



ผลของคูซุโนคินินต่อระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม  
ในหนูขาว

Effect of Kusunokinin on the Protein levels Involved in Mammary  
Tumorigenesis Rats

ศิริณา ดอกดวง

Sirinapa Dokduang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Pharmacology

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ศรีวิริยะจันทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวศิริินภา ดอกดวง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวศิริินภา ดอกดวง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง เต้านมในหนูขาว
ผู้เขียน	นางสาวศิริินภา ดอกดวง
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2561

### บทคัดย่อ

สารคูชูโนคินินจัดอยู่ในกลุ่มลิแกแนน เป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส จากการศึกษาแบบ *in vivo* ในหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-Dawley พบว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารคูชูโนคินินได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารคูชูโนคินินในหนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Sprague-Dawley ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งเต้านมด้วยสารเอ็น-ไนโตรโซ-เอ็น-เมทิลยูเรีย (N-nitroso-N-methylurea หรือ NMU) โดยให้สารที่จะทดสอบกับหนูเมื่อพบก้อนมะเร็ง สารที่ให้ ได้แก่ สารคูชูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เป็นขนาดที่ไม่สามารถรักษามะเร็งได้) หรือยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้สารเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำตัวอย่างก้อนมะเร็งเต้านมมาศึกษาในระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัว กระบวนการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Western blot analysis โดยโปรตีนที่ทำการศึกษาประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, p-STAT5, STAT5 และ Wnt-4, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ ได้แก่ E2f-1 และ Cyclin D1, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือด ได้แก่ VEGF และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 จากผลการทดลองพบว่าสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Erk1/2 และลดระดับโปรตีน c-Src ได้ และยังมีแนวโน้มลดระดับโปรตีน PI3K, Akt และ E2f-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินเพียงชนิดเดียวและการให้ยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินินสามารถลดระดับโปรตีน p-Erk1/2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารคูชูโนคินินยังสามารถลดระดับโปรตีน VEGF

ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดได้อีกด้วย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าสารคิซุโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งโปรตีน E-cadherin และ MMP-9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นทำการยืนยันผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay จากการทดลองพบว่าสารคิซุโนคินินที่ความเข้มข้น 0.286 และ 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ MCF-7 ได้ โดยการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่ากลไกระดับโมเลกุลของสารคิซุโนคินินในการยับยั้งมะเร็งเต้านมอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งโปรตีนที่อยู่ในกระบวนการแบ่งตัวและกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยสารคิซุโนคินินไปลดระดับโปรตีน c-Src, p-Erk1/2, E-cadherin และ MMP-9 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสารคิซุโนคินินเป็นยารักษามะเร็งเต้านมชนิดจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายได้

<b>Thesis Title</b>	Effect of Kusunokinin on the Protein levels Involved in Mammary Tumorigenesis Rats
<b>Author</b>	Miss Sirinapa Dokduang
<b>Major Program</b>	Pharmacology
<b>Academic Year</b>	2018

### Abstract

Kusunokinin, a lignin compound from *Piper nigrum*, shows an antiproliferation and induction of apoptosis on breast cancer cells. Moreover, *in vivo* study found that kusunokinin inhibited the growth of tumor volume in Sprague-Dawley rats. However, the previous study provides insufficient data of molecular mechanism of kusunokinin. Therefore, this work was aimed to study the molecular mechanism of kusunokinin in N-nitroso-N-methylurea (NMU) induced mammary tumor Sprague-Dawley rats. After tumor was found, rats were treated with 7 and 14 mg/kg of kusunokinin or 0.5 mg/kg of doxorubicin (an ineffective dose) or the combination of 0.5 mg/kg doxorubicin with 7 mg/kg of kusunokinin for 14 days. Then, protein levels of cell cycle, proliferation, angiogenesis, and migration in mammary tumor tissue were investigated using Western blot analysis. Proteins in four pathways were determined including proliferation (c-Src, PI3K, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, p-STAT5, STAT5 and Wnt-4), cell cycle (E2f-1 and Cyclin D1), angiogenesis (VEGF) and migration (E-cadherin, MMP-2 and MMP-9). The results showed that 14 mg/kg of kusunokinin inhibited phosphorylation of Erk1/2 and c-Src, and tended to decrease protein levels of PI3K, Akt, and E2f-1 which were associated in cell cycle and proliferation. Surprisingly, doxorubicin alone and the combination with kusunokinin showed a significant difference in p-Erk1/2 protein. Furthermore, kusunokinin also reduced the protein level in angiogenesis, VEGF, but did not showed a significant different. For migration pathway, 14 mg/kg of kusunokinin showed significantly suppressed the protein levels of E-cadherin and MMP-9. Finally, the inhibition of cell migration of kusunokinin was confirmed in MCF-7 cells using Wound healing assay. The results showed that

kusunokinin at 0.286 and 0.571  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inhibited the migration of MCF-7 cells in a dose-dependent manner.

These results suggest that the molecular mechanism of kusunokinin, might be through the suppression of protein in proliferation and migration pathways via down-regulation of c-Src, p-Erk1/2, E-cadherin and MMP-9. The outcome from this study will be provided the necessary information of kusunokinin in developing a specific targets therapeutic drugs for breast cancer.



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ศรีวิริยะจันทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พจนพร ไกรดิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ตรวจสอบ แก้ไขโครงร่าง วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณ ดร. สุพรรณษา กังเซ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นริศรา ไล่เลิศ และรองศาสตราจารย์ ดร. เจษฎี แก้วศรีจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบ ตลอดจนแก้ไขความถูกต้องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ และขอขอบพระคุณ ดร. ศิริพร หมดหล้า ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร. อามารณ์ เทศอาเส็น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องสารสกัดชูโนคินิน และตัวอย่างก้อนมะเร็งเต้านมของหนูขาวใหญ่ ขอคุณนางสาวธิดารัตน์ รัตนบุรี นักศึกษาปริญญาเอก ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ตลอดจนบุคลากรประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนสามารถจัดทำวิทยานิพนธ์ได้จนสำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ศิริินภา ดอกดวง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(12)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อ และตัวย่อ	(15)
เนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 การตรวจสอบเอกสาร	4
1.2.1 มะเร็งเต้านม	4
1.2.2 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis)	16
1.2.3 ลิกแนน	32
1.3 วัตถุประสงค์	43
2. วิธีการวิจัย	
2.1 วิธีดำเนินการ	44
2.1.1 สารคูชูโนคินิน	44
2.1.2 ก้อนมะเร็งเต้านม	44
2.1.3 การศึกษาาระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยวิธี Western blot analysis	46
2.1.4 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	50
2.1.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม ด้วยวิธี Wound healing assay	51
2.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	53
2.2 วัสดุ และอุปกรณ์	53
2.2.1 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการสกัดโปรตีน	53

## สารบัญ (ต่อ)

เนื้อเรื่อง	หน้า
2.2.2 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis	54
2.2.3 วัสดุ อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay	57
<b>3. ผลการวิจัย</b>	
3.1 ฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมในหนูขาว	60
3.2 ผลการศึกษาระดับของโปรตีนเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งในระดับโมเลกุล ของสารคูชูโนคินินด้วยวิธี Western blot analysis	62
3.3.1 กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต	62
3.3.2 กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือด	73
3.3.3 กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์	75
3.3 ฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง ชนิด MCF-7	77
<b>4. บทวิจารณ์</b>	
4.1 กระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม	80
4.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งมะเร็งเต้านม	82
4.3 สารคูชูโนคินินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม	85
<b>5. บทสรุป และข้อเสนอแนะ</b>	
5.1 บทสรุป	91
5.2 ข้อเสนอแนะ	94
<b>บรรณานุกรม</b>	96
<b>ภาคผนวก</b>	105
ภาคผนวก ก.	106
ภาคผนวก ข.	110
ภาคผนวก ค.	111
<b>ประวัติผู้เขียน</b>	116

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สูตรยารักษามะเร็งเต้านม	8
2	กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม	12
3	กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาต้านฮอร์โมนที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม	15
4	กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาตรงเป้าที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม	15
5	ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารในกลุ่มลิกแนน	33
6	ก้อนมะเร็งเต้านมจากกลุ่มหนูทดลอง และการให้สารทดสอบ	45
7	ส่วนประกอบในเจลชั้น stacking และเจลชั้น separating สำหรับการเตรียม เจลขนาดใหญ่	47
8	ส่วนประกอบในเจลชั้น stacking และเจลชั้น separating สำหรับการเตรียม เจลขนาดเล็ก	48
9	อัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (primary antibody) แอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ระยะเวลาในการบ่มเมมเบรนด้วยแอนติบอดี และวิธีการ ดีเทคโปรตีน	52
10	สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการสกัดโปรตีน	53
11	สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis	54
12	แอนติบอดีต่อโปรตีนเป้าหมายที่ใช้ใน Western blot analysis	57
13	เซลล์เพาะเลี้ยง สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการศึกษา การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay	58
14	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารคูซูโนคินินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง เต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	78
15	ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ MCF-7	110

## รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	วัฏจักรของเซลล์	18
2	การควบคุมการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์โดยเอนไซม์ CDKs	19
3	ขั้นตอนการเกิดมะเร็ง	20
4	กระบวนการเกิดมะเร็ง	22
5	วิธีการส่งสัญญาณของโมเลกุล Akt ส่งผลให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ในมะเร็งเต้านม	23
6	กระบวนการเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส	25
7	การแบ่งตัวและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งภายในท่อน้ำนม	26
8	วิธีการส่งสัญญาณที่ส่งผลให้เกิดกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง	28
9	กระบวนการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์โดยโปรตีน VEGF	29
10	วิธีการส่งสัญญาณ JAK/STAT	30
11	สูตรโครงสร้างของสารลิกแนน	32
12	สูตรโครงสร้างสารคูชูโนคินิน	36
13	สูตรโครงสร้างสารโพลีฟอสโฟไทโรซีนและอนุพันธ์	38
14	สูตรโครงสร้างสารยาเตอีน	39
15	สูตรโครงสร้างสารฮิโนคินิน	40
16	สูตรโครงสร้างสารคูบีบิน	40
17	สูตรโครงสร้างสารเบอซีเฮอนิน	41
18	สูตรโครงสร้างยาเคมีบำบัดชนิดอีโทโพไซด์	42
19	สูตรโครงสร้างยาเคมีบำบัดชนิดเทนิโพไซด์	42
20	กราฟแสดงร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมของสารคูชูโนคินิน ในหนูกลุ่มต่าง ๆ	61
21	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน c-Src, PI3K และ Akt	64
22	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน p-Erk และ Erk1/2	66
23	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน p-STAT5 และ STAT5	68
24	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน Wnt-4	70
25	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน E2f-1 และ Cyclin D1	72
26	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน VEGF	74
27	ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9	76

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
28	ผลของสารคูชูโนคินินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	79
29	กลไกการเกิดมะเร็งเต้านมในระดับโมเลกุล	87
30	กลไกการต้านมะเร็งเต้านมในระดับโมเลกุลของสารคูชูโนคินิน	88
31	กลไกการต้านมะเร็งเต้านมในระดับโมเลกุลของสารไดเมธิลพิโนเรซินอล, ซัวซิโนน และสารแมกโนลอล เมื่อเทียบกับสารคูชูโนคินิน	89
32	การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนภายในหนูกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับตัวทำลาย	90
33	กลไกการออกฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินในการยับยั้งมะเร็งเต้านมในหนูขาว	93
34	การอ่านค่า $Z_{\alpha 2}$ จากตารางทางสถิติ Z	112
35	การอ่านค่า $Z_{\beta}$ จากตารางทางสถิติ Z	114

### สัญลักษณ์ตัวย่อ และคำย่อ

Akt	=	Protein kinase B (PKB)
AMPK	=	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANOVA	=	Analysis of variance
APC	=	Adenomatous polyposis coli
APS	=	Ammonium persulfate
ATM	=	Ataxia telangiectasia mutated
Bad	=	Bcl-2-associated death promoter
Bax	=	Bcl-2-associated X protein
Bcl <sub>2</sub>	=	B-cell lymphoma 2 protein
Bid	=	Bcl-2 Homology 3 interacting-domain death agonist
BRCA1	=	Breast cancer type 1 susceptibility
BRCA2	=	Breast cancer type 2 susceptibility
BSA	=	Bovine serum albumin
CDK	=	Cyclin dependent kinase
c-Myc	=	Cellular myelocytomatosis
CtIP	=	carboxy terminal binding protein-interacting protein
Cyt-C	=	Cytochrome C protein
c-Src	=	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
E2f-1	=	E2F transcription factor 1
ED <sub>50</sub>	=	Effective dose 50
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	=	Epidermal growth factor receptor
Elk1	=	ETS transcription factor
EMT	=	Epithelial mesenchymal transition
ER	=	Estrogen receptor
Erk	=	Extracellular signal-regulated kinases protein
FADD	=	Fas associated death domain protein

### สัญลักษณ์ตัวย่อ และคำย่อ (ต่อ)

FMS	=	Feline McDonough sarcoma protein
GAPDH	=	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gsk3 $\beta$	=	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HAT	=	Histone acetyltransferase
HDAC	=	Histone deacetylase
HER2	=	Human epidermal growth factor receptor 2
HRP	=	Horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	=	Half maximal inhibitory concentration
IGF	=	Insulin-like growth factor
ISRE	=	Interferon-stimulated response element
Jak	=	Janus kinase
MAP	=	Mitogen-activated protein
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	=	Mouse double minute 2 homolog
MEKK	=	Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MMP-2	=	Matrix metalloproteinase-2
MMP-9	=	Matrix metalloproteinase-9
mTOR	=	Mammalian target of rapamycin
NMU	=	N-nitroso-N-methylurea
PCNA	=	Proliferating cell nuclear antigen
p21	=	Cyclin-dependent kinase inhibitor 21 protein
p53	=	Tumor protein p53 protein
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	Phosphate buffer saline
PDGF	=	Platelet-derived growth factor
PDK1	=	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PFPE	=	Piperine free <i>Piper nigrum</i> extract



**สัญลักษณ์ตัวย่อ และคำย่อ (ต่อ)**

PI3K	=	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	=	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	=	Phosphatidylinositol-3,4,5-tris phosphate
PR	=	Progesterone receptor
Rb-1	=	Retinoblastoma protein 1
Rheb	=	Ras homolog enriched in brain
RPMI 1640	=	Roswell Park Memorial Institute 1640
SD	=	Standard deviation
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SEM	=	Standard error of mean
STAT	=	Signal transducer and activators of transcription
tBid	=	Truncated Bcl-2 Homology 3 interacting-domain death agonist
TMED	=	Tetramethylethylenediamine
TNBC	=	Triple-negative breast cancer
TNF	=	Tumor necrosis factor
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็งเต้านมเกิดจากเซลล์ที่อยู่ภายในท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำนมมีการแบ่งตัวผิดปกติจนร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ และมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะใกล้เคียง เช่น ต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ หรืออวัยวะที่ไกลออกไป เช่น กระดูก ปอด ตับ และสมอง เป็นต้น ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมาพบแพทย์ด้วยปัญหาก่อนที่เต้านม ผิวหนังบริเวณหน้าอกมีรอยบวมหนาคล้ายเปลือกส้ม หัวนมแดงผิดปกติ และมีสารคัดหลั่งไหลออกจากหัวนม จากการสำรวจของประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2018 พบว่าใน 1 ปี จะมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ถึง 266,120 ราย และเสียชีวิตปีละ 40,920 ราย (American Cancer Society, 2018) ในปัจจุบันการรักษามะเร็งเต้านมประกอบด้วย 5 วิธีหลัก ได้แก่ 1) การผ่าตัดเต้านมและการเลาะเอาต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ออก (Radical mastectomy) 2) การรักษาโดยการฉายรังสี (Radiation) 3) การให้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) 4) การให้ยาต้านฮอร์โมน (Hormonal therapy) และ 5) การให้ยาตรงเป้า (Targeted therapy) จากการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยยาเคมีบำบัด พบว่าผู้ป่วยมักได้รับผลข้างเคียงที่รุนแรง เช่น ยาออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงของไขกระดูก ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำเป็นผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อได้ง่าย และมีโอกาสเสียชีวิตจากพิษของยาเคมีบำบัดในขนาดสูง เป็นต้น (ศิริมาศ กาจนวนาศ และ วิจิตรา ทักนียกุล, 2551) ซึ่งส่งผลให้การรักษาโรคมะเร็งเต้านมมักไม่ประสบผลสำเร็จ

ในปัจจุบันมีการนำสารจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมาศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น สารในกลุ่มลิกแนน (lignan) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเกิดจากการจับคู่กันของหน่วยย่อยฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) จับกับหมู่ที่มีคุณสมบัติทางเคมีและหน้าที่เฉพาะ ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Wilson et al., 2012) เช่น สารซีโคไอโซลาริซิเรซินอล (secoisolariciresinol) และสารเอนเทอโรแลคโตน (enterolactone) จากเมล็ดจากต้นลินิน (*Linum usitatissimum*) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231 และ SKBR3 (Di Y et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบว่าสารเอนเทอโรแลคโตนที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเฉพาะเลี้ยงชนิด PC-3, DU-145 และ LNCaP ได้ (Lin et al., 2001) สารชิแซนดริน (schizandrin) ที่แยกได้จากผลของ *Schisandra chinensis* สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ  $G_0/G_1$  เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มระดับโปรตีน p21 และ p27 และลดระดับโปรตีน Cyclin D1, Cyclin A, CDK2 และ CDK4 (Jack et al., 2009) สารเซซามิน (sesamin) จากเมล็ดงา (*Sesamum indicum* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด MCF-7

โดยทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ  $G_1$  ของวัฏจักรเซลล์ และเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยการเพิ่มระดับโปรตีน bax, caspase-3 และ p53 (Siao et al., 2015) สารเอนเทอโรแลคโตนขนาด 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ จากเมล็ดแฟลกซ์ (flaxseed) ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 โดยการลดระดับโปรตีน MMP-2, MMP-9 และ MMP-14 (Mali et al., 2012) ในการศึกษาของ Sriwiryajan และคณะในปี 2017 ได้แยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดจากพริกไทยดำที่ปราศจากพิเพอริน (piperine free *P. nigrum* extract; PFPE) ได้สารคูซูนอกินิน (kusunokinin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มลิกันแนน (Sriwiryajan et al., 2017) โดยสารคูซูนอกินินสามารถสกัดได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Aristolochia cymbifera*, *Wikstromia indica*, *Haplophyllum vulcanicum* และ *Wikstroemia sikokiana* (Awale et al., 2014; Belkis et al., 1996; Tomoya et al., 2000)

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารคูซูนอกินิน พบว่ามีความเป็นพิษต่อปรสิตชนิด *Trypanosome cruzi* โดยไม่ส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Sartorelli et al., 2010) โครงสร้างสารคูซูนอกินินประกอบด้วยวงเบนซีน (benzene) และหมู่เมทอกซี (methoxy) ซึ่งใกล้เคียงกับโครงสร้างของยารักษามะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ยาเคมีบำบัดชนิดอีโทโปไซด์ (etoposide) และยาเคมีบำบัดชนิดเทนิโปไซด์ (teniposide) (Wilson et al., 2012) และคล้ายกับสารจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น สารฮิโนคินิน (hinokinin) จากพืช *Anthriscus sylvestris* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด B16-F10 เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเพาะเลี้ยงชนิด MK-1 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 2.72, 2.58 และ 1.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Ikeda et al., 1998) สารคูบีบิน (cubebin) จากพืช *Piper cubeba* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงชนิด A549 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด KB โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 8.30, 8.66 และ 8.16 ตามลำดับ (Rajalekshmi et al., 2016) ทั้งนี้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสารคูซูนอกินินที่แยกได้จากพริกไทยดำมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และ MDA-MB-468 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 4.37 และ 3.19 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารคูซูนอกินินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยลดระดับโปรตีน topoisomerase II เพิ่มระดับโปรตีน p21 และชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยลดระดับโปรตีน bcl-2 และเพิ่มระดับโปรตีน p53, bax, cytochrome c, caspase cleaved-7 และ caspase cleaved-8 (Sriwiryajan et al., 2017)

นอกจากนี้จากรายงานวิจัยยังทำให้ทราบว่าสารคูซูนอกินินมีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Sriwiryajan et al., 2017) จึงนำมาสู่การทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยใช้สารโนโตรโซเมทิล-

ยูเรีย (N-Nitroso-N-methylurea; NMU) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านมในหนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Sprague Dawley หลังจากนั้นให้สารคูชูโนคินินความเข้มข้นต่าง ๆ ตามแต่ละกลุ่มเป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงติดตามผลในการยับยั้งมะเร็งเต้านมของสารคูชูโนคินินในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าสารคูชูโนคินินสามารถลดขนาดก้อนมะเร็งเต้านมในหนูขาวใหญ่ และลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตได้ (อามานร์ เทศอาเส็น, 2561) ในการศึกษาครั้งนี้จึงจะศึกษากลไกในการยับยั้งมะเร็งเต้านมของสารคูชูโนคินินเพิ่มเติม โดยจะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ และศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารคูชูโนคินินเป็นยารักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมต่อไปในอนาคต

## 1.2 การตรวจเอกซเรย์

### 1.2.1 มะเร็งเต้านม

มะเร็งเต้านมสามารถพบได้บ่อย และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ในประชากรเพศหญิง จากการสำรวจของประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2018 พบว่าใน 1 ปีจะมีผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ถึง 266,120 รายและเสียชีวิตปีละ 40,920 ราย (American Cancer Society, 2018) สำหรับในประเทศไทยมะเร็งเต้านมเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอย่างหนึ่ง จากสถิติผู้ป่วยมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าในผู้ป่วยเพศหญิงเป็นมะเร็งเต้านมสูงถึงร้อยละ 39.43 จากจำนวนผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2559)

