Additionally, it was found to be non-toxic to animal blood cells, kidney, and the liver functions. The results of hematoxylin and eosin (H&E) staining showed that fibrosis which was originated from cancer cells apoptosis within tumor tissue was significantly increased in treatment groups and almost 80% of the viable tumor mass was reduced when compared to the control. Moreover, immunohistochemistry (IHC) staining revealed that the extract increased the expression levels of pro-apoptotic Bax and active caspase 3 proteins in tumor tissue, while the expression levels of anti-apoptotic Bcl-xL protein was reduced. It indicated that the extract inhibited CCA growth *in vivo* by targeting apoptosis. In conclusion, Benja Amarit recipe exhibited the high effectiveness against cholangiocarcinoma without discernible side effects in nude mice

xenograft model. Therefore, Benja Amarit recipe extract is considered as a high potential alternative therapy for bile duct cancer patients.