พยาธิกำเนิดของมะเร็งเต้านมปัจจุบันคาดว่าขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ได้แก่ (1) อายุเมื่อเริ่มมีรอบเดือน โดยในหญิงที่เริ่มมีรอบเดือนเร็ว และช่วงห่างของแต่ละรอบเดือนปกติมาเร็ว จะมีความเสี่ยงของมะเร็งเต้านมเป็น 4 เท่าของหญิงที่เริ่มมีรอบเดือนช้า (2) พันธุกรรม มีรายงานวิจัยพบว่าบุคคลที่มีคนในครอบครัวเป็นมะเร็งเต้านมจะมีความเสี่ยงในการเป็นโรครถึง 5 เท่าของบุคคลที่ไม่มีประวัติ และจากการศึกษาต่อมาพบว่าในผู้ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *BRCA1* จะมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านมถึงร้อยละ 85 ส่วนการกลายพันธุ์ที่ยีน *BRCA2* จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมและรังไข่ (วิระพล ภิมาลย์, 2555) ส่วนปัจจัยที่เปลี่ยนแปลงได้คือ สิ่งแวดล้อมและการดำเนินชีวิต เช่น การปรุงอาหารด้วยวิธี ปิ้ง ย่าง รมควัน และทอด จะทำให้เกิดสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) โดยมีรายงานการวิจัยพบว่าสาร PAH กลุ่มเบนโซไพรีน (benzopyrene) สามารถก่อให้เกิดมะเร็ง (ภรณ์ เหล่าอิทธิ และ นภา ปริญญานิติกุล, 2559) นอกจากนี้การดื่มแอลกอฮอล์จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มระดับของเอสตราไดโอล (estradiol) ในกระแสเลือดทำให้เซลล์ตับผิดปกติ ส่งผลให้ตับไม่สามารถทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารก่อมะเร็งให้อยู่ในรูปที่ไม่ทำงานได้ ดังนั้นกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งให้อยู่ในรูปหมดฤทธิ์จึงลดน้อยลง

สามารถจัดประเภทของมะเร็งเต้านมโดยแบ่งตามตามสถานะของรีเซพเตอร์ (receptors' status) ได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้ (1) Luminal A คือ เซลล์มะเร็งที่มีเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ (estrogen receptor; ER) มี/ไม่มีโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ (progesterone receptor; PR) และไม่มีฮิวแมนเอพิเดอร์มัลโกรทแฟคเตอร์ทูรีเซพเตอร์ (human epidermal growth Receptor 2; HER2) (2) Luminal B คือ เซลล์มะเร็งที่มี ER และ HER2 และมี/ไม่มี PR (3) Basal คือ เซลล์มะเร็งที่ไม่มี ER, PR และ HER2 (4) HER2 คือ เซลล์มะเร็งที่ไม่มี ER และ PR และมี HER2 (ภรณ์ เหล่าอิทธิ และ นภา ปริญญานิติกุล, 2559)

### 1.2.1.1 การรักษามะเร็งเต้านม

การรักษามะเร็งเต้านมแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลัก ได้แก่ (1) การผ่าตัด (2) การรักษาด้วยวิธีอื่นเสริมหลังการผ่าตัด

#### 1) การผ่าตัด (Surgery)

การผ่าตัดเพื่อรักษามะเร็งเต้านม แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ การผ่าตัดเพื่อป้องกันโรคมะเร็งที่อาจเกิดการลุกลาม (prevention of cancer) และการผ่าตัดเพื่อการรักษาโรค (treatment of cancer) ในปัจจุบันการผ่าตัดมะเร็งเต้านมแบ่งได้เป็น 3 วิธี ได้แก่

ก. การผ่าตัดที่เนื้อเต้านม (Mastectomy) แบ่งได้เป็น 2 วิธี ได้แก่ (1) การตัดเต้านมออกทั้งเต้า (Total or Simple mastectomy) คือ การผ่าตัดเอาเต้านมออกทั้งหมด (รวมผิวหนังส่วนที่อยู่เหนือก้อนมะเร็งและหัวนมด้วย) แพทย์มักเลือกใช้กับผู้ป่วยที่ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ มีก้อนมะเร็งหลายก้อนและเต้านมมีขนาดเล็ก (2) การตัดเต้านมออกเพียงบางส่วน (Partial mastectomy or Breast-conserving surgery) คือ การตัดก้อนมะเร็งและเนื้อของเต้านมปกติที่อยู่รอบก้อนมะเร็ง โดยตัดห่างจากขอบของก้อนมะเร็งประมาณ 1-2 เซนติเมตร โดยมากจะยังคงเหลือหัวนม ฐานหัวนมและเนื้อเต้านม ส่วนใหญ่จะใช้วิธีนี้ในรายที่มะเร็งมีขนาดเล็ก หรือมีมะเร็งเพียงตำแหน่งเดียว หรือเต้านมมีขนาดใหญ่พอสมควร (อดุลย์ รัตนวิจิตราศิลป์ และ นิตย์ ศุภะพงษ์, 2547)

ข. การผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ (Axillary lymph node surgery) การผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้มีวัตถุประสงค์เพื่อดูการแพร่กระจายของโรค และเพื่อนำมะเร็งที่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองออก ในปัจจุบันการผ่าตัดต่อมน้ำเหลือง มี 2 วิธี คือ (1) การผ่าตัดเลาะต่อมน้ำเหลือง (Axillary lymph node dissection) เป็นการผ่าตัดนำต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ออกมาทั้งหมด โดยการเลาะต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้จะเลาะทั้ง 3 ระดับ (ตำแหน่งของต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ ระดับที่ I จะอยู่ด้านข้างของกล้ามเนื้อหน้าอกมัดเล็ก, ระดับที่ II จะอยู่บนกล้ามเนื้อหน้าอกมัดเล็ก และระดับที่ III จะอยู่ตรงกลางของกล้ามเนื้อมัดเล็ก) (2) การผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองเซนติเนล (Sentinel lymph node biopsy) เป็นการผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองเซนติเนลออกไปตรวจหาการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยการฉีดสี isosulfan blue ความเข้มข้นร้อยละ 1 ไปที่ก้อนมะเร็งแล้วจึงผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองเซนติเนลออก (อดุลย์ รัตนวิจิตราศิลป์ และ นิตย์ ศุภะพงษ์, 2547)

ค. การผ่าตัดเพื่อเสริมหรือแก้ไขความบกพร่องของเต้านม (oncoplastic breast reconstruction) เป็นวิธีการผ่าตัดมะเร็งเต้านม โดยผสมผสานการผ่าตัดมะเร็งเต้านมออก

(oncologic ablative technique) เข้ากับวิธีการสร้างเต้านมใหม่ (reconstructive technique) เพื่อแก้ไขเต้านมที่มีลักษณะผิดปกติ (breast deformity) และความไม่สมมาตร (asymmetry) ที่เกิดจากการผ่าตัดเต้านมออก โดยใช้วิธีการยืดขยายเนื้อเยื่อ (Tissue expander) โดยการใส่เต้านมเทียม (breast implants) หรือวิธีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อของตนเอง (Autologoustissue) (วิชญ์ โล่ห์สิริวัฒน์ และ ศุภกร โรจนนินทร์, 2552)

## 2) การรักษาด้วยวิธีอื่นเสริมหลังการผ่าตัด (Adjuvant therapy)

ก. ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) จะใช้วิธีนี้เมื่อพบว่าก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 1 เซนติเมตรและ/หรือมีการกระจายของมะเร็งไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ ซึ่งการให้ยาเคมีบำบัดจะมีสูตรยาหลายสูตร มีทั้งแบบใช้ยาตัวเดียวหรือยาหลายตัวผสมกัน โดยหลักการเลือกใช้ยาร่วมกันหลายตัวนั้นจะเลือกใช้ยาที่มีฤทธิ์ทำลายมะเร็งได้สูง ลดการกลับเป็นซ้ำ และมีการดื้อยาน้อย สูตรที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ ไซโคลฟอสฟาไมด์ (cyclophosphamide), เมโทเทรกเซท (methotrexate) และฟลูออโรยูราซิล (fluorouracil) เรียกสูตรนี้ว่า “CMF” (วิระพล ภิมาลย์, 2555) แสดงสูตรการให้ยารักษา กลไกการออกฤทธิ์ และผลข้างเคียงของยาในตารางที่ 1 และ 2

ข. การฉายรังสี (Radiation) ทำเมื่อพบว่าก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร มีการกระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้มากกว่า 4 ต่อมนขึ้นไป หรือขอบขึ้นเนื้อที่ผ่าตัดออกไปยังมีเซลล์มะเร็งอยู่ รังสีที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น X-beam และ electron beam เป็นต้น โดยรังสีจะไปทำให้เซลล์บริเวณที่ฉายรังสีตาย ส่งผลให้ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กลง แต่ข้อเสียของการรักษาด้วยวิธีนี้ คือ ทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ปกติ อาจส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดอาการข้างเคียง เช่น เกิดการระคายเคืองผิวหนังบริเวณที่ฉายรังสีและปวดบริเวณเต้านม เป็นต้น (เอี่ยมแข สุขประเสริฐ, 2554)

ค. ยาต้านฮอร์โมน (Hormonal therapy) เป็นการรักษาโดยอาศัยหลักการในการขัดขวางการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนที่จะไปกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโต ดังนั้นผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน ควรเป็นกลุ่มที่มีเซลล์ที่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมน ได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิด Luminal A และ Luminal B ซึ่งเป็นกลุ่มที่ให้ผลการตรวจตัวรับ ER และ PR เป็นบวก (positive) ยาต้านฮอร์โมนที่นิยมใช้รักษามะเร็งเต้านม ได้แก่ ยาทาม็อกซิเฟน (tamoxifen), ยากลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโรมาเตส (aromatase inhibitors; AIs) เช่น แอนแอสโตรโซล (anastrozole), เลโทรโซล (letrozole) และเอ็กซ์เซเมสเตน (exemestane) แสดงกลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาในตารางที่ 3

ง. ยาตรงเป้า (Targeted therapy) เป็นการรักษาโดยอาศัยหลักการออกฤทธิ์โดยจับกับเป้าหมายที่อยู่ภายนอกเซลล์หรือบนผิวเซลล์แล้วทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวหรือเจริญเติบโต

ได้ ดังนั้นผู้ป่วยที่จะได้รับการรักษาด้วยยาตรงเป้าควรเป็นกลุ่มที่มีตัวรับหรือเป้าหมาย (target) ที่ตอบสนองต่อยา ได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิด HER2 เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ให้ผลการตรวจตัวรับ ER และ PR เป็นลบ (negative) และให้ผลการตรวจรับ HER2 เป็นบวก ยาตรงเป้าที่นิยมใช้รักษามะเร็งเต้านม ได้แก่ ทราสทูซูแมบ (trastuzumab) และลาฟาทีนิบ (lapatinib) แสดงกลไกการออกฤทธิ์ และผลข้างเคียงของยาในตารางที่ 4



ตารางที่ 1 สูตรยารักษามะเร็งเต้านม (วิระพล ภิมาลย์, 2555)

การรักษา	สูตรยา	ยา	ยาและปริมาณการใช้
สูตรการให้ยาเคมีบำบัดแก่ผู้ป่วยหลังจากที่ได้รับการผ่าตัด (Adjuvant Chemotherapy Regimens)	AC + Paclitaxel	ด็อกโซรูบิซิน + ไซโคลฟอสฟาไมด์ + แพคลิแทกเซล	ในวันแรกเริ่มให้ด็อกโซรูบิซิน 60 mg/m <sup>2</sup> และไซโคลฟอสฟาไมด์ 600 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ โดยให้ด็อกโซรูบิซินและไซโคลฟอสฟาไมด์ ซ้ำทุก 21 วัน ทั้งหมด 4 รอบ หลังจากนั้นให้แพคลิแทกเซล 175 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้แพคลิแทกเซลซ้ำทุก 21 วัน อีก 4 รอบ
	FAC	ฟลูออโรยูราซิล + ด็อกโซรูบิซิน + ไซโคลฟอสฟาไมด์	ให้ฟลูออโรยูราซิล 500 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ ในวันที่ 1 และวันที่ 4 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ด็อกโซรูบิซิน 50 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำหลังจากให้ฟลูออโรยูราซิลไปแล้วไม่เกิน 72 ชั่วโมง และให้ไซโคลฟอสฟาไมด์ 500 mg/m <sup>2</sup> เฉพาะในวันที่ 1 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ยาสูตรนี้ซ้ำทุก ๆ 21-28 วัน จนครบ 6 รอบ
	TAC	โดซีแทคเซล + ด็อกโซรูบิซิน + ไซโคลฟอสฟาไมด์	ในวันแรกให้โดซีแทคเซล 75 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ ร่วมกับด็อกโซรูบิซิน 50 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำแบบปริมาณมาก (IV bolus) และให้ไซโคลฟอสฟาไมด์ 500 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นให้ยาทั้ง 3 ชนิด ซ้ำทุก ๆ 21-28 วัน จนครบ 6 รอบ
	Paclitaxel + FAC	แพคลิแทกเซล + ฟลูออโรยูราซิล + ด็อกโซรูบิซิน + ไซโคลฟอสฟาไมด์	ให้แพคลิแทกเซล 80 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 1 ชั่วโมง ทุกสัปดาห์นาน 12 สัปดาห์ และให้ฟลูออโรยูราซิล 500 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ ในวันที่ 1 และวันที่ 4 ของรอบการรักษา ตามด้วยให้ด็อกโซรูบิซิน 50 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำหลังจากให้ฟลูออโรยูราซิลไปแล้วไม่เกิน 72 ชั่วโมง และให้ไซโคลฟอสฟาไมด์ 500 mg/m <sup>2</sup> ในวันที่ 1 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ยาสูตรนี้ซ้ำทุก ๆ 21-28 วัน จนครบ 4 รอบ
	FEC	ฟลูออโรยูราซิล + เอฟิรุบิซซิน + ไซโคลฟอสฟาไมด์	ในวันแรกให้ฟลูออโรยูราซิล 500 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ ให้เอฟิรุบิซซิน 100 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำแบบปริมาณมาก (IV bolus) และตามด้วยให้ไซโคลฟอสฟาไมด์ 500 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นให้ยาทั้ง 3 ชนิด ซ้ำทุก 21 วัน จนครบ 6 รอบ

ตารางที่ 1 สูตรยารักษามะเร็งเต้านม (ต่อ) (วิระพล ภิมาลย์, 2555)

การรักษา	สูตรยา	ยา	ยาและปริมาณการใช้
	Vinorelbine	ไวโนเรลบิน	ให้ไวโนเรลบิน 30 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 และ วันที่ 8 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ไวโนเรลบินซ้ำทุก 21 วัน หรือ ให้ไวโนเรลบิน 25–30 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ ทุก 7 วัน
	Gemcitabine	เจมไซทาบิน	ให้เจมไซทาบิน 600–1000 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 วันที่ 8 และวันที่ 15 หลังจากนั้นให้เจมไซทาบินซ้ำทุก 28 วัน
	CMF	ไซโคลฟอสฟาไมด์ + เมโธเทรกเซท + ฟลูออโรยูราซิล	รับประทานไซโคลฟอสฟาไมด์ 100 mg/m <sup>2</sup> วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ร่วมกับให้เมโธเทรกเซท 40 mg/m <sup>2</sup> และฟลูออโรยูราซิล 600 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 และวันที่ 8 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ไซโคลฟอสฟาไมด์ เมโธเทรกเซทและฟลูออโรยูราซิลซ้ำทุก 28 วัน จนครบ 6 รอบ หรือ ให้ไซโคลฟอสฟาไมด์ 600 mg/m <sup>2</sup> และ เมโธเทรกเซท 40 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 และให้ฟลูออโรยูราซิล 600 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 และ วันที่ 8 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ยาทั้ง 3 ชนิดซ้ำทุก 28 วัน จนครบ 6 รอบ
	CEF	ไซโคลฟอสฟาไมด์ + เอพิรูบิซิน + ฟลูออโรยูราซิล	รับประทานไซโคลฟอสฟาไมด์ 75 mg/m <sup>2</sup> วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ร่วมกับให้เอพิรูบิซิน 60 mg/m <sup>2</sup> และฟลูออโรยูราซิล 600 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 และ วันที่ 8 หลังจากนั้นให้ซ้ำทุก 28 วัน ทั้งหมด 6 รอบ (สูตรนี้อาจต้องให้ยาปฏิชีวนะหรือโกรทแฟคเตอร์ร่วมด้วย)
	Dose-Dense AC + Paclitaxel	ด็อกโซรูบิซิน + ไซโคลฟอสฟาไมด์ + แพคลิแทกเซล	ในวันแรกให้ด็อกโซรูบิซิน 60 mg/m <sup>2</sup> และไซโคลฟอสฟาไมด์ 600 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นให้ด็อกโซรูบิซินและไซโคลฟอสฟาไมด์ซ้ำทุกๆ 14 วัน จนครบ 4 รอบ (สูตรนี้ต้องให้โกรทแฟคเตอร์ร่วมด้วย) ตามด้วยให้แพคลิแทกเซล 175 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 3 ชั่วโมง และให้แพคลิแทกเซลซ้ำทุก ๆ 14 วัน อีก 4 รอบ

ตารางที่ 1 สูตรยารักษามะเร็งเต้านม (ต่อ) (วิระพล ภิมาลย์, 2555)

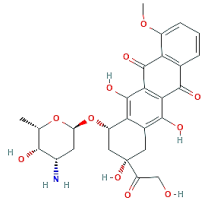
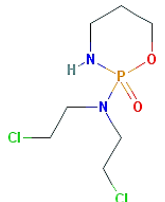
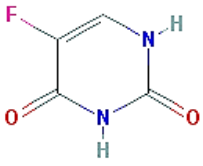
การรักษา	สูตรยา	ยา	ยาและปริมาณการใช้
การให้ยาเคมีบำบัดแก่ผู้ป่วยมะเร็งในระยะแพร่กระจาย (Metastatic Single-Agent Chemotherapy)	Paclitaxel	แพคลิแทกเซล	ให้แพคลิแทกเซล 175 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้แพคลิแทกเซล ซ้ำทุก 21 วัน หรือ ให้แพคลิแทกเซล 80 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 1 ชั่วโมง ทุก 7 วัน
	Docetaxel	โดซีแทกเซล	ให้โดซีแทกเซล 60-100 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้โดซีแทกเซล ซ้ำทุก 21 วัน หรือ ให้โดซีแทกเซล 30-35 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 30 นาที ทุก 7 วัน
	Vinorelbine	ไวโนเรลปิน	ให้ไวโนเรลปิน 30 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 และ วันที่ 8 ของรอบการรักษา หลังจากนั้นให้ไวโนเรลปินซ้ำทุก 21 วัน หรือ ให้ไวโนเรลปิน 25-30 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำ ทุก 7 วัน
	Gemcitabine	เจมไซทาบิน	ให้เจมไซทาบิน 600-1000 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำในวันที่ 1 วันที่ 8 และวันที่ 15 หลังจากนั้นให้เจมไซทาบินซ้ำทุก 28 วัน
	Capecitabine	คาเพ็กไซทาบิน	รับประทานคาเพ็กไซทาบิน 2,000-2,500 mg/m <sup>2</sup> ต่อวัน แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง นาน 14 วัน
	Liposomal doxorubicin	ไลโปโซมด็อกโซรูบิซิน	ให้ไลโปโซมด็อกโซรูบิซิน 30-50 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 90 นาที ทุก 21-28 วัน

ตารางที่ 1 สูตรยารักษามะเร็งเต้านม (ต่อ) (วิระพล ภิมาลย์, 2555)

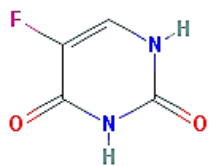
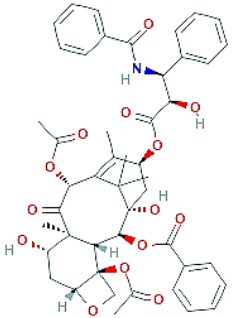
การรักษา	สูตรยา	ยา	ยาและปริมาณการใช้
สูตรการให้ยาเคมีบำบัดแก่ผู้ป่วยมะเร็งในระยะแพร่กระจาย (Metastatic Combination Chemotherapy Regimens)	Docetaxel + capecitabine	โดซีแทคเซล + คาเพ็กไซทาปีน	ให้โดซีแทคเซล 75 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 1 ชั่วโมง ในวันที่ 1 ของรอบการรักษา และรับประทานคาเพ็กไซทาปีน 2,000–2,500 mg/m <sup>2</sup> ต่อวัน แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง นาน 14 วัน หลังจากนั้นให้โดซีแทคเซลและคาเพ็กไซทาปีนซ้ำทุก 21 วัน หรือ ในวันที่แรกให้ดอกโซรูบิซิน 50 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำแบบปริมาณมาก (IV bolus) ตามด้วยโดซีแทคเซล 75 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้ดอกโซรูบิซินและโดซีแทคเซลซ้ำทุก ๆ 21 วัน
	Epirubicin + docetaxel	เอพิรูบิซซิน + โดซีแทคเซล	ให้เอพิรูบิซซิน 70–90 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำแบบปริมาณมาก (IV bolus) ตามด้วยโดซีแทคเซล 70-90 mg/m <sup>2</sup> ทางหลอดเลือดดำโดยให้ยาหมดภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้เอพิรูบิซซินและโดซีแทคเซลซ้ำทุก ๆ 21 วัน

คำย่อ AC = Doxorubicin + Cyclophosphamide; FAC = Fluorouracil + Doxorubicin + Cyclophosphamide; TAC = Docetaxel + Doxorubicin + Cyclophosphamide; CAF = Cyclophosphamide + Doxorubicin + Fluorouracil; FEC = Fluorouracil + Epirubicin + Cyclophosphamide; CMF = Cyclophosphamide + Methotrexate + Fluorouracil; CEF = Cyclophosphamide + Epirubicin + Fluorouracil

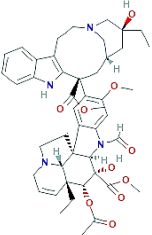
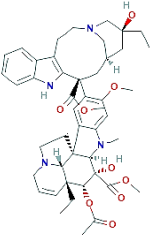
ตารางที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม

ยา	โครงสร้างยา	กลไกการออกฤทธิ์	ผลข้างเคียง	อ้างอิง
ด็อกโซรูบิซิน		ยาจะแทรกตัวอยู่ในระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอ และป้องกันการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ และทำให้สายดีเอ็นเอมีการเรียงลำดับเบสในสายผิดปกติ ทำให้ขาดเป็นท่อน ๆ ชักนำไปให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส	โรคกล้ามเนื้อหัวใจโต (Cardiomegaly) ทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะและหัวใจวาย	(Thorn et al., 2011)
ไซโคลฟอสฟาไมด์		ยามีโครงสร้างส่วนที่เป็น active alkylating moiety หรือ alkyl group ไปจับกับซัลเฟอร์, ไนโตรเจน, ออกซิเจน หรือฟอสฟอรัส ที่เป็นส่วนประกอบในสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA strand break) ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส	กตการสร้างเม็ดเลือดขาวในไขกระดูก ทำให้ท้องเสีย เบื่ออาหาร เกิดแผลในปาก หากขาดวิตามินในกระเพาะปัสสาวะจะทำให้เกิดการอักเสบ (Hemorrhage cystitis)	(Gerald and David, 1990)
เมโทเทรกเซท		ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (dihydrofolate reductase; DHFR) ที่ใช้ในการเปลี่ยนกรดโฟลิก (folic acid) ให้กลายเป็นกรดเททระไฮโดรโฟลิก (tetrahydrofolic acid; THFA) ที่ใช้ในการสร้างพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) ทำให้การสร้างดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอหยุดชะงัก	เกล็ดเลือดลดลง ผมร่วง ผิวน้ำองอักเสบ และทำให้เกิดอาการขาดโฟเลต (folate deficiency) ในเซลล์ปกติ	(Edwin and Bruce, 2013)

ตารางที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม (ต่อ)

ยา	โครงสร้างยา	กลไกการออกฤทธิ์	ผลข้างเคียง	อ้างอิง
ฟลูออโรยูราซิล		<p>ยามีสูตรโครงสร้างคล้ายไพริมิดีนเบสชนิดยูราซิล (uracil) เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์จะถูกเอนไซม์ไพริมิดีนฟอสโฟโรโบซิลทรานเฟอเรส (pyrimidine phosphoribosyl transferase) เปลี่ยนเป็นฟลูออโรดีออกซียูริไดเลท (fluorodeoxyuridylate; FdUMP) ซึ่งจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไธมิดีเลตซินเทส (thymidylate synthase; TS) ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ</p>	<p>คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ปากเป็นแผล ลิ้นอักเสบ ผมร่วง เม็ดเลือดขาวต่ำ และผิวหนังมีสีเข้มขึ้น</p>	(Longley et al., 2003)
แพคليتแทกเซล		<p>ยาไปจับกับหน่วยย่อยบีตา (β-subunit) ของ ทิวบูลิน ไมโครทิวบูล (microtubule) ส่งผลให้เกิดการบล็อกตำแหน่งเฉพาะที่ให้แอลฟาและบีตา-ทิวบูลินที่จับกันเป็นคู่ (tubulin dimer หรือ heterodimer) มาจับ ทำให้กระบวนการต่อสายของไมโครทิวบูลหยุดลง</p>	<p>หลังการฉีดยาส่วนใหญ่จะมีอาการคลื่นไส้เพียงเล็กน้อย จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง ปวดกล้ามเนื้อหรือปวดข้อ</p>	(Beth, 2014)

ตารางที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม (ต่อ)

ยา	โครงสร้างยา	กลไกการออกฤทธิ์	ผลข้างเคียง	อ้างอิง
<p>วินคริสทีน (Vincristine) และ วินบลาสทีน (Vinblastine)</p>	<p style="text-align: center;">                       วินคริสทีน                         วินบลาสทีน                 </p>	<p>ยาจะจับกับบีตาทิวบูลิน (<math>\beta</math>-tubulin) มีผลทำให้บีตาทิวบูลินไม่สามารถจับกับแอลฟาทิวบูลิน (<math>\alpha</math>-tubulin) เพื่อกลายเป็นไมโครทิวบูลได้ ทำให้เซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะเมทาเฟส และเกิดการตายของเซลล์</p>	<p>วินคริสทีนทำให้เกิดขาตามปลายมือ ปลายเท้า และเดินเซ (ataxia) วินบลาสทีนจะกุดการทำงานของไขกระดูก อาการข้างเคียงอื่นที่พบบ่อยได้ในยาทั้ง 2 ชนิด คือ คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร</p>	<p>(วสุ ศุภรัตน์สิทธิ, 2556)</p>

**ตารางที่ 3** กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาต้านฮอร์โมนที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม

ชนิดมะเร็ง	ยา	กลไกการออกฤทธิ์	ผลข้างเคียง	อ้างอิง
Luminal A Luminal B	تام็อกซิเฟน	ยาออกฤทธิ์โดยการแย่งจับกับ ER (competitive inhibitor) ส่งผลให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ทำให้เซลล์มะเร็งนั้นหยุดการเจริญเติบโตหรือเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ	ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังมดลูก และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก	(Rong and Leena, 2015)
Luminal A Luminal B	ยากลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโรมาเตส	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโรมาเตส ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนแอนโดรสทีนไดโอน (androstenedione) ให้เป็นเอสโตรเจน (oestrone, E1) และเปลี่ยนเทสโทสเตอโรน (testosterone) เป็นเอสตราไดออล (oestradiol, E2) จึงไม่มีตัวไปกระตุ้นสัญญาณการแบ่งเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตหรือเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ	แอนเอสโตรเจน และเลโทโรซอล มีผลข้างเคียงต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น หัวใจขาดเลือด เพิ่มระดับโคเลสเตอรอลในเลือด	(Reinert et al., 2015)

**ตารางที่ 4** กลไกการออกฤทธิ์และผลข้างเคียงของยาตรงเป้าที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม

ยา	เป้าหมายของยา	กลไกการออกฤทธิ์	ผลข้างเคียง	อ้างอิง
ทราสทูซูแมบ	HER2	จับกับตัวรับ HER2 บนเซลล์มะเร็ง มีผลยับยั้งการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของโมเลกุล PI3K, MAPK, SRC, PKC และ RAS ส่งผลให้การส่งสัญญาณกระตุ้นการแบ่งเซลล์หยุดลง ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์	ปฏิกิริยาแพ้ ไข้ ภูมิแพ้ หายใจมีเสียงหวีด และปัญหาในการหายใจเนื่องจากเกิดการบวมและการหดเกร็งของกล้ามเนื้อทางเดินหายใจ	(ศิริมาศ กางน วาศ และ วิจิ ตรา ทศนียกุล, 2551)
ลาฟาทีนิบ	เอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase)	ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส โดยไปยับยั้งที่ HER1 และ HER2 ส่งผลให้ HER1 และ HER2 ไม่สามารถเติมฟอสเฟตให้แก่โมเลกุลของ PI3K ทำให้การส่งสัญญาณกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์หยุดชะงักลง ส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตหรือเจริญเติบโตช้าลง	เบื่ออาหาร ค่าการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย ลดลง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน บิลิรูบินในเลือดสูง ผื่นแดง เมื่อยล้า อาหารไม่ย่อย	(เอื้อมแซ สุข ประเสริฐ, 2554)



## 1.2.2 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis)

### 1.2.2.1 วัฏจักรเซลล์ และการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle and cell cycle regulation)

วัฏจักรเซลล์ หมายถึง ช่วงระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว โดยประกอบไปด้วยระยะต่าง ๆ ดังนี้  $G_1$ , S,  $G_2$  และ M โดยระยะ  $G_1$  เป็นระยะที่คั่นระหว่างระยะ M และ S ซึ่งในระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่ และมีการสร้างสารบางอย่างเพื่อใช้สร้างดีเอ็นเอต่อไป ระยะ S เป็นระยะที่มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ระยะ  $G_2$  เป็นระยะที่คั่นระหว่างระยะ S และ M ซึ่งในระยะนี้เซลล์มีการสร้างสารอื่น ๆ เพิ่มเติมเล็กน้อย และมีการตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่และทำการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่บกพร่องให้สมบูรณ์ ก่อนที่เซลล์จะแบ่งโครโมโซมและไซโทพลาสซึมต่อไป สว่นระยะ  $G_0$  เป็นระยะพักของเซลล์ (quiescence) ซึ่งเซลล์จะออกจากวัฏจักรเซลล์ เนื่องจากเซลล์ไม่มีสัญญาณกระตุ้นการเจริญเติบโต โดยระยะ  $G_1$ ,  $G_0$  และ S เรียกระยะทั้ง 3 นี้ว่าระยะอินเตอร์เฟส (interphase) ซึ่งใช้เวลาเกือบทั้งหมดของวัฏจักรเซลล์ สว่นระยะ M คือ ไมโทซิส (mitosis) ซึ่งประกอบไปด้วยระยะย่อย คือ โพรเฟส (prophase), เมทาเฟส (metaphase), แอนนาเฟส (anaphase) และเทโลเฟส (telophase) โดยระยะโพรเฟสเป็นระยะเริ่มต้นของไมโทซิส โครโมโซมจะมีการอัดแน่นเป็นแท่ง เซนทริโอลเคลื่อนที่ไป 2 ข้างของเซลล์ และมีการสร้างเส้นใยไมโทติกสปินเดิล (mitotic spindle fiber) ไปเกาะที่เซนโทรเมียร์ (centromere) สว่นระยะเมทาเฟสเป็นระยะที่แท่งโครโมโซมมาเรียงกันอยู่ตรงกลาง เซลล์พร้อมที่จะถูกดึงแยกออกจากกัน เมื่อซิสเตอร์โครมาทิด (sister chromatids) ถูกดึงแยกออกจากกันไปยังฝั่งตรงข้ามจะเข้าสู่ระยะแอนนาเฟส ต่อมาจะมีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบโครโมโซมแล้วจะเริ่มมีการคลายตัวของโครโมโซม ระยะนี้เรียกว่าเทโลเฟส ต่อมาเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการแบ่งไซโทพลาสซึม (cytokinesis) จะเป็นระยะที่มีการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์มาล้อมรอบเกิดเป็นโครโมโซมลูก (daughter chromosome) 2 เซลล์ ซึ่งจะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังแสดงในรูปที่ 1 (Malumbres and Barbacid, 2010; Williams and Stoeber, 2012)

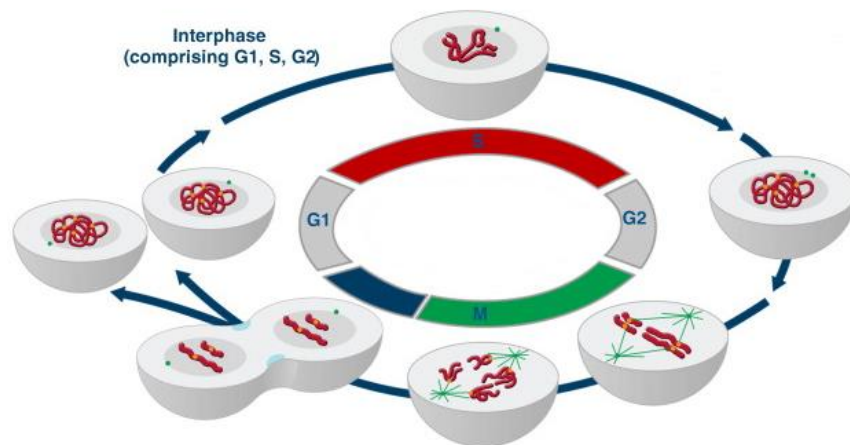
ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็นการควบคุมเพื่อให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินไปตามลำดับ และการควบคุมจากภายนอก (extracellular signals) ที่จะกระตุ้นหรือยับยั้งวัฏจักรเซลล์ ดังนี้

(1) ไซคลินและไซคลินดีเพนเดนทไคเนส (cyclin and cyclin dependent kinases; CDKs) ในการผ่านเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรของเซลล์จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ CDKs ซึ่งเอนไซม์

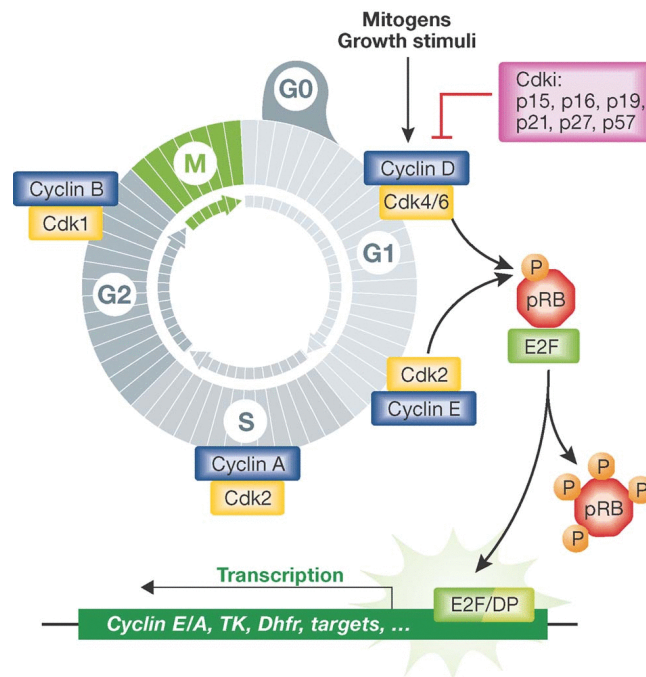
CDKs จะสามารถทำงานได้ต้องผ่านกระบวนการสำคัญ 2 กระบวนการ ได้แก่ CDKs จับกับโปรตีนเชิงซ้อนที่ชื่อว่าไซคลินได้เป็น cyclin-cdk complex หลังจากนั้น cyclin-cdk complex จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ไซคลินดีเพนเดนท์ไคเนสแอกติเวติงไคเนส (CDK-activating kinase; CAK) แล้วจึงทำหน้าที่ในการควบคุมการผ่านของเซลล์ให้เข้าสู่ระยะต่าง ๆ โดย Cyclin D เป็นตัวแรกที่ถูกสร้างขึ้นมาแล้วจับกับ CDKs4/6 ทำหน้าที่ควบคุมการดำเนินของเซลล์ในระยะ  $G_1$  ซึ่ง Cyclin D มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออก (expression) ของ Cyclin E ซึ่งจับกับ CDKs2 ทำหน้าที่ในการควบคุมให้เซลล์ผ่านจากระยะ  $G_1$  เข้าสู่ระยะ S ส่วน Cyclin A จับกับ CDKs2 มีบทบาทสำคัญในการทำให้เซลล์ผ่านระยะ S และ Cyclin A และ B ที่จับกับ CDKs1 ทำหน้าที่ในการควบคุมให้เซลล์ผ่านระยะ  $G_2$  เพื่อให้เข้าสู่ระยะ M ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 2

(2) การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle regulation) เป็นการตรวจสอบเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความผิดปกติมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งการตรวจสอบประกอบด้วยกระบวนการที่สำคัญในแต่ละระยะ ได้แก่  $G_1$ ,  $G_2$  และ mitotic checkpoints โดย  $G_1$  checkpoint เป็นการตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายเกิดการถ่ายแบบในระยะ  $G_1$  โดยจะมีโปรตีนที่สำคัญ คือ โปรตีนเรตินอบลาสโตมา (Retinoblastoma; Rb) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการผ่านของเซลล์จากระยะ  $G_1$  เข้าสู่ระยะ S โดยโปรตีน Rb ทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของแฟคเตอร์ถอดรหัส (E2f factor) ให้สร้างโปรตีนที่สำคัญต่อการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ ได้แก่ โปรตีนฮิสโตน (histone), เอนไซม์ไธมิโดเลตซินเทส (thymidylate synthase) และเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส (dihydrofolate reductase) ซึ่งโปรตีนต่าง ๆ เหล่านี้จะทำหน้าที่ผลักดันให้เซลล์ผ่านเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ต่อไป  $G_2$  checkpoint ทำหน้าที่ยังไม่ให้เซลล์ที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอจากระยะ S ผ่านเข้าสู่ระยะ M โดย checkpoint kinase ที่สำคัญในระยะนี้ คือ Cdc25 tyrosine phosphatase ทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของ CDK ในการทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่กลุ่มโปรตีน Rb โดยเมื่อมีการกระตุ้น  $G_2$  checkpoint เอนไซม์ Chk1 และ Cds1 จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Cdc25 ส่งผลให้ไม่สามารถทำงานได้ (Ingrid, 2000) M checkpoint เป็นการตรวจเช็คในระยะ M ซึ่งจะต้องได้โครโมโซม 2 ชุดที่มีลักษณะเหมือนกัน โดยหากเซลล์ตรวจพบว่าไคเนโทคอร์ (kinetochore) ยังไม่ติดกับเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) จะเกิดการยับยั้งโปรตีนแอนนาเฟสโปรโมตติงคอมเพล็กซ์ (anaphase-promoting complex; APC) ส่งผลให้ APC ไม่สามารถส่งสัญญาณต่อ เซลล์จึงไม่เข้าสู่ระยะแอนนาเฟส แต่ถ้าไคเนโทคอร์จับกับเส้นใยสปินเดิลเรียบร้อยแล้ว โปรตีน APC จะส่งสัญญาณให้เอนไซม์โพรทีโอไลติก (proteolytic enzyme) ย่อยไซคลินและโปรตีนที่ยึดซิสเตอร์โครมาทิดให้เชื่อมติดกัน เซลล์จึงเข้าสู่ระยะแอนนาเฟสต่อไป

(3) ตัวยับยั้งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ Cyclin-cdk (Cdk inhibitors) คือ กลุ่มโปรตีน p16<sup>ink4a</sup> (INK) ได้แก่ p16<sup>ink4a</sup>, p15<sup>ink4b</sup>, p18<sup>ink4c</sup> และ p19<sup>ink4d</sup> และกลุ่มโปรตีน p21 (Cip/Kip) ได้แก่ p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> และ p57<sup>kip2</sup> หลังจากที่ CDKs/cyclins ทำหน้าที่ผลักดันให้เซลล์เคลื่อนเข้าสู่ระยะต่าง ๆ จนได้เป็น 2 เซลล์ใหม่ที่สมบูรณ์แล้ว โมเลกุลของ CDKs/cyclins จะถูกโปรตีนในกลุ่ม CKIs คือ ประเภท Cip/Kip และประเภท INK4 ยับยั้งการทำงาน โดย Cip/Kip จะไปจับกับ CDKs/cyclins และขัดขวางไม่ให้ ATP เข้าไปจับกับ CDKs ตรงตำแหน่ง ATP-binding site ส่งผลให้ CDKs/cyclins ไม่สามารถทำงานได้ ส่วน INK4 จะไปจับกับ CDKs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่ง cyclin binding site ส่งผลให้ CDKs ไม่สามารถจับ cyclin ได้ (สรายุทธ์ จันทรมหเสถียร, 2549)



รูปที่ 1 วัฏจักรของเซลล์ (ดัดแปลงจาก Al-Ali et al., 2014)



รูปที่ 2 การควบคุมการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์โดยเอนไซม์ CDKs (Victor and Lluís, 2010)

### 1.2.2.2 กระบวนการเกิดมะเร็ง

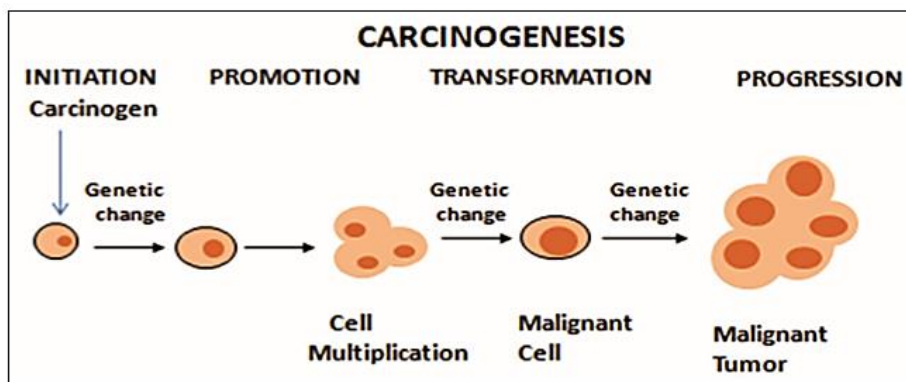
มะเร็งเป็นโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมในระดับเซลล์ เนื่องจากสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอ (alterations of DNA) หรือเกิดการกลายพันธุ์ (genetic mutation) ซึ่งในกระบวนการเกิดมะเร็งการกลายพันธุ์ที่จะเกิดขึ้นต้องใช้เวลาในการสะสมการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation accumulation) โดยกระบวนการเกิดหลายขั้นตอน (multi-step process) (Ohnishi et al., 2013; Garnis et al., 2004) ดังนี้

(1) Initiation เป็นระยะแรกหลังสัมผัสสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างถาวรภายในเซลล์ (genetic change) ก่อให้เกิดเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์มะเร็ง

(2) Promotion เป็นระยะที่มีกระบวนการสะสมความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์เพื่อให้เซลล์มีคุณสมบัติเพียงพอที่จะก่อเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งใช้เวลานาน 5-10 ปี

(3) Transformation ระยะก่อนการเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งรูปร่าง และคุณสมบัติของเซลล์ มีการแบ่งตัวต่อเนื่องและกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (malignant transformation)

(4) Progression เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งเริ่มมีการลุกลาม และกลายเป็นมะเร็งชนิดร้าย (malignant tumor) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ขั้นตอนการเกิดมะเร็ง (Kaur et al., 2014)

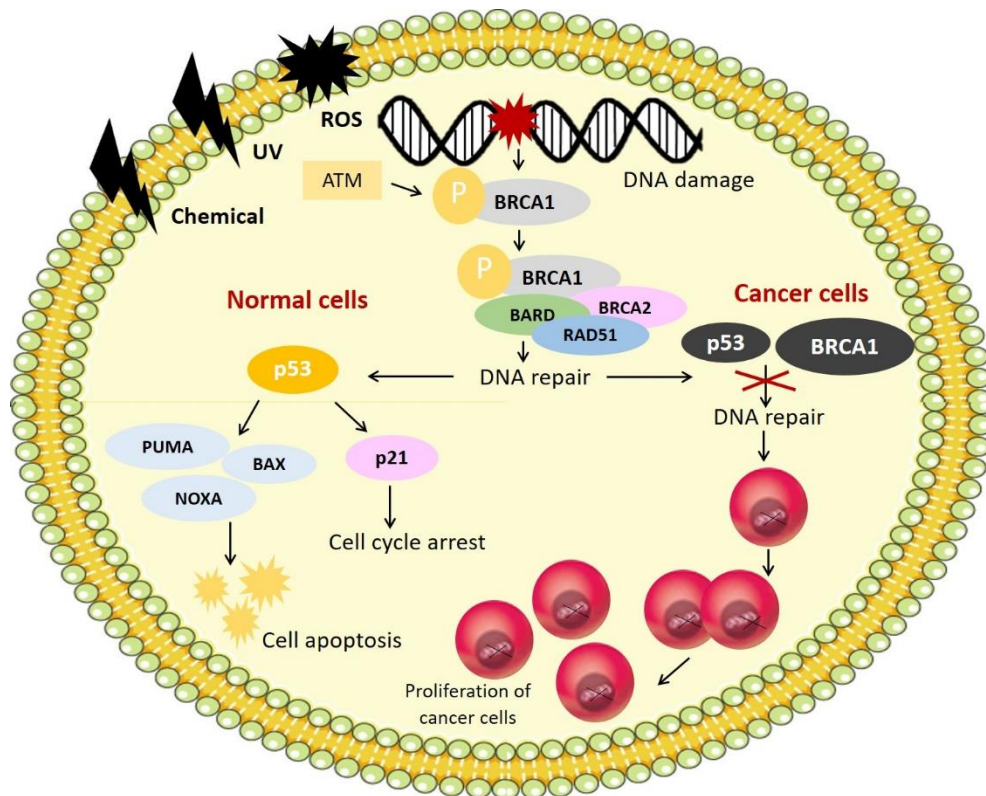
การเกิดการกลายพันธุ์นั้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจากความผิดปกติของกลไกการตรวจสอบการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เนื่องมาจากกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่ดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ เช่น ยีน *TP53* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน p53 หรือยีน *BRCA1* (breast cancer type 1 susceptibility) และ *BRCA2* (breast cancer type 2 susceptibility) โดยพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *BRCA1* และ *BRCA2* เป็นยีนสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็งเต้านม และมะเร็งรังไข่ที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Joo et al., 2011; Wang et al., 2011) เมื่อเกิดความเสียหายดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการเผาผลาญตามปกติในเซลล์มนุษย์และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสียูวี ในการทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ ยีน *BRCA1* ต้องอาศัยโมเลกุลที่สำคัญอีก 2 ตัว ได้แก่ RAD5 และ BRCA2 ซึ่งขณะเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอจะมีการส่งสัญญาณที่ทำให้ Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ไปเร่งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับยีน *BRCA1* เพื่อให้อยู่ในสถานะที่พร้อมทำงาน ในขณะที่โปรตีน carboxy terminal binding protein-interacting protein (CtIP) จะแยกตัวออกจากยีน *BRCA1* เพื่อให้กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ ได้แก่ BRCA1, BRCA2, RAD51 และ BARD เข้ามาจับกับ BRCA1 โดยทั้งกลุ่มจะเคลื่อนตัวไปยังโครโมโซมที่เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอที่กำลังมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยสัญญาณจาก proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ซึ่งเป็น marker protein ที่บ่งชี้ว่ากำลังมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จากนั้นกลุ่มซ่อมแซมจะดำเนินการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจนเสร็จสมบูรณ์ ในกรณีที่ *BRCA1* หรือ *BRCA2* เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอหยุดชะงักลงและล้มเหลวลงได้ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ถ้าหากในกรณีที่

ยีน *TP53* และ *p21* ยังปกติ ก็จะสร้างโปรตีน *p53* และ *p21* ให้ทำหน้าที่และควบคุมวัฏจักรเซลล์ต่อไป แต่ถ้าหากมีปริมาณดีเอ็นเอที่เสียหายเพิ่มขึ้น และกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอชำรุดไป เซลล์เนื้อเยื่อเต้านมจะเกิดการเปลี่ยนแปลง 3 ระดับ ขึ้นอยู่กับระดับความเสียหายที่เกิดขึ้น (Scully and Livingston, 2000) ได้แก่

(1) ถ้า *p53* ตรวจพบว่าดีเอ็นเอมีความเสียหายมาก แต่ยังไม่รุนแรงถึงขั้นที่ต้องทำลายเซลล์ เซลล์จะตอบสนองความผิดพลาดของดีเอ็นเอโดยไม่มีการแบ่งตัว และลดกิจกรรมภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์จะกระตุ้นการทำงานของ *p53* จากนั้น *p53* จะไปกระตุ้นการแสดงออกของ *p21* ซึ่งระดับ *p21* ที่เพิ่มขึ้นจะออกฤทธิ์ป้องกันไม่ให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Rb ทำให้ไม่สามารถสร้างสารที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ได้ เซลล์จึงหยุดชะงักในระยะ  $G_1$

(2) หากเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น รวมถึงการมีจำนวนรหัสพันธุกรรมที่ผิดพลาดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ *p53* กระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิส เพื่อทำลายเซลล์ที่มีความเสียหาย หลังจากนั้นเนื้อเยื่อปกติโดยรอบจะเจริญเติบโตเข้ามาแทนที่เซลล์เดิมที่ตายไป

(3) หากเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการกลายพันธุ์ของยีน *BRCA1*, *BRCA2* และ *TP53* จะส่งผลให้ไม่มีการตรวจสอบรหัสพันธุกรรมที่ผิดพลาด ไม่มีการควบคุมเซลล์ให้หยุดนิ่งหรือตายไป ตลอดจนไม่มีการซ่อมแซมแก้ไขดีเอ็นเอที่เสียหาย ส่งผลให้เซลล์ที่เสียหายนั้นแบ่งตัวต่อไป เมื่อเซลล์แบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นและมีการสะสมรหัสพันธุกรรมที่ผิดพลาดเพิ่มมากขึ้น บางรหัสที่ผิดพลาดไปกลายเป็นรหัสที่เปลี่ยนยีนปกติให้กลายเป็นยีนผิดปกติ จากนั้นยีนที่ผิดปกติเหล่านี้จะไปกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อนั้นให้มากขึ้น โดยไม่มีขีดจำกัด ไม่สามารถควบคุมได้จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (รูปที่ 4)

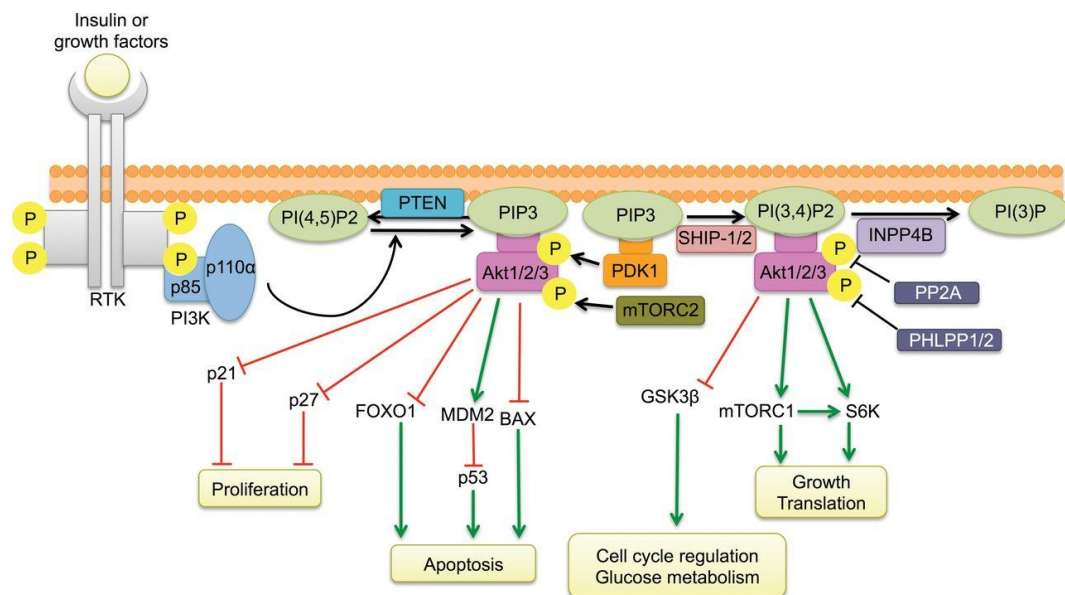


รูปที่ 4 กระบวนการเกิดมะเร็ง (ดัดแปลงจาก Mako et al., 2016; Sierraoncology, 2018; Welch et al., 2000)

### 1.2.2.3 การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (cancer cell proliferation)

ในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเมื่อโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) เช่น เอสโตรเจน (estrogen), เอพิเดอร์มอลโกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor; EGF), ตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตที่มีโครงสร้างคล้ายอินซูลิน (insulin-like growth factor; IGF) จับกับตัวรับบริเวณผิวเซลล์ จะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน sarcoma (Src) ซึ่งเป็นโปรตีนอิสระที่จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนไทโรซีนของตัวรับเอพิเดอร์มอลโกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor receptor; EGFR) และเกิดวิถีการส่งสัญญาณผ่าน phosphoinositide3-kinase (PI3K) (รูปที่ 5) โดย PI3K จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) ได้เป็น phosphatidylinositol-3,4,5-tris phosphate (PIP3) ซึ่ง PIP3 จะดึงโมเลกุล Akt มายังพลาสมาเมมเบรน จากนั้นจึงเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ Akt สองบริเวณ คือ กรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) ตำแหน่ง 308 โดยเอนไซม์ phosphoinositide-dependent protein kinase 1

(PDK1) (Andjelkovic et al., 1999) และบริเวณกรดอะมิโนซีรีน (serine) ตำแหน่ง 473 โดยเอนไซม์ phosphoinositide-dependent protein kinase 2 (PDK2) ซึ่ง Akt เป็นโปรตีนสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่านการกระตุ้นการทำงานของ cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc) เพิ่มการแสดงออกของ Cyclin D1 นอกจากนี้การกระตุ้น Akt ยังทำให้เกิดการยับยั้ง TSC1/2 ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง Rheb ทำให้ mTORC1 ไปควบคุมการทำงานของซับสเตรทที่สำคัญ ได้แก่ mTORC1 ซึ่งจะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้ S6K บริเวณกรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) ตำแหน่ง 389 ซึ่ง S6K จะทำหน้าที่เป็นทรานสเลชันแฟคเตอร์ ส่งผลให้เกิดการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Costa and Lisa, 2013) นอกจากนี้การเข้าจับของไซโทไคน์กับตัวรับบนผิวเซลล์ ทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีน Janus kinase (JAK) และทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้ signal transducer and activators of transcription 3 และ 5 (STAT3 และ STAT5) จากนั้น STAT3 หรือ STAT5 จะจับคู่กัน (dimerization) และเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ โดยจับกับ histone acetyltransferase (HAT) และ histone deacetylase (HDAC) และไปจับกับดีเอ็นเอตำแหน่ง interferon-stimulated response element (ISRE) มีเป้าหมายที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเซลล์ ได้แก่ c-Myc, bcl-2, bcl-xl, p21, VEGF, HIF- $\alpha$ , Cyclin D1, Cyclin B และ MMP-2, -7, -9 (Alvarez and Frank, 2000)



รูปที่ 5 วิธีการส่งสัญญาณของโมเลกุล Akt ส่งผลให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ในมะเร็งเต้านม (Abber and Alex, 2014)



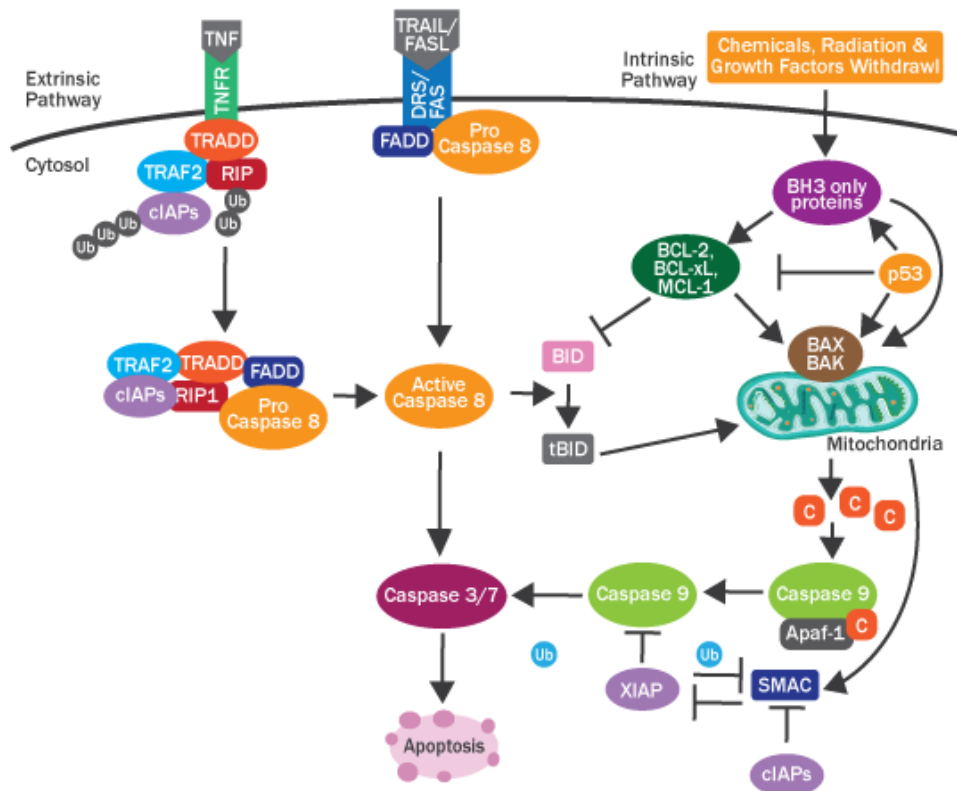
#### 1.2.2.4 วิธีสัญญาณอะพอพโทซิส (apoptosis) และการรอดชีวิตของเซลล์ (cell survival)

อะพอพโทซิส คือ การตายอย่างมีแบบแผนที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์ในหลายสภาวะ เช่น การถูกยับยั้งการเจริญเติบโต การได้รับรังสี การได้รับสารเคมี และดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย เป็นต้น การเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส เริ่มจากเซลล์ได้รับสัญญาณกระตุ้น ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ ได้แก่

ก. การรับสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (Death receptor induce extrinsic pathway) เกิดจากตัวรับสัญญาณ (death receptor) เช่น Tumor necrosis factor receptor (TNFR), Fas receptor (FasR), TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRAILR) และ Interleukin-1 receptor (IL-1) เป็นต้น เมื่อ death ligand เช่น TRAIL และ TNF- $\alpha$  ที่ถูกส่งมาจากภายนอกเซลล์จับกับ death receptor ทำให้ adaptor protein ในส่วนปลาย C-terminal ของ death receptor ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส เช่น เมื่อ death ligand จับกับ FasR และกระตุ้นให้ death factors FAS associated death domain protein (FADD) จับกับ procaspase-8 และกระตุ้น procaspase-8 ให้กลายเป็น caspase-8 ที่สามารถทำงานได้ โดย caspase-8 สามารถไปกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิส ได้ 2 ทาง คือ (1) ไปกระตุ้น caspase cascade โดยตรงทำให้ปริมาณของ caspase-3 ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (2) ไปกระตุ้น bid ให้กลายเป็น truncated bid (tBid) จากนั้น tBid จะไปจับกับ bax และ bak ทำให้โมเลกุลทั้ง 2 นี้ไปเกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียและทำให้เกิดรูรั่วเพื่อปลดปล่อย cytochrome c ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสต่อไป (รูปที่ 6)

ข. การเกิดสัญญาณจากภายในเซลล์ (Mitochondria mediated apoptosis intrinsic pathway) มีกระบวนการหลัก คือ การใช้ไมโทคอนเดรียเป็นสื่อกลางในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส เมื่อเซลล์ได้รับความผิดปกติต่างๆ เช่น ได้รับ oxidative stress สูง ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ทำให้มีการปลดปล่อย Cyt c จากนั้น Cyt c จะไปรวมตัวกับโปรตีน Apaf-1 ทำให้เกิดเป็น apoptosome ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ caspase-9 และ caspase-9 จะไปกระตุ้นการทำงานของ caspases-3, -6, และ -7 ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้โปรตีนที่หลั่งออกมาจากไมโทคอนเดรียบางชนิด เช่น Smac จะไปยับยั้งโปรตีนที่ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (inhibitors of apoptosis proteins; IAPs) ทำให้ IAPs ไม่สามารถไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase ได้ จึงส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้เช่นกัน (รูปที่ 6)

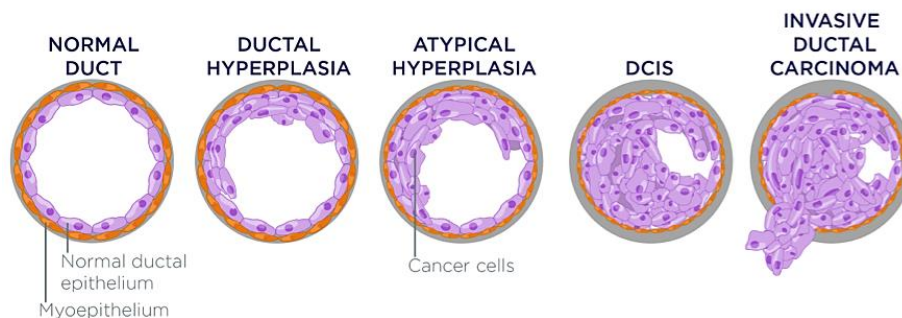
เซลล์มะเร็งจะมีการส่งสัญญาณกระตุ้นการรอดชีวิตของเซลล์ (survival signals) โดยเริ่มจาก Akt กระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่ชื่อ NF- $\kappa$ B ทำให้มีการเพิ่มระดับของโปรตีนที่ต้านการตายแบบอะพอพโทซิส (antiapoptotic proteins) เช่น bcl-2 และ bcl-xl เป็นต้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิส (proapoptotic proteins) เช่น bid, bax และ bak เป็นต้น ส่งผลให้ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c ออกจากไมโทคอนเดรียได้ จึงไม่เกิดการกระตุ้น apaf-1 และ caspase-9 นอกจากนี้ยังพบว่า Akt ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน MDM2 บริเวณกรดอะมิโนซีรีน (serine) ที่ตำแหน่ง 166 ซึ่ง MDM2 จะทำหน้าที่เป็น p53 negative regulator ทำให้ p53 ไม่สามารถกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสส่งผลให้เซลล์รอดชีวิต (Gottlieb et al., 2002)



รูปที่ 6 กระบวนการเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Novusbio, 2018)

### 1.2.2.5 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis)

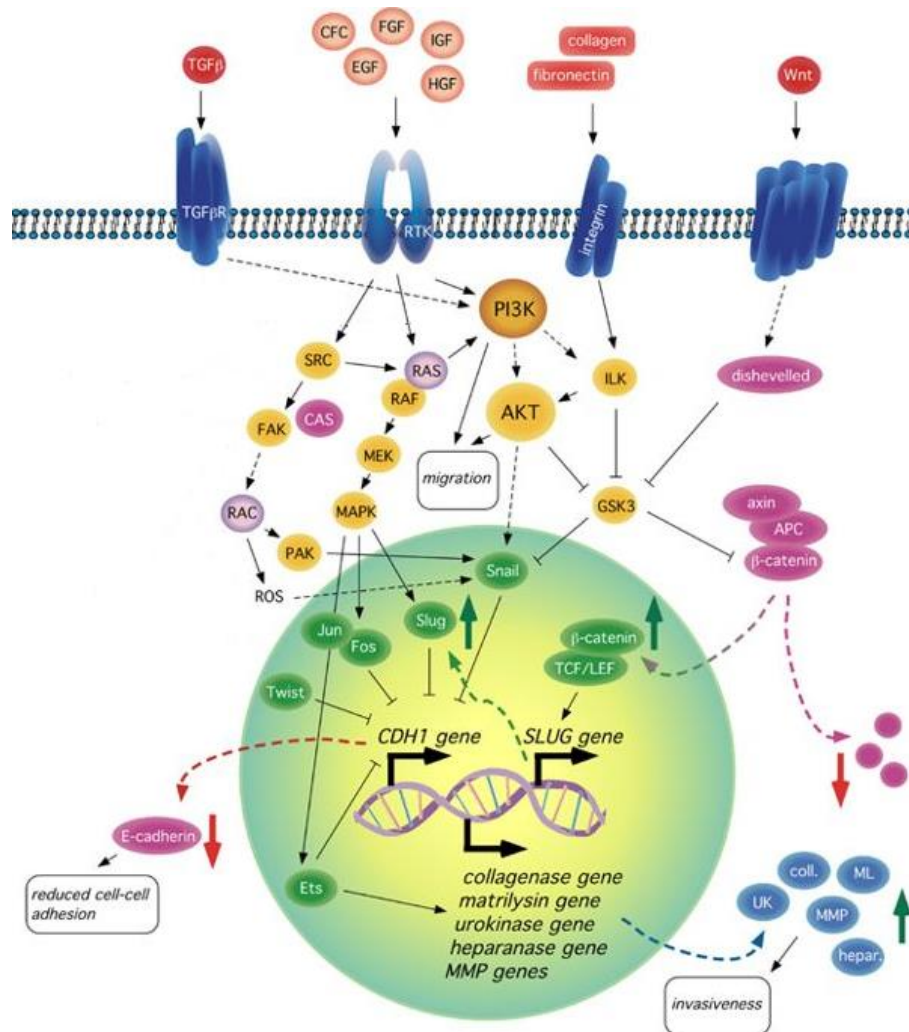
การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง คือ การที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปเจริญเติบโตที่บริเวณอื่น ๆ ของร่างกายที่ห่างไกลออกไปจากก้อนมะเร็งเดิม ในสภาวะปกติเนื้อเยื่อเต้านมประกอบด้วยเซลล์อีพิทีเลียม (epithelium) ของต่อมน้ำนมซึ่งเป็นเซลล์ที่ผลิตน้ำนม (milk-producing lobules) และอีพิทีเลียมที่เรียงประกอบกันเป็นท่อนำส่งน้ำนมจากต่อมผลิตไปยังหัวนม ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมมักเปลี่ยนแปลงมาจากอีพิทีเลียมเซลล์เหล่านี้ เริ่มจากมีการเติบโตของเซลล์มากขึ้น (ductal hyperplasia) จากนั้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่ผิดปกติไปจากเดิม (atypical hyperplasia) จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (รูปที่ 7) มะเร็งในระยะแรก ๆ เป็นมะเร็งที่ยังไม่มีการลุกลามไปจากจุดที่เกิดมะเร็ง ซึ่งจะพบเซลล์มะเร็งได้ในท่อน้ำนมและเต้านม จะไม่มีการกระจายออกไปนอกท่อนม เรียกว่า Ductal Carcinoma in Situ (DCIS) ต่อมาเซลล์มะเร็งจะมีการลุกลามจากต่อมน้ำนมไปยังเนื้อเยื่อใกล้เคียง หรือกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เรียกว่า Invasive Ductal Carcinoma



รูปที่ 7 การแบ่งตัวและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งภายในท่อน้ำนม (Nature education, 2018)

ในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ภายในเซลล์มะเร็งจะมีการส่งสัญญาณที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีการเคลื่อนที่และเกิดการแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย โดยเริ่มจากโกรทแฟคเตอร์ เช่น Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) จับกับ Transforming growth factor beta receptor (TGF- $\beta$ R) หรือ EGF และ IGF จับกับ Receptor tyrosine kinase ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น PI3K จากนั้น PI3K จะกระตุ้นให้ Akt ทำงาน โดย Akt จะเป็นตัวกลางในการเกิดกระบวนการต่างๆ ที่สำคัญ คือ (1) ส่งผลให้เกิดการการสูญเสียหน้าที่ของ glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-

3β) ในวิถี Wnt/β-catenin นอกจากนี้ยังพบว่าการจับกันระหว่าง collagen และ fibronectin กับ integrin ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ integrin-linked kinase ทำให้โมเลกุล β-catenin เพิ่มขึ้นในไซโทพลาสซึม หลังจากนั้นระดับ β-catenins ที่เพิ่มสูงขึ้นจะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับ Transcription Factor/Lymphoid enhancer-binding factor1 (TCF/LEF1) และกระตุ้นการทำงานของยีน *Slug* ซึ่งยีนดังกล่าวจะไปควบคุมการทำงานของยีนต่าง ๆ ให้ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่สำคัญต่อกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ ยีน collagenase, urokinase, heparanase และ MMP ชนิดต่าง ๆ (รูปที่ 8) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ (2) กระตุ้นการทำงานของยีน snail ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน *CDH1* (รูปที่ 8) ส่งผลให้การสร้าง E-cadherin ลดลง ทำให้เซลล์มะเร็งหลุดจากโมเลกุลยึดเกาะ และเคลื่อนที่มากขึ้น ดังนั้นการสูญเสียหน้าที่หรือการลดปริมาณของ E-cadherin สามารถเพิ่มอัตราการรอดของเซลล์ เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ epithelial mesenchymal transition (EMT) ตลอดจนการบุกรุกและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Larue and Bellacosa, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าการจับกันระหว่าง TGF-β กับ TGF-βR ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุล Ras และกระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ c-Jun และ c-Fos ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของยีน *CDH1* ส่งผลให้การสร้าง E-cadherin ลดลง (Lionel and Alfonso, 2005)

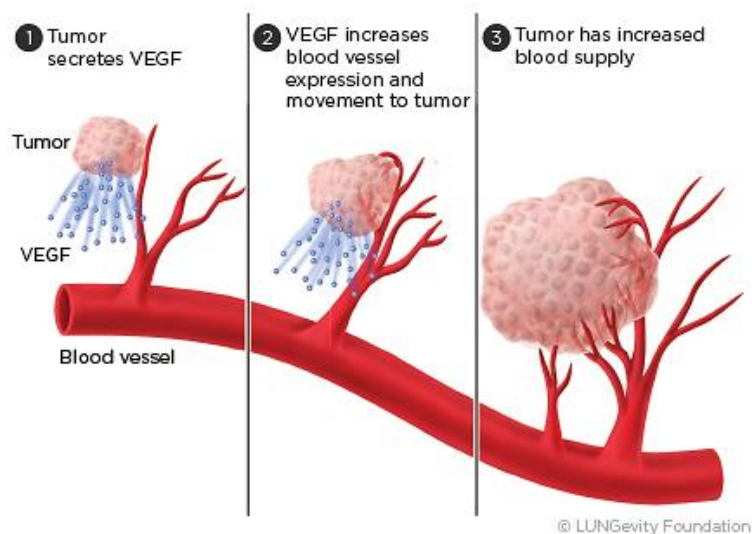


รูปที่ 8 วิธีการส่งสัญญาณที่ส่งผลให้เกิดกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Lionel and Alfonso, 2005)

### 1.2.2.6 การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)

การสร้างหลอดเลือดใหม่มีบทบาทสำคัญในการก่อตัวของมะเร็ง โดยการเจริญเติบโตของเนื้องอกจะมีเส้นเลือดที่ทำหน้าที่นำออกซิเจนและสารอาหารมาหล่อเลี้ยงและขนส่งของเสีย ซึ่งหากเนื้องอกมีการเจริญเติบโตและมีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร จะส่งผลให้ออกซิเจนและสารอาหารไม่สามารถแทรกซึมไปเข้าไปในเซลล์ที่อยู่บริเวณใจกลางเนื้องอกได้ ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนในเซลล์ ซึ่งมะเร็งจะต้องมีการสร้างเส้นเลือดใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างหลอดเลือด

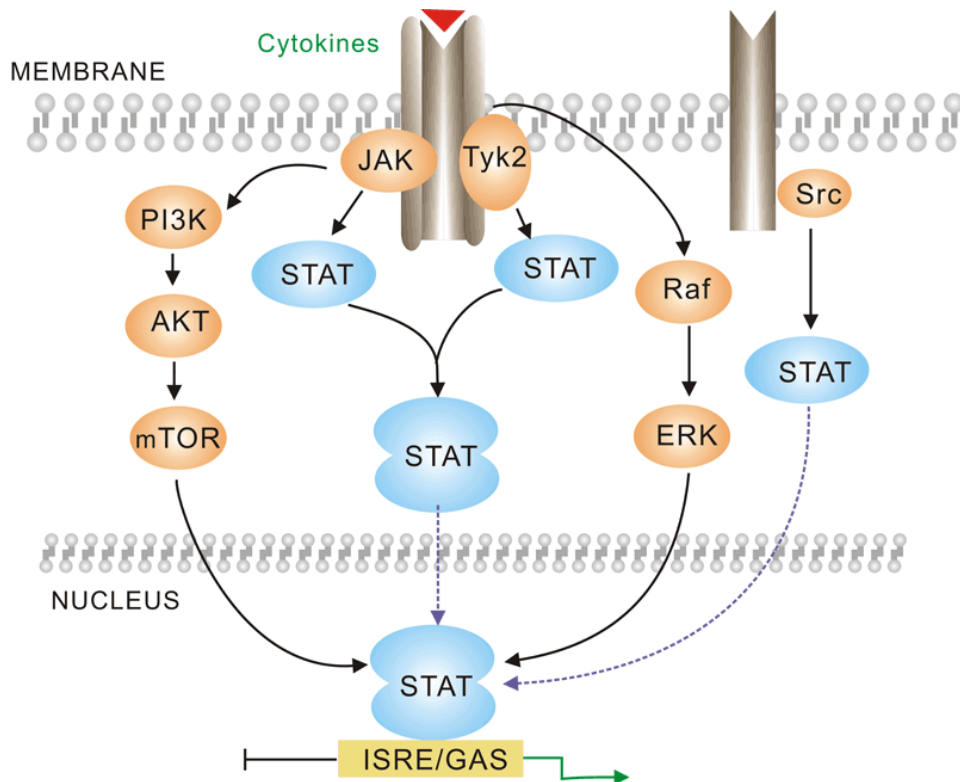
ใหม่จะช่วยในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งเกิดโดยกระตุ้นการทำงานของโปรตีน VEGF (รูปที่ 9) จากนั้น VEGF จะไปจับกับ VEGFR บนผิวเซลล์เป้าหมาย ได้แก่ เซลล์หลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลือง รวมทั้งเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์เป้าหมายเพื่อสร้างหลอดเลือดใหม่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการอักเสบ เป็นต้น



รูปที่ 9 กระบวนการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์โดยโปรตีน VEGF ( National Cancer Institute, 2018)

โดยกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็งมักมีการกระตุ้นการทำงานผ่านวิถีการส่งสัญญาณ JAK/STAT ซึ่งไซโตไคน์ (cytokine) หรือ EGFR จะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ เกิดการกระตุ้น JAK ทำให้เกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ STAT5 ที่บริเวณกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ตำแหน่ง 694 และโปรตีน STAT3 ที่บริเวณกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ตำแหน่ง 705 เกิดเป็น phospho-STAT เป็นรูปที่สามารถทำงานได้ จากนั้นโมเลกุล p-STATs จะเกิดการจับคู่กันเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (รูปที่ 10) โดยจับกับ histone acetyltransferase (HAT) และ histone deacetylase (HDAC) และไปจับกับดีเอ็นเอตำแหน่ง interferon-stimulated response element (ISRE) มีอินเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็น Vascular endothelial growth factor (VEGF) โดย VEGF จะไปจับกับ Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) หลังจากนั้นจะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ

โปรตีนต่าง ๆ ผ่านวิถีการส่งสัญญาณของ MAPK ได้แก่ Ras, Raf, MEK และ Erk ไปกระตุ้นการทำงานของ c-Jun และ c-Fos ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ เกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดเพื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตได้ (Hirano et al., 2000)



รูปที่ 10 วิธีารส่งสัญญาณ JAK/STAT (SabbioTech, 2018)

### 1.2.2.7 การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดมะเร็งเต้านม

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง อาจเกิดจากความผิดพลาดในกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโต การซ่อมแซมตัวเอง และการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ ซึ่งส่งผลให้การสร้างและการทำลายเซลล์ขาดสมดุล ทำให้เซลล์มีความผิดปกติและแบ่งตัวต่อไปจนไม่สามารถควบคุมได้ และกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด การกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านมอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น *HER-2/neu*, *c-myc* และ *Cyclin D1* เป็นต้น ยีน *HER2* เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน *HER2* ซึ่ง

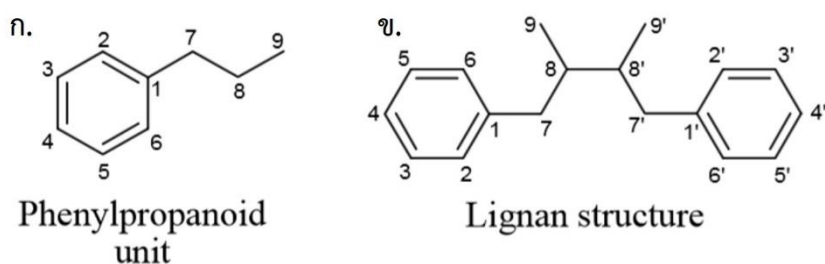
เป็นตัวรับโกรทแฟคเตอร์บนผิวเซลล์ ในมะเร็งเต้านมการเพิ่มจำนวนของยีน *HER2* พบว่าทำให้วิถีสัญญาณ PI3K/Akt ถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการกระตุ้น PI3K ซ้ำ ๆ ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่สิ้นสุด นอกจากนี้การเพิ่มการแสดงออกของยีน *HER2* พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาเคมีบำบัด โดยพบว่าโปรตีน *HER2* จะไปกระตุ้นให้ Akt เต็มหมู่ฟอสเฟตกับ MDM2 ทำให้ MDM2 สามารถเข้าสู่นิวเคลียสและยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 ส่งผลให้เซลล์ไม่ตายแบบอะพอพโทซิส ยีน *CCND1* เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน cyclin D1 (Eckhoute *et al.*, 2006) ในมะเร็งเต้านมพบว่า Cyclin D1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 50 ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวและมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Ishii *et al.*, 2006; Eckhoute *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า Cyclin D1 เป็นตัวกลางในการกระตุ้นวิถีสัญญาณอื่น ๆ เช่น nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Rac1 และ 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) เป็นต้น ซึ่งพบว่าการลดระดับของ Rac1 ทำให้เกิดการยับยั้งวิถีสัญญาณ NF- $\kappa$ B ส่งผลให้เกิดการแตกหักของ Cyclin D1 (Zheng *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2010) ในขณะที่การกระตุ้น AMPK ส่งผลให้ระดับโปรตีน Cyclin D1 ลดลง (Zhuang *et al.*, 2008)

(2) ยีนที่ทำหน้าที่ระงับการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ หรือการแบ่งเซลล์ที่มากเกินไป เช่น *TP53*, *BRCA1* และ *BRCA2* เป็นต้น ยีน *TP53* เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน p53 ซึ่ง p53 จะทำหน้าที่ตรวจเช็คความเสียหายของดีเอ็นเอ เมื่อตรวจพบจะทำให้วัฏจักรเซลล์หยุดลงและส่งสัญญาณให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอ หากไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอได้ p53 จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส การกลายพันธุ์ของยีน *TP53* จะทำให้เกิดการกระตุ้นวิถีสัญญาณ Akt ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ MDM2 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการอะพอพโทซิส ยีน *BRCA1* และ *BRCA2* มีหน้าที่สำคัญโดยตรงในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ในกรณีที่ *BRCA1* หรือ *BRCA2* เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอหยุดชะงักลง และส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ถ้าหากในกรณีที่ยีน *TP53* และ *p21* ยังปกติ ก็จะสร้างโปรตีน p53 และ p21 ให้ทำหน้าที่และควบคุมวัฏจักรเซลล์ต่อไป หากเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการกลายพันธุ์ของยีน *BRCA1*, *BRCA2* และ *TP53* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ในการตรวจสอบและแก้ไขรหัสพันธุกรรมที่ผิดพลาด จะส่งผลให้ไม่มีการตรวจสอบรหัสที่ผิดพลาด ไม่มีการควบคุมเซลล์ให้หยุดนิ่งหรือตายไป ตลอดจนไม่มีการซ่อมแซมแก้ไขดีเอ็นเอที่เสียหาย ส่งผลให้เซลล์ที่เสียหายนั้นแบ่งตัวต่อไปจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด



### 1.2.3 ลิกแนน

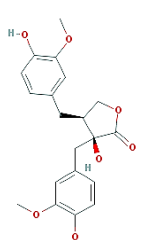
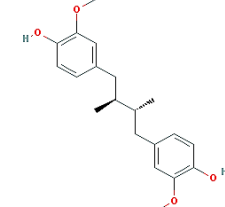
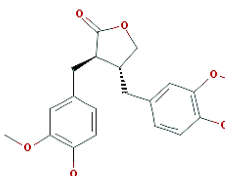
สารในกลุ่มลิกแนนเป็นสารจากพืช ที่ได้จากระบวนการสังเคราะห์กรดซินนามิก (cinnamic acid) ในกระบวนการสลายฟีนิลอะลานีน (Moss, 2000) โครงสร้างของลิกแนนเกิดจากการจับคู่กันของหน่วยฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) 2 หน่วย ดังแสดงในรูปที่ 11 (Wilson et al., 2012) จับกับหมู่ที่มีคุณสมบัติทางเคมีและหน้าที่เฉพาะ ทำให้สามารถแบ่งลิกแนนได้เป็น 8 กลุ่ม คือ ฟิวโรฟูแรน (furofuran), ฟูแรน (furan), ไดเบนซิลบิวเทน (dibenzylbutane), ได-เบนซิลบิวทีโรแลคโตน (dibenzylbutyrolactone), แอริลเตตระลีน (aryltetralin), แอริลแนฟทาลีน (arylnaphthalene), ไดเบนไซโคลออกตะไดอิน (dibenzocyclooctadiene) และไดเบนซิลบิวทีโรแลคตอล (dibenzylbutyrolactol) (Apollinaire et al., 2013)



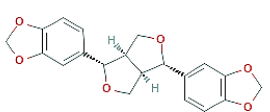
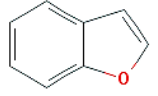
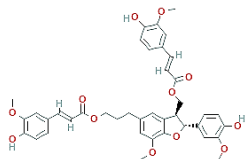
รูปที่ 11 สูตรโครงสร้างของสารลิกแนน ก. หน่วยฟีนิลโพรพานอยด์ ข. โครงสร้างเต็มของสารลิกแนน (Wilson et al., 2012)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารกลุ่มลิกแนนในด้านต่าง ๆ เช่น การต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ กดภูมิคุ้มกัน และต้านมะเร็ง เป็นต้น (ตารางที่ 5)

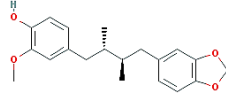
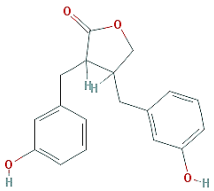
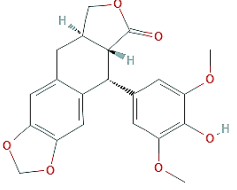
ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารในกลุ่มลิแกน

สาร	โครงสร้างสาร	แหล่งที่มาของสาร	กลไกของสารต่อเซลล์มะเร็ง	โมเลกุลเป้าหมาย	อ้างอิง
นอร์ตระซิโลจีนิน (Nortrachelogenin)		<i>Wikstroemia indica</i>	เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง ต่อมลูกหมากเฉพาะเลี้ยงชนิด LNCaP	p85 PI3K, p-Akt (ser473), Akt, bid และ caspase 9	(Peuhu et al., 2013)
มีโซ-ไดไฮโดรกวายเรติก เอซิด (Meso- dihydroguaiaretic acid; MEGA)		<i>Myristica fragrans</i>	เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง เต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	p-AMPK, AMPK, cleaved PARP และ p-p53	(Thi et al., 2017)
อาร์คทิจีนิน (Arctigenin)		<i>Artium lappa</i>	ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม เฉพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231	MMP-2 และ MMP-9	(Lou et al., 2017)
			เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง เต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231	bax, bak, bcl-xl, bcl-2, p- p38 และ p38	(Hsieh et al., 2014)
			ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม เฉพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	MMP-9, Akt, NF-κB, ERK1/ 2 และ JNK1/2	(Maxwell et al., 2017)

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดของสารในกลุ่มลิแกน (ต่อ)

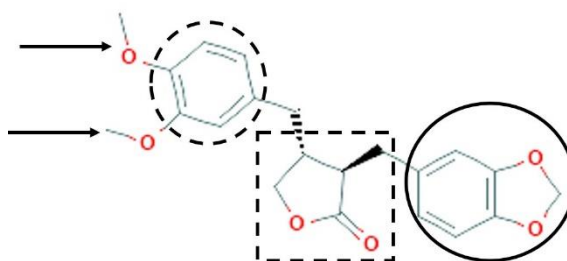
สาร	โครงสร้างสาร	แหล่งที่มาของสาร	กลไกของสารต่อเซลล์มะเร็ง	โมเลกุลเป้าหมาย	อ้างอิง
เซซามิน (Sesamin)		<i>Seasamum indicum</i>	ยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด KBM-5 และชนิด Jurkat E6.1 TIB-152	cyclin D1, COX-2, Bcl-2, surviving, MMP-9, ICAM-1 และ VEGF	(Kuzhuvelil et al., 2010)
เบนโซฟูแรน (Benzofuran)		<i>Croton californicus</i>	ยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองเพาะเลี้ยงชนิด U-937	p53, p21, cleaved caspase 3, cleaved PARP และ cyclin D1	(Pan et al., 2016)
			ยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด KBM-5 และชนิด Jurkat E6.1 TIB-152	p21, p27, cyclin B, p-Rb, Rb, p53, Cyt c, bcl-2 และ bax	(Sunil et al., 2010)
เบอมีแนน (Boehmenan)		<i>Clematis armandii</i>	เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงชนิด A549	p-ERk, Erk, p-Akt, Akt, cyclin D1, p21 และ p53	(Pan et al., 2016)

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดของสารในกลุ่มลิแกน (ต่อ)





สาร	โครงสร้างสาร	แหล่งที่มาของสาร	กลไกของสารต่อเซลล์มะเร็ง	โมเลกุลเป้าหมาย	อ้างอิง
เมสลิแกน (Macelignan)		<i>Myristica fragrans</i>	เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	p-AMPK, AMPK, cleaved PARP และ p-p53	(Thi et al., 2017)
เอนเทอร์แลกโตน (Enterolactone)		สารเมแทบอลิต์จากการย่อยลิแกนโดยจุลินทรีย์ในลำไส้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม	เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเพาะเลี้ยงชนิด LNCaP	p-Akt (ser473), Akt, p-GSK-3 $\beta$ , p-MDM2, MDM2 และ p53	(Chen et al., 2007)
4'-ไดเมธิล ดีออกซีโพโดฟิลโลทอกซิน (4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin)		<i>Podophyllum hexandrum</i>	ยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7	p-Chk-2, Chk-2, MDM2, MDM2 cleaved, p-Akt, Akt, caspase 8, cleaved caspase 8 และ bcl-2	(Zilla et al., 2014)

### 1.2.3.1 สารคูชูโนคินิน

สารคูชูโนคินินมีโครงสร้างประกอบด้วย 4 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ วงเบนซีน (benzene ring), หมู่เมทอกซี (methoxy group), ฟอมอลดีไฮด์เอทิลีนอะซีทัล (formaldehyde ethylene acetal) และแกมมาบิวทีโรแลคโตน ( $\gamma$ -Butyrolactone) (รูปที่ 12) มีรายงานว่าสารคูชูโนคินินสามารถสกัดได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Aristolochia cymbifera*, *Wikstromia indica*, *Haplophyllum vulcanicum* และ *Wikstroemia sikokiana* (Barros et al., 2005; Sartorelli et al., 2010) สารคูชูโนคินินมีสูตรเคมี คือ  $C_{21}H_{22}O_6$  มีน้ำหนักโมเลกุล 370.401 กรัมต่อโมล



รูปที่ 12 สูตรโครงสร้างสารคูชูโนคินิน (Pubchem, 2018)

-  = วงเบนซีน
-  = หมู่เมทอกซี (O-CH<sub>3</sub>)
-  = ฟอมอลดีไฮด์เอทิลีนอะซีทัล
-  = แกมมาบิวทีโรแลคโตน

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินในด้านต่าง ๆ เช่น สารคูชูโนคินินจาก *Aristolochia malmeana* มีความเป็นพิษต่อแมลงชนิด *Aristolochia gemmatalis* มีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 230.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (Messiano et al., 2008) สารสกัดคูชูโนคินินจากใบของ *Aristolochia cymbifera* มีความเป็นพิษต่อปรสิตชนิด *Trypanosome cruzi* มีค่า IC<sub>50</sub> ต่อปรสิตในระยะที่อยู่ภายในเซลล์ (amastigotes) เท่ากับ 17 ไมโครโมลาร์ และต่อปรสิตระยะที่อยู่ในกระแสเลือด (trypomastigotes) เท่ากับ 51 ไมโครโมลาร์ โดยไม่ส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Sartorelli et al., 2010) นอกจากนี้ในรายงานของ Bicalho และคณะในปี 2012 พบว่าสารคูชูโนคินินมีความเป็นพิษต่อแมลงชนิด *Atta sexdens rubropilosa* และเชื้อราชนิด *Leucoagaricus*

*gongylophorus* (Bicalho et al., 2012) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสารคูชูโนคินินจากพริกไทยดำ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-468 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 4.37 และ 3.19 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการศึกษากลไกของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิด พบว่าสารทำให้เซลล์หยุดอยู่ในวัฏจักรเซลล์ระยะ  $G_2$  และระยะ M มากขึ้น โดยการลดระดับของโปรตีน topoisomerase II, เพิ่มระดับของโปรตีน p21 และยังชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส โดยลดระดับโปรตีน bcl-2, เพิ่มระดับโปรตีน p53, bax, cytochrome c, caspase cleaved-7 และ caspase cleaved-8 (Sriwiriyanjan et al., 2017)

### 1.2.3.2 สารและยาเคมีบำบัดที่มีโครงสร้างคล้ายสารคูชูโนคินิน

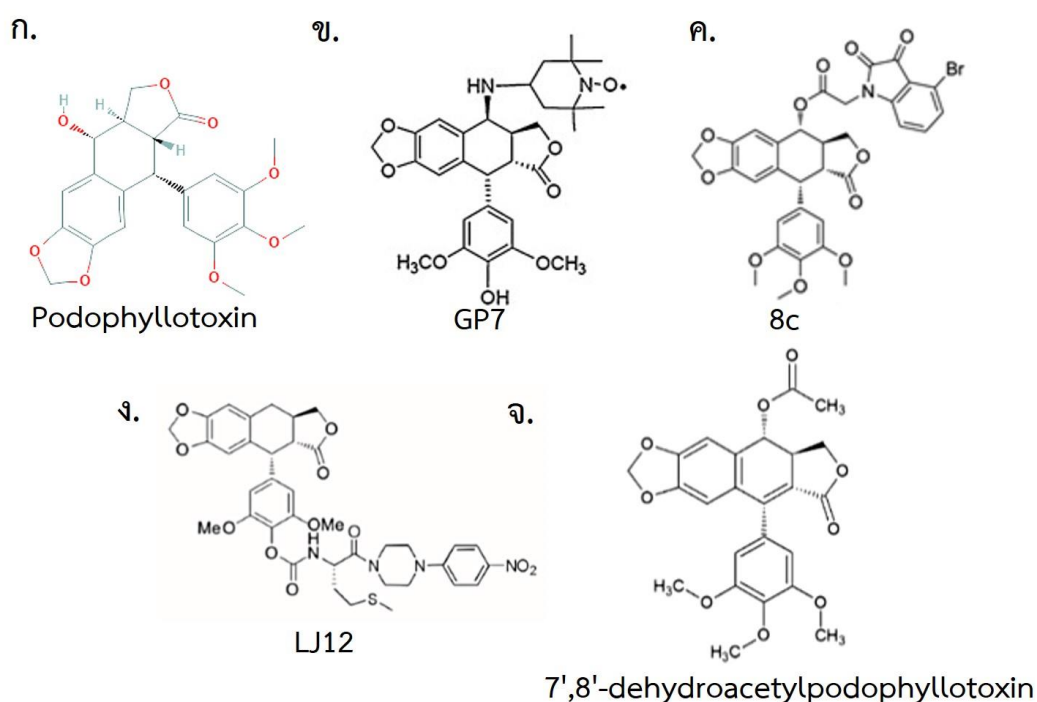
#### 1.2.3.2.1 สารจากพืช

##### 1) โปโดฟิลโลทอกซินและอนุพันธ์

สารโปโดฟิลโลทอกซิน (Podophyllotoxin) มีสูตรเคมี คือ  $C_{22}H_{22}O_8$  มีน้ำหนักโมเลกุล 414.41 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 13 สามารถสกัดสารนี้ได้จากรากของพืชในกลุ่ม Podophyllum เช่น *P. peltatum*, *P. emodii* และ *P. hexandrum* (Cragg and Newman, 2005) จากการศึกษาของ Chen และคณะในปี 2014 พบว่าสารโปโดฟิลโลทอกซินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเพาะเลี้ยงชนิด SGC 7901 โดยทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ  $G_2/M$  ของวัฏจักรเซลล์ และชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส (Chen et al., 2008)

ปัจจุบันมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารโปโดฟิลโลทอกซิน เช่น สาร GP7 (4-[4'-(2", 2", 6", 6"-tetramethyl"-piperidinyloxy) amino]-4'-demethyl-epipodophyllotoxin] สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเพาะเลี้ยงชนิด MKN28, AGS, BGC-823 และ HGC-27 โดยพบว่าสาร GP7 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ BGC-823 และ HGC-27 ได้สูงกว่ายาเคมีบำบัดชนิดอื่นที่ 1.15-1.21 เท่า และชักนำให้เซลล์เกิดการตายโดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของ caspase-9, caspase-3 และกระตุ้นการหลั่ง Cyt c (Yang et al., 2017) สาร 8c มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.067 \pm 0.010$  ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้พบว่า 8c เหนียวน้ำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ  $G_2/M$  และลดปริมาณ

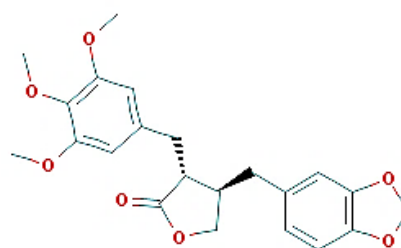
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดการดีอียาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เช่น Pgp, MRP-1 และ GST- $\pi$  เป็นต้น (Zhang et al., 2015) สาร LJ12 (N-(1-oxyl-4'-demethyl-4-deoxy podophyllin)-L-methine-4'-piperazine carbamate สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงชนิด A549 หยุดอยู่ในระยะ  $G_2/M$  ลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะ  $G_0/G_1$  และ  $S$  โดยการเพิ่มปริมาณโปรตีน Cdc2 และ Cyclin B1 เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายโดยลดปริมาณโปรตีน bcl-xl และเพิ่มโปรตีน caspase-3 และ p53 (Hui et al., 2016) สาร 7',8'-ไฮโดรอะซิทีลโพโดฟิลโลทอกซิน (7',8'-dehydroacetyl podophyllotoxin) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, MDA-MB-231 และ BT-549 มีค่า  $IC_{50}$  7.22, 2.44 และ 1.26 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Pena et al., 2016) (รูปที่ 12)



รูปที่ 13 สูตรโครงสร้างสารโพโดฟิลโลทอกซิน (ก.) (Pubchem, 2018) และอนุพันธ์ ได้แก่ ข. สาร GP7 (Yang et al., 2017) ค. สาร 8c (Zhang et al., 2015) ง. สาร LJ12 (Hui et al., 2016) และ จ. สาร 7',8'-ไฮโดรอะซิทีลโพโดฟิลโลทอกซิน (Pena et al., 2016)

## 2) ยาเตอิน

ยาเตอิน (Yatein) หรือ ไดไฮโดรแอนไฮโดรโพโดไรซอล (Dihydroanhydropodorhizol) สามารถสกัดได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Chamaecyparis obtuse*, *Juniperus chinensis* และ *Austrocedrus chilensis* (Kuo et al., 2006) มีสูตรเคมี คือ  $C_{22}H_{24}O_7$  มีน้ำหนักโมเลกุล 400.427 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างสารดังแสดงในรูปที่ 14 จากการศึกษาพบว่าสารยาเตอินจากพืช *Austrocedrus chilensis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด P3X โดยพบว่าสารยาเตอินที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ประมาณร้อยละ 75 (Donoso et al., 2015)

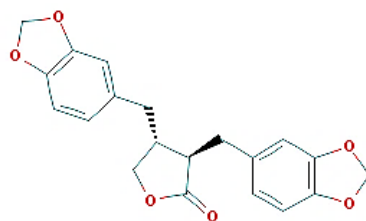


รูปที่ 14 สูตรโครงสร้างสารยาเตอิน (Pubchem, 2018)

## 3) ฮิโนคินิน

ฮิโนคินิน (Hinokinin) มีสูตรเคมี คือ  $C_{20}H_{18}O_6$  น้ำหนักโมเลกุล 354.358 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างสารดังแสดงในรูปที่ 15 เป็นสารที่สกัดได้จากพืช *Chamaecyparis obtuse* รายงานการศึกษาของ Ikeda และคณะ 1998 พบว่าสารฮิโนคินินจากพืช *Anthriscus sylvestris* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด B16-F10 เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเพาะเลี้ยงชนิด MK-1 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 2.72, 2.58 และ 1.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ในรายงานของ Mansoor และคณะ 2012 พบว่าสารฮิโนคินินจาก *Pycnanthus angolensis* สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HuH-7 เกิดการตายได้มากที่สุด

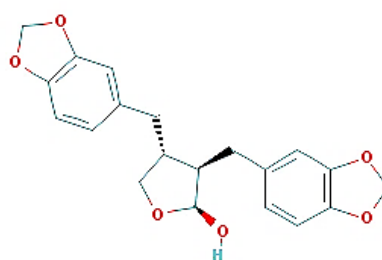




รูปที่ 15 สูตรโครงสร้างสารอินคินิน (Pubchem, 2018)

#### 4) คูบีบิน

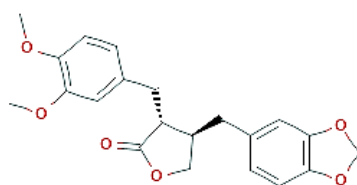
คูบีบิน (Cubebin) มีสูตรเคมี คือ  $C_{20}H_{20}O_6$  น้ำหนักโมเลกุล 356.374 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างสารดังแสดงในรูปที่ 16 มีรายงานพบว่าสารคูบีบินจากพืช *Piper cubeba* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงชนิด A549 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกเพาะเลี้ยงชนิด KB มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 8.30, 8.66 และ 8.16 ตามลำดับ (Dhanya et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าสารคูบีบินสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างเม็ดสีในเซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด B16-F10 โดยเพิ่มการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เพิ่มปริมาณเมลานิน (melanin) และเพิ่มกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โมเลกุล p38MAPK (Hirata et al., 2007)



รูปที่ 16 สูตรโครงสร้างสารคูบีบิน (Pubchem, 2018)

### 5) เบอซีเฮอนินและอนุพันธ์

เบอซีเฮอนิน (Bursehernin) หรือ 5'-เดสมิททอกซียาเตอิน (5'-desmethoxyyatein) มีสูตรเคมี คือ  $C_{21}H_{22}O_6$  น้ำหนักโมเลกุล 370.401 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างสารดังแสดงในรูปที่ 17 สารนี้สกัดได้จากพืช *Hernandia peltata* (Pettit et al., 2004) ปัจจุบันมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารเบอซีเฮอนิน เช่น สาร 7,7'-ไดไฮดรอกซีเบอซีเฮอนิน (7,7'-dihydroxybursehernin) จากพืช *Geranium thunbergii* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส (cyclooxygenase; COX) และไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase; NOS) ส่งผลให้ระดับโปรตีน NF- $\kappa$ B ลดลงในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด RAW264.7 (Pokharel et al., 2007)

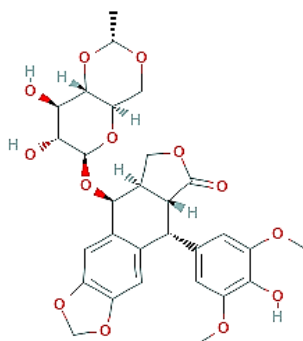


รูปที่ 17 สูตรโครงสร้างสารเบอซีเฮอนิน (Pubchem, 2018)

#### 1.2.3.2.2 สารที่ใช้เป็นยาเคมีบำบัด

##### 1) อีโทโพไซด์

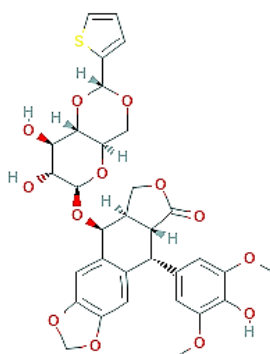
สารอีโทโพไซด์ (Etoposide) เป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งตับ และมะเร็งปอด มีสูตรเคมี คือ  $C_{29}H_{32}O_{13}$  น้ำหนักโมเลกุล 588.562 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างสารดังแสดงในรูปที่ 18 สารอีโทโพไซด์เป็นอนุพันธ์ของสารโพโดฟิลโลทอกซิน ซึ่งเป็นสารที่สามารถสกัดได้จากพืชในกลุ่ม *Podophyllum* (Wilson et al., 2012) กลไกการออกฤทธิ์ของยา คือ ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสทู (topoisomerase II) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอในระหว่างกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งจะส่งผลให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายและทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Devendra, 2011)



รูปที่ 18 สูตรโครงสร้างยาเคมีบำบัดชนิดอีโทโพไซด์ (Pubchem, 2018)

## 2) เทนิโพไซด์

สารเทนิโพไซด์ (Teniposide) เป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว มีสูตรเคมี คือ  $C_{32}H_{32}O_{13}S$  มีน้ำหนักโมเลกุล 656.655 กรัมต่อโมล และมีโครงสร้างสารดังแสดงในรูปที่ 19 สารเทนิโพไซด์เป็นอนุพันธ์ของสารโพโดฟิลโลทอกซิน กลไกการออกฤทธิ์ของยา คือ ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเข้าจับกับเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสทู ส่งผลให้ดีเอ็นเอไม่สามารถคลายเกลียวได้ ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ S ของวัฏจักรเซลล์ และทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอโทซิส (Devendra, 2011)



รูปที่ 19 สูตรโครงสร้างยาเคมีบำบัดชนิดเทนิโพไซด์ (Pubchem, 2018)

### 1.3 วัตถุประสงค์

1) ศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารคูชูโนคินินต่อระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต (cell cycle and proliferation) กระบวนการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) ในก้อนมะเร็งเต้านมของหนูขาวใหญ่ที่ได้รับยาเคมีบำบัดและสารคูชูโนคินินตามความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Western blot analysis

2) ศึกษาฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### 2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

##### 2.1.1 สารคูปูโนคินิน

การศึกษาค้างนี้ได้รับความอนุเคราะห์สารคูปูโนคินินจาก ดร. อามานร์ เทศอาเส็น ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยทำการสกัดจากเมล็ดพริกไทยบดแห้ง ซึ่งสกัดตามวิธีการของ Sriwiryajan และคณะ 2017

##### 2.1.2 ก้อนมะเร็งเต้านม

ก้อนมะเร็งเต้านมที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อามานร์ เทศอาเส็น ทำการเหนี่ยวนำให้หนูขาวใหญ่เพศเมีย สายพันธุ์ Sprague dawley อายุ 50 วัน เกิดก้อนมะเร็งโดยให้สาร NMU ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) หลังจากนั้นคลำก้อนมะเร็งด้วยมือเมื่อก่อนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 ถึง 0.5 เซนติเมตร จึงแบ่งหนูขาวใหญ่ออกเป็น 7 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 6 และให้สารทดสอบเป็นเวลา 14 วัน (อามานร์ เทศอาเส็น, 2561) หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองทำการเก็บก้อนมะเร็งเต้านมมาสกัดโปรตีนและตรวจสอบระดับของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโต, กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยวิธี Western blot analysis

ตารางที่ 6 ก้อนมะเร็งเต้านมจากกลุ่มหนูทดลองและการให้สารทดสอบ

กลุ่มที่	ชื่อกลุ่ม	จำนวน (ตัว)	การทดลอง
1	ปกติ (normal)	8	ไม่ให้ NMU, เลี้ยงโดยให้อาหารและน้ำตามสภาวะปกติ
2	ควบคุม (control)	6	ให้ NMU เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม
3	ตัวทำละลาย (vehicle)	6	ให้ NMU เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม และให้ตัวทำละลายสารที่ประกอบด้วยคลิโมเฟอร์ ความเข้มข้นร้อยละ 10.4, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline; PBS), ไดเมทิลซัลไฟด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 4.2 และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 10.4)
4	ยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	5	ให้ NMU เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม และให้ยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณรอบก้อนมะเร็ง
5	สารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	5	ให้ NMU เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม และให้สารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณรอบก้อนมะเร็ง
6	สารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	5	ให้ NMU เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม และให้สารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณรอบก้อนมะเร็ง
7	สารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	5	ให้ NMU เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม และให้สารสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณรอบก้อนมะเร็ง

### 2.1.3 การศึกษาระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Western blot analysis

#### 2.1.3.1 การสกัดโปรตีน

ตัดก้อนมะเร็งเต้านมแล้วล้างให้ได้น้ำหนักขนาด 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในครกสำหรับบดชิ้นเนื้อ จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลว บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด แล้วเติมบัฟเฟอร์สำหรับการสกัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 25 M Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1% sodium dodecyl sulfate และ 1X proteinase inhibitor) ดูดตัวอย่างลงหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสม สารละลายเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที ทำการแช่แข็งตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้ละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าว 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดส่วนใสซึ่งเป็นโปรตีนใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

#### 2.1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

เตรียมสารละลายเบรดฟอร์ด (Bradford reagent) โดยใช้สัดส่วนดังนี้ สารละลายเบรดฟอร์ด ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 875 ไมโครลิตร เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง (standard curve) ทำการเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างโดยใช้โปรตีนที่สกัดได้ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร มาเจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 1,247.5 ไมโครลิตร (500 เท่า) จากนั้นปิเปตโปรตีนมาตรฐานทุกความเข้มข้นและโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงในจาน 96 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 2 หลุม (duplicate) พร้อมทำ blank โดยการปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม 2 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย Bradford reagent ที่เจือจางแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมกันโดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ หลังจากนั้นนำไปวัด

ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายใน 5 นาที และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

### 2.1.3.3 การแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

#### 1) การเตรียม SDS-PAGE

เตรียมเจล 2 ส่วน คือ ชั้น stacking (อะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 4) และชั้น separating (อะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 12) แสดงส่วนผสมสำหรับเตรียมเจลขนาดใหญ่ (ขนาด 16 x 20 เซนติเมตร) ในตารางที่ 7 และเจลขนาดเล็ก (ขนาด 10 x 7.5 เซนติเมตร) ในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบในเจลชั้น stacking และเจลชั้น separating สำหรับการเตรียมเจลขนาดใหญ่

ส่วนประกอบ	เจล stacking	เจล separating
น้ำกลั่น (distilled water)	5.09 มิลลิลิตร	7.67 มิลลิลิตร
อะคริลาไมด์ 37.5:1	880 ไมโครลิตร	5.4 มิลลิลิตร
Tris pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	-	4.56 มิลลิลิตร
Tris pH 6.8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์	880 ไมโครลิตร	-
SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10	70.28 ไมโครลิตร	179.9 ไมโครลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 10 (ammonium persulphate; APS)	70.28 ไมโครลิตร	179.9 ไมโครลิตร
เตตระเมทิลอีทิลีนไดเอมีน (Tetramethylethylenediamine; TEMED)	7.028 ไมโครลิตร	7.2 ไมโครลิตร



ตารางที่ 8 ส่วนประกอบในเจลชั้น stacking และเจลชั้น separating สำหรับการเตรียมเจลขนาดเล็ก

ส่วนประกอบ	เจล stacking	เจล separating
น้ำกลั่น (distilled water)	0.725 มิลลิลิตร	1.64 มิลลิลิตร
อะคริลาไมด์ 37.5:1	0.125 ไมโครลิตร	1.15 มิลลิลิตร
Tris pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	-	0.97 มิลลิลิตร
Tris pH 6.8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์	0.125 ไมโครลิตร	-
SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10	10 ไมโครลิตร	38.46 ไมโครลิตร
APS ความเข้มข้นร้อยละ 10	10 ไมโครลิตร	38.46 ไมโครลิตร
TEMED	1 ไมโครลิตร	1.54 ไมโครลิตร

การเตรียมเจลชั้น stacking และเจลชั้น separating ดังส่วนประกอบในตารางที่ 7 และ 8 เริ่มจากการเตรียมชั้น separating โดยการผสมส่วนประกอบทั้งหมดของแต่ละเจลให้เข้ากัน ยกเว้น APS และ TEMED ให้ใส่เป็นลำดับสุดท้ายก่อนปิเปตส่วนประกอบทั้งหมดลงกระจกสำหรับเตรียมเจล ทำการปิเปตส่วนประกอบของเจลชั้น separating เป็นลำดับแรก และเติมน้ำกลั่นตามเพื่อทำให้หน้าเจลเรียบและป้องกันการแห้งของหน้าเจล จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับเจลขนาดใหญ่ และ 1 ชั่วโมง สำหรับเจลขนาดเล็ก เมื่อครบเวลาให้เทน้ำกลั่นทิ้งจากนั้นใช้กระดาษกรองซับน้ำกลั่นที่เหลือ อย่าให้กระดาษกรองสัมผัสหน้าเจล จากนั้นจึงเตรียมเจลชั้น stacking โดยผสมส่วนประกอบตามตารางที่ 7 หรือ 8 เทเจลให้ถึงขอบบนของกระจกเตรียมเจลและใส่หวีให้อยู่ตรงกลางระหว่างกระจก ระหว่างการเตรียมเจลอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับเจลขนาดใหญ่และ 30 นาที สำหรับเจลขนาดเล็ก เมื่อครบเวลาจึงนำหวีออกและนำกระจกที่เตรียมเจลเรียบร้อยแล้วมาใส่ในชุด electrode chamber แล้วจึงนำไปใส่ electrophoresis tank และเติมสารละลาย 1X running buffer (ประกอบด้วย 124.6 mM Tris-base, 1.25 M glycine และ 0.5% v/v SDS) เพื่อเตรียมการแยกขนาดของโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล

## 2) การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

นำโปรตีนตัวอย่างปริมาณ 200 ไมโครกรัม ผสมใน 4X protein loading buffer (ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 412.8 mM SDS, 400 mM DTT, 59.9 % v/v glycerol, 8% v/v  $\beta$ -mercaptoethanol และ 0.4 % w/v bromophenol blue) โดยผสมโปรตีนตัวอย่างกับ

4X protein loading buffer ในอัตราส่วนที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ และนำโปรตีนตัวอย่างที่ผสมใน 4X protein loading buffer มาต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ (denature protein) เมื่อครบเวลานำตัวอย่างมาบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และทำการเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (Precision plus protein standard) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมกับ 4X protein loading buffer ในอัตราส่วนเช่นเดียวกับตัวอย่าง

### 3) การหยุดตัวอย่างโปรตีนใน SDS-PAGE และการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

นำโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน มาหยอดลงในแต่ละหลุมในเจลที่เตรียมไว้ สำหรับเจลขนาดใหญ่ให้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วให้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้โปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานผ่านเจลชั้น stacking ลงมาสู่เจล separating จากนั้นทำการเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 180 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการแยก) ส่วนเจลขนาดเล็กให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการแยก) เพื่อแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล จากนั้นนำเจลออกจากกระบอก และย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นเมมเบรนชนิดไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane)

### 4) การย้ายโปรตีนจากเจลพอลิอะครีลาไมด์ลงสู่แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส

หลังจากแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ให้นำเจลมาประกบเป็นชั้น ๆ คล้ายแซนวิช (sandwich) จากประจุลบ (cathode) ไปยังประจุบวก (anode) โดยประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ เรียงตามลำดับดังนี้ 1) ฟองน้ำ (transferring sponge) จำนวน 1 ชั้น 2) กระดาษกรอง 3M จำนวน 2 แผ่น 3) เจลที่มีโปรตีน 4) แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสจำนวน 1 แผ่น 5) กระดาษกรอง 3M จำนวน 2 แผ่น 6) ฟองน้ำจำนวน 1 ชั้น โดยกระบวนการนี้จะทำในสภาพที่มี transfer buffer (ประกอบด้วย 105 M glycine, 48mM Tris-base และ 20% methanol) เมื่อประกอบเป็นแซนวิชเสร็จสมบูรณ์ให้นำมาใส่ใน electrophoretic transfer cell (mini trans-blot) วางทั้งชุดลงใน transfer tank สำหรับเจลทั้ง 2 ขนาด ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 35 โวลต์ เป็นเวลา 1 คืน (overnight) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โปรตีนจะมีทิศทางการเคลื่อนย้ายจากประจุลบมายังประจุบวก เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสมาอ้อมด้วยสี Ponceau S เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าโปรตีนจากเจลได้ย้ายลงสู่แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

#### 2.1.3.4 การตรวจสอบระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis

หลังจากแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้ายโปรตีนจากเจลพอลิอะครีลาไมด์ลงสู่แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส แล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสมาทำการ block ด้วยสารละลาย non-fat milk ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ละลายใน 1X TBS-T (ประกอบด้วย 0.1 % Tween 20, 154 mM NaCl, 48 mM Tris-base pH 6.8) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันไม่ให้อแอนติบอดีไปจับกับโปรตีนที่ไม่จำเพาะ ต่อมานำเมมเบรนมาล้างในสารละลาย non-fat milk ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายใน 1X TBS-T จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นบ่มแผ่นเมมเบรนด้วยแอนติบอดีตัวที่ 1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน c-Src, PI3K, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, Wnt-4, E2f-1, Cyclin D1, p-STAT5, STAT5, VEGF, E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 ใช้ GAPDH เป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ (internal control) โดยระยะเวลาในการบ่มเมมเบรนด้วยแอนติบอดีตัวที่ 1 ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน (ตารางที่ 9) เมื่อครบระยะเวลาในการบ่มเมมเบรน นำเมมเบรนมาล้างในสารละลาย non-fat milk ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายใน 1X TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อล้างเสร็จทำการบ่มเมมเบรนด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วย HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 1X TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ตรวจวัดโปรตีนโดยการผสมบัฟเฟอร์ซูเปอร์ซิกแนลชนิดเวสต์พีโคส, ดูรา หรือเฟมโต สเตเบิลเปอร์ออกไซด์ (SuperSignal® West Pico, Dura, Femto Stable Peroxide Buffer) กับสารละลายซูเปอร์ซิกแนลชนิดเวสต์พีโคส, ดูรา หรือเฟมโต ลูมินอล/เอนแฮนเซอร์ (SuperSignal® West Pico, Dura, Femto Luminol/Enhancer Solution) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำการผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปราดบนแผ่นเมมเบรน ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และนำแผ่นเมมเบรนไปประกบฟิล์มเพื่อดูระดับของโปรตีนหรือนำไปวัดด้วยเครื่อง fusion FX CCD จากนั้นนำผลที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีน (band intensity) ด้วยโปรแกรม Image J

#### 2.1.4 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7

เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยอาหาร Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640) ที่มีเพนิซิลลินความเข้มข้น 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร (50 U/mL penicillin) สเตربتโตมัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (50 µg/mL streptomycin) ฟีตัลโบวีนซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% fetal bovine serum) และ แอล-กลูตามีนความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% L-glutamine) โดยเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80

### 2.1.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี Wound healing assay

เลี้ยงเซลล์ MCF-7 จำนวน  $8 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 12 หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นขูดเซลล์ด้วยทิปขนาด 200 ไมโครลิตร ให้เป็นแนวเส้นตรงผ่านกลางหลุม และล้างเซลล์ที่ขูดออกด้วยสารละลาย PBS เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุม) และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารคูชูโนคินินที่ความเข้มข้น 0.25 เท่าของค่า  $IC_{50}$  และ 0.5 เท่าของค่า  $IC_{50}$  คือ 0.286 และ 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปถ่ายรูปรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) และทำการวัดความกว้างของรอยแผลที่ขูด (ไมโครเมตร) ที่เวลา 0 ชั่วโมง นำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ และถ่ายรูปรูปเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วจึงคำนวณเป็นร้อยละของการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้วิธีคำนวณของ Li และคณะ 2017 แสดงดังสมการ

$$\text{The rate of migration (\%)} = 100 \times \frac{\text{wound healing width at } t_0 - \text{wound healing width at } t_1}{\text{wound healing width at } t_0}$$

Wound healing width at  $t_0$  คือ ความกว้างของรอยแผลที่ขูดที่เวลา 0 ชั่วโมง

Wound healing width at  $t_1$  คือ ความกว้างของรอยแผลที่ขูดที่เวลาต่างๆ (24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง)

ตารางที่ 9 อัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (primary antibody) แอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ระยะเวลาในการบ่มเมมเบรนด้วยแอนติบอดี และวิธีการตีเทคโปรตีน

โปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	อัตราส่วนแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง และ ระยะเวลาการบ่ม	อัตราส่วนแอนติบอดีตัวที่สอง และ ระยะเวลาการบ่ม	ชุด Detection kit และระยะเวลาการตีเทค
c-Src	60	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 30 sec – 3 min
PI3K	110	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 1 min – 5 min
Akt	60	1:1000 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 50 sec – 3 min
p-Erk1/2	42	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Dura, 30 sec - 5 min
Erk1/2	42 หรือ 44	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 30 sec – 1 min
Wnt-4	40	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Dura, 30 sec – 3 min
E2f-1	60	1:200 บ่มนาน 1 คืน	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 30 sec – 5 min
Cyclin D1	36	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Pico:Dura 1:1, 30 sec – 3 min
p-STAT5	90	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 1 min – 7 min
STAT5	90	1:500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Dura:Femto 1:1, 1 min – 5 min
VEGF	42	1:100 บ่มนาน 1 คืน	1:2500 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Pico:dura 2:1, 20 sec – 3 min
E-cadherin	120	1:5000 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:5000 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 20 sec – 2 min
MMP-2	72	1:5000 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:10,000 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Dura:Femto 1:1, 30 sec – 3 min
MMP-9	92	1:2500 บ่มนาน 3 ชั่วโมง	1:5000 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Femto, 30 sec – 2 min
GAPDH	36	1:5000 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	1:5000 บ่มนาน 1 ชั่วโมง	Pico, 10 sec – 50 sec

### 2.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) ระดับของโปรตีนรายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มโดยใช้ One way ANOVA ( $p$ -value  $<$  0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

2) ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 รายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  S.D.) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างเซลล์ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารคูซูโนคินิน โดยใช้ One way ANOVA ( $p$ -value  $<$  0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 )

## 2.2 วัสดุ และอุปกรณ์

### 2.2.1 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการสกัดโปรตีน

สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการสกัดโปรตีน แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการสกัดโปรตีน

รายการ	บริษัท
<b>สารเคมี</b>	
- บัฟเฟอร์สำหรับการสกัดโปรตีน (RIPA bufer)	Thermo fisher scientific
<b>วัสดุ</b>	
- ใบมีดผ่าตัด	Paramount
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	Pyrex
- หลอดไมโครเซ็นตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	BioScience
- ปิเปตทิบขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร	BioScience
- ปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร	Gilson

ตารางที่ 10 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการสกัดโปรตีน (ต่อ)

รายการ	บริษัท
<b>เครื่องมือ</b>	
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและเขย่าด้วยไฟฟ้า รุ่น ZHWY-110X30	Zhicheng
- เครื่องปั่นตกตะกอนและควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RC-5C Plus	Sorvall
- ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส รุ่น DW-86L486	Haier biomedical

2.2.2 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis

สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis แสดงในตารางที่ 11 และแอนติบอดีแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis

รายการ	บริษัท
<b>สารเคมี</b>	
- เมทานอล (Methanol)	J.T.Baker
- ทวิน 20 (Tween 20)	Calbiochem
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	Amresco
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Amresco
- ไกลซีน (Glycine)	Amresco
- ทริสเบส (Tris-Base)	Amresco
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl)	Amresco

ตารางที่ 11 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis (ต่อ)

รายการ	บริษัท
- แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Nitrocellulose transfer membranes, 0.45 $\mu$ m)	BIO-RAD
- APS	BIO-RAD
- TEMED	BIO-RAD
- โปรตีนมาตรฐาน (Precision plus protein standard)	BIO-RAD
- อะคริลาไมด์/บิส 37.5:1 (Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1)	BIO-RAD
- โปรตีนสำหรับวัดปริมาณของโปรตีน (Protein Assay)	Thermo fisher scientific
- บัฟเฟอร์สำหรับการสตรipping (Stripping buffer)	Thermo fisher scientific
- ซูเปอร์ซิกแนลพิโคเคมีลูมิเนสเซนซ์ซับสเตรท (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate)	Thermo fisher scientific
- ซูเปอร์ซิกแนลเวสต์ดูราเอ็กซ์เทนเด็ดดูเรชั่นซับสเตรท (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate)	Thermo fisher scientific
- ซูเปอร์ซิกแนลเวสต์เฟมโตแมกซ์ิมัมเซนซิวิตีซับสเตรท (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate)	Thermo fisher scientific
<b>วัสดุ</b>	
- ปีเปตขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร	Gilson
- ปีเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร	Gilson
- ปีเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร	Gilson
- ปีเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร	Gilson
- จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม	Costar
- ถัง hybridization	Roche
- ฟิล์มสำหรับ Western blotting ขนาด 5x7 นิ้ว	Thermo fisher scientific



ตารางที่ 11 สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระดับของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis (ต่อ)

รายการ	บริษัท
<b>วัสดุ</b>	
- ปีเปตขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร	Gilson
- ปีเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร	Gilson
- ปีเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร	Gilson
- ปีเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร	Gilson
- จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม	Costar
- ถัง hybridization	Roche
- ฟิล์มสำหรับ Western blotting ขนาด 5x7 นิ้ว	Thermo fisher scientific
<b>เครื่องมือ</b>	
- Microplate reader รุ่น SpectraMax M5	Bio-active
- เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (PowerPac HC)	BIO-RAD
- ชุด gel running	BIO-RAD
- ชุด transfer electrophoresis	BIO-RAD
- เครื่องเขย่าตัวอย่างแบบโยก (Digital Rocker)	WiseMix
- เครื่องเขย่าสารละลายแบบหมุนแนวราบพร้อมแท่น	IKA
- เครื่องถ่ายภาพแบบ chemiluminescent และ infrared Fluorescent พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ CCD	Biogenomed
- เครื่องล้างฟิล์ม รุ่น SRX-101A	Konica Minolta

ตารางที่ 12 แอนติบอดีต่อโปรตีนเป้าหมายที่ใช้ใน Western blot analysis

ลำดับ	แอนติบอดีต่อโปรตีนเป้าหมาย	บริษัท	เลขที่สินค้า
1	c-Src	Santa Cruz	Sc-5266
2	PI3K	Santa Cruz	Sc-7174
3	Akt	Cell signaling	#9272
4	p-Erk1/2	Santa Cruz	Sc-7383
5	Erk1/2	Santa Cruz	Sc-271269
6	Wnt	Santa Cruz	Sc-376279
7	E2f-1	Santa Cruz	Sc-251
8	Cyclin D1	Cell signaling	#2922
9	p-STAT5	Cell signaling	#9359
10	STAT5	Santa Cruz	Sc-74442
11	VEGF	Santa Cruz	Sc-507
12	E-cadherin	BD Bioscience	610181
13	MMP-2	Torrey Pines Biolabs	TP220
14	MMP-9	Torrey Pines Biolabs	TP221
15	GAPDH	CalBiochem	CB1001
16	Anti-rabbit IgG HRP-linked Ab	Cell signaling	#7074
17	Anti-mouse IgG HRP-linked Ab	Cell signaling	#7076

### 2.2.3 วัสดุ และอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay

เซลล์เพาะเลี้ยง สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 เซลล์เพาะเลี้ยง สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay

รายการ	บริษัท
<b>เซลล์เพาะเลี้ยง</b>	
- เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7	ATCC
<b>สารเคมี</b>	
- อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640	Invitrogen
- ฟิตัลโบไวน์ซีรัม	Invitrogen
- แอล-กลูตามีน	Invitrogen
- เพนิซิลิน/สเตรปโตมัยซิน (10,000 U/mL)	Invitrogen
- ทริปซิน ความเข้มข้น 0.25%	Invitrogen
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Amresco
- โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ )	Amresco
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Amresco
- โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Amresco
- โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิกแอนไฮไดรรัส ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Amresco
- ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	Amresco
<b>วัสดุ</b>	
- หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Corning
- หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	BioScience
- ปิเปตทิบขนาด 0.1-10 ไมโครลิตร	BioScience
- ปิเปตทิบขนาด 1-200 ไมโครลิตร	BioScience
- ปิเปตทิบขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร	BioScience
- ปิเปตขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร	Gilson
- ปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร	Gilson
- ปิเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร	Gilson
- ปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร	Gilson
- จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 หลุม	Costar
- จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม	Costar

ตารางที่ 13 เซลล์เพาะเลี้ยง สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay (ต่อ)

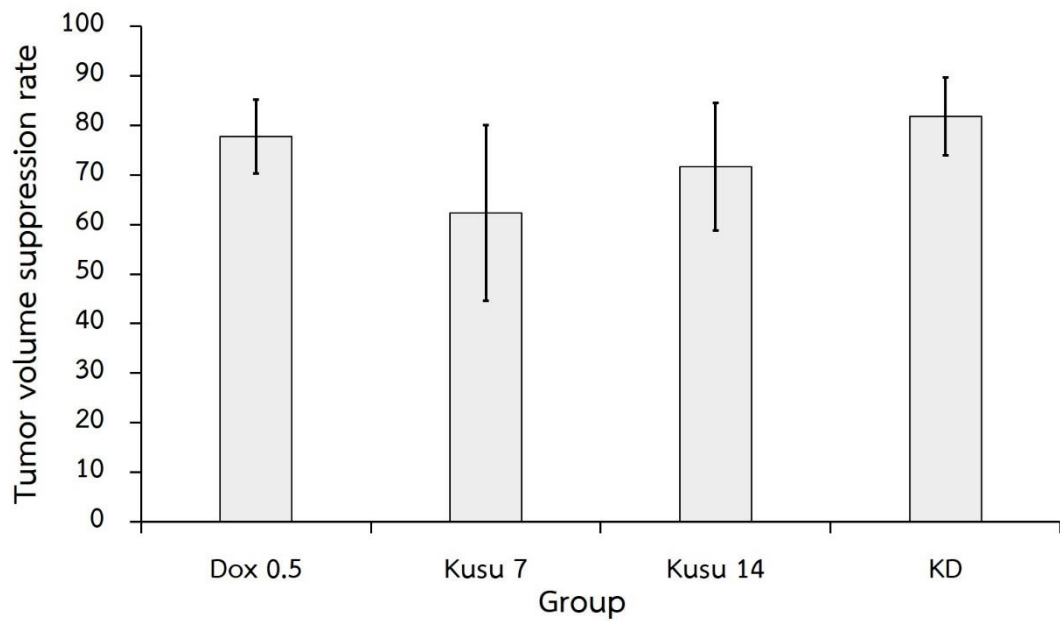
รายการ	บริษัท
<b>เครื่องมือ</b>	
- ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ รุ่น 3410	Sheldon
- ตู้ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ รุ่น LA2-4A1	ESCO
- เครื่องสำหรับปั่นเหวี่ยงหลอดขนาดเล็ก รุ่น 5417C	Eppendorf
- เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดขนาดใหญ่ รุ่น 30RF	Universal
- กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซน (Fluorescence Microscope) รุ่น DP72	OLYMPUS

### บทที่ 3 ผลการวิจัย

#### 3.1 ฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการเจริญเติบโตของกอนมะเร็งเต้านมในหนูขาวใหญ่

กอนมะเร็งเต้านมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อามานร์ เทศอาเส็น โดยกระตุ้นหนูขาวใหญ่เพศเมีย สายพันธุ์ Sprague dawley ให้เป็นมะเร็งเต้านมด้วยสาร NMU หลังจากตรวจพบกอนมะเร็ง หนูขาวจะได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว สารคูชูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว และยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 ร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการวัดขนาดและคำนวณหาปริมาตรของกอนมะเร็งเต้านม เพื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของกอนมะเร็งในหนูกลุ่มต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่ากอนมะเร็งเต้านมของหนูขาวใหญ่กลุ่มที่ได้รับตัวทำละลายมีร้อยละการเจริญเติบโตของกอนอยู่ที่ 92.81 ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว สารคูชูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว และด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินิน มีร้อยละการเจริญเติบโตของกอนอยู่ที่ 22.3, 37.7, 28.4 และ 18.2 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตของกอนมะเร็งเต้านมของหนูขาวใหญ่กลุ่มควบคุม จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของกอนมะเร็งเต้านมได้ และเมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของกอนมะเร็งเต้านม โดยดูผลในวันที่ 14 หลังหนูขาวใหญ่ได้รับสาร พบว่ายาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 77.7 สารคูชูโนคินินที่ขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม สามารถยับยั้งได้ 62.3 และ 71.65 ตามลำดับ และการใช้ยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม ร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 81.8 ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 กราฟแสดงร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมของสารคูนโนคินินในหนูกลุ่มต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมในหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวทำละลาย แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM (ชื่อย่อ Dox 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, Kusu 7 และ Kusu 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ และ KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg)

## 3.2 ผลการศึกษาในระดับของโปรตีนเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งในระดับโมเลกุลของสารคูชูโนคินินด้วยวิธี Western blot analysis

### 3.2.1 กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต

จากผลการศึกษาพบว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณก้อนมะเร็งได้ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงได้เก็บก้อนมะเร็งเต้านมมาสกัด และศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, p-STAT5, STAT5, Wnt-4, E2f-1 และ Cyclin D1 ด้วยวิธี Western blot analysis นำผลของระดับโปรตีนที่ได้ไปคำนวณค่าความเข้มของแบนด์ (intensity) และสร้างเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบหารด้วยความเข้มของแถบโปรตีน GAPDH ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ (internal control) แล้วจึงทดสอบค่าทางสถิติของกลุ่มตัวทำละลายกับกลุ่มทดสอบ

#### 3.2.1.1 โมเลกุลส่งสัญญาณ (Signal molecule) ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโต

##### โปรตีน c-Src

พบว่าระดับโปรตีน c-Src ในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน c-Src ไม่ลดลง (รูปที่ 21)

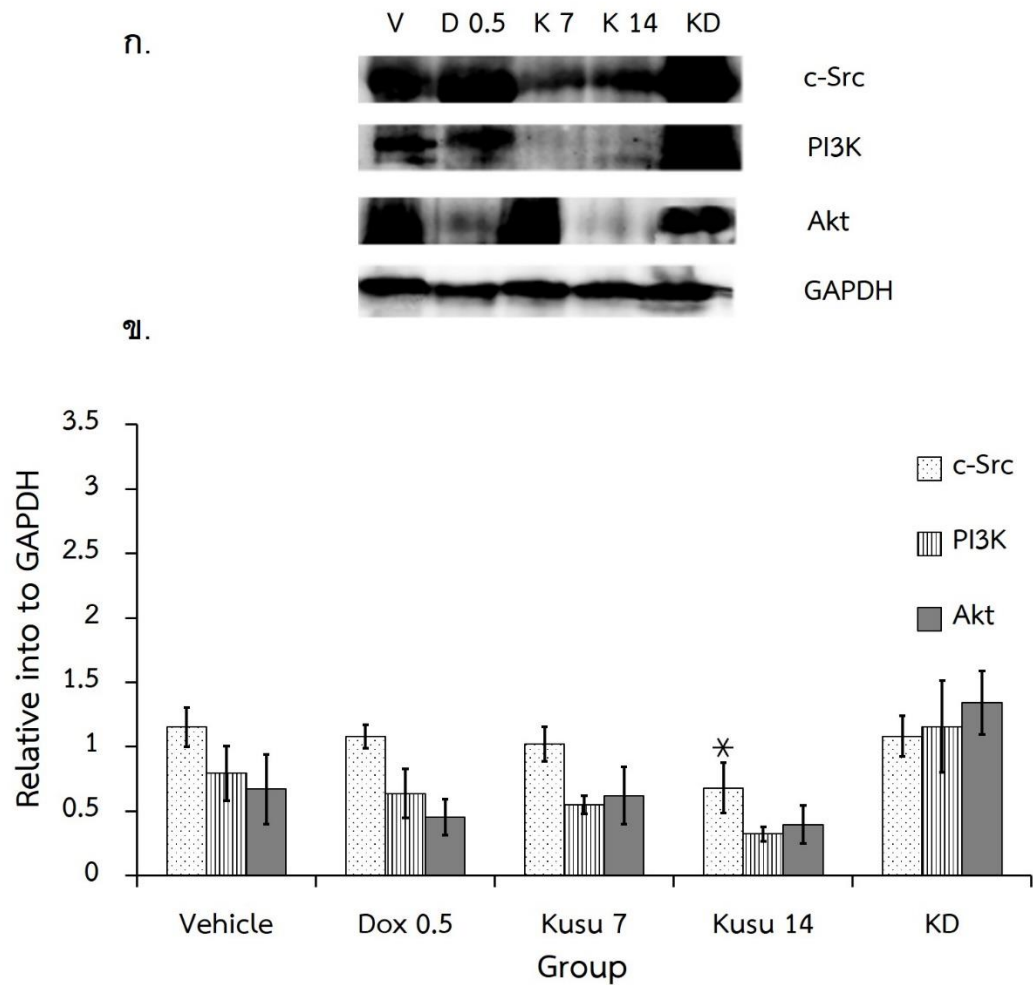
##### โปรตีน PI3K

พบว่าระดับโปรตีน PI3K ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูชูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงอย่างเป็นลำดับแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน PI3K เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 21)

### โปรตีน Akt

พบว่าระดับของโปรตีน Akt ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน และสาร  
คูชูโนคินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง  
สถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีระดับโปรตีนไม่ลดลง และกลุ่ม  
ที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับ  
โปรตีน Akt เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย  
(รูปที่ 21)





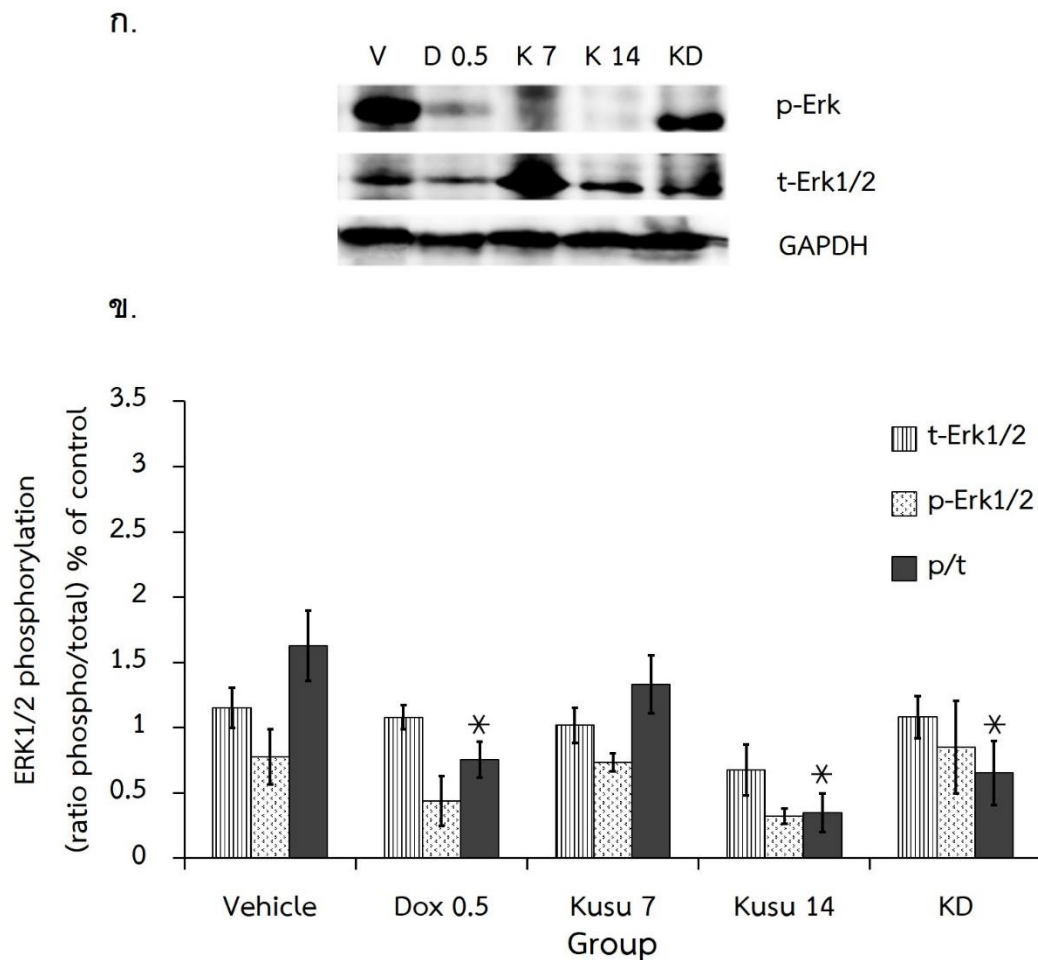
รูปที่ 21 ผลของสารคูซุโนคินินต่อระดับโปรตีน c-Src, PI3K และ Akt ก. ระดับของโปรตีน c-Src, PI3K และ Akt ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ c-Src, PI3K และ Akt กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ one way ANOVA (\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย) (ชื่อย่อ V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ และ KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg)

### โปรตีน Erk1/2

ระดับโปรตีน Erk1/2 ในการศึกษาครั้งนี้จะแสดงเป็นสัดส่วนระหว่างโปรตีน p-Erk1/2 เทียบกับโปรตีน t-Erk1/2 โดยคำนวณค่าความเข้มข้นของแถบโปรตีนแต่ละชนิดเทียบกับ GAPDH ก่อน จากนั้นนำค่าที่ได้มาคิดเป็นสัดส่วนระหว่างโปรตีน p-Erk1/2 และ Erk1/2

จากการทดลองพบว่าระดับโปรตีน t-Erk1/2 ในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม และยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม พบว่าระดับโปรตีน Erk1/2 ไม่ลดลง

ระดับโปรตีน p-Erk1/2 ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม และยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม พบว่าระดับโปรตีน p-Erk1/2 มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 22)



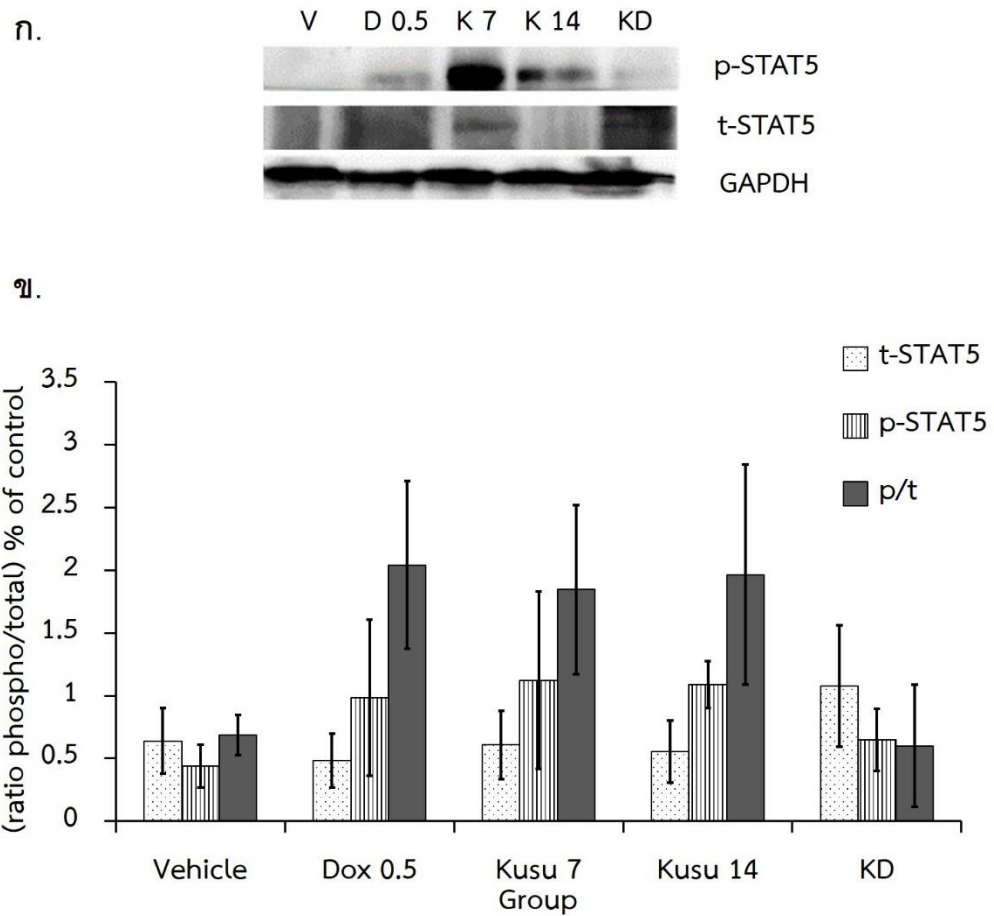
รูปที่ 22 ผลของสารคูนโนคินินต่อระดับโปรตีน p-Erk1/2 และ t-Erk1/2 ก. ระดับของโปรตีน p-Erk1/2 และ t-Erk1/2 ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ p-Erk1/2 และ t-Erk1/2 กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ one way ANOVA (\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย) (ชื่อย่อ V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ, KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg, t-Erk1/2 = total Erk1/2, p-Erk1/2 = phosphorylation Erk1/2 และ p/t = p-Erk/t-Erk

## โปรตีน STAT5

ระดับโปรตีน STAT5 ในการศึกษาครั้งนี้จะแสดงเป็นสัดส่วนระหว่างโปรตีน p-STAT5 เทียบกับโปรตีน t-STAT5 โดยคำนวณค่าความเข้มข้นของแถบโปรตีนแต่ละชนิดเทียบกับ GAPDH ก่อน จากนั้นนำค่าที่ได้มาคิดเป็นสัดส่วนระหว่างโปรตีน p-STAT5 และ t-STAT5

จากการทดลองพบว่าระดับโปรตีน t-STAT5 ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูลูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มที่ได้รับสารคูลูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีนไม่ลดลง ส่วนกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับโปรตีน t-STAT5 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

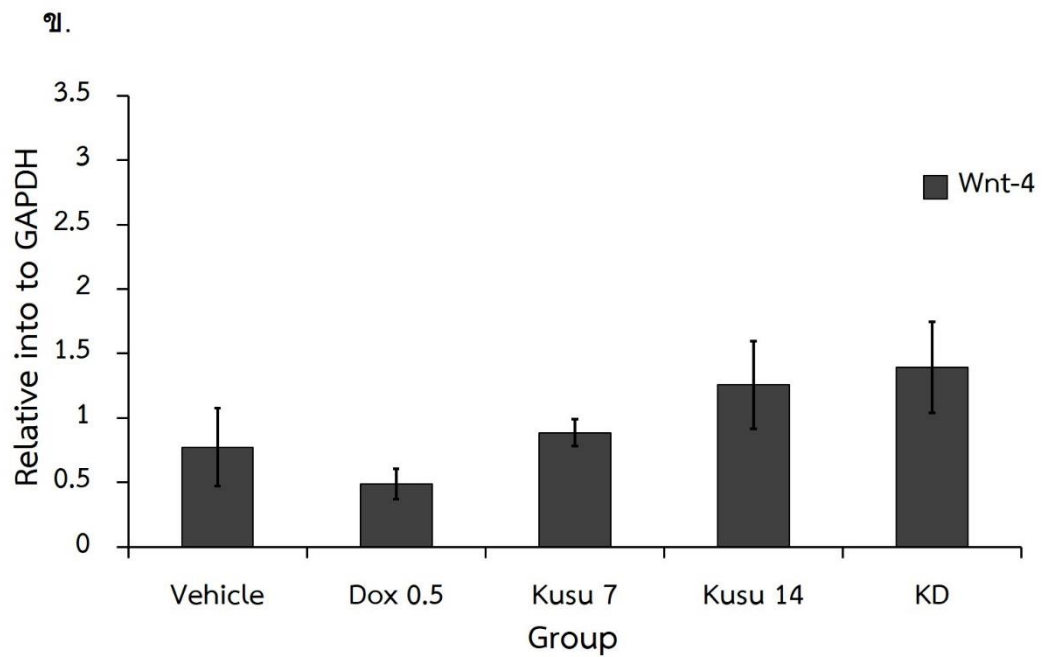
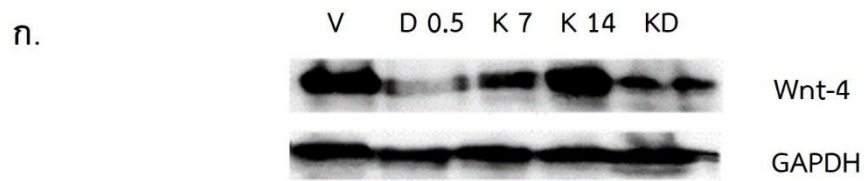
ระดับโปรตีน p-STAT5 ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูลูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำลาย (รูปที่ 23)



**รูปที่ 23** ผลของสารคูชูโนคินินต่อระดับโปรตีน p-STAT5 และ t-STAT5 ก. ระดับของโปรตีน p-STAT5 และ t-STAT5 ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ p-STAT5 และ t-STAT5 กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM (ชื่อย่อ V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ, KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg, t-STAT5 = total STAT5, p-STAT5 = phosphorylation STAT5 และ p/t = p-STAT5/t-STAT5)

### โปรตีน Wnt-4

พบว่าระดับโปรตีน Wnt-4 ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับโปรตีน Wnt-4 ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน Wnt-4 เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 24)



**รูปที่ 24** ผลของสารคูนโนคินินต่อระดับโปรตีน Wnt-4 ก. ระดับของโปรตีน Wnt-4 ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ คือ Wnt-4 กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM (ชื่อย่อ V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ และ KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg)

### 3.2.1.2 โมเลกุลปลายทาง (Downstream molecule) ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโต

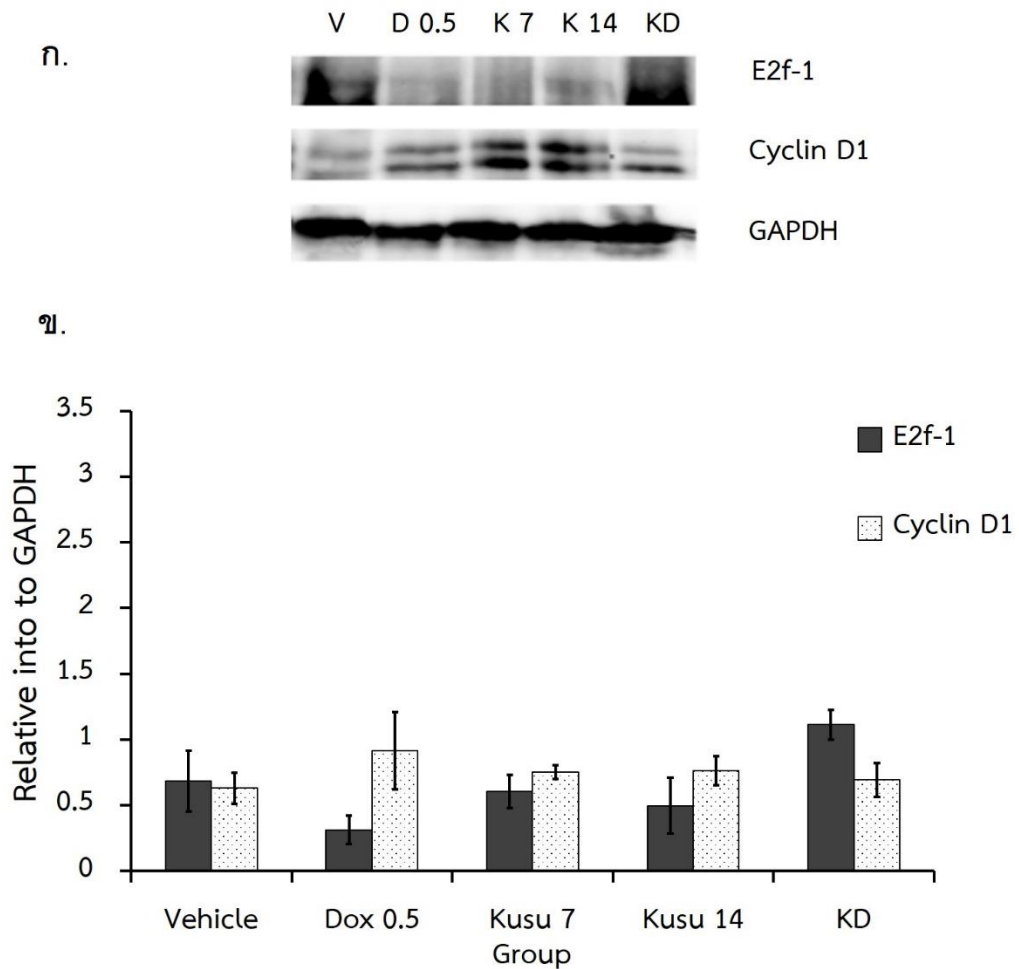
#### โปรตีน E2f-1

พบว่าระดับโปรตีน E2f-1 ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคิโนลินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ได้รับสารคิโนลินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน E2f-1 ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคิโนลินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน E2f-1 เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 25)

#### โปรตีน Cyclin D1

พบว่าระดับโปรตีน Cyclin D1 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 25)





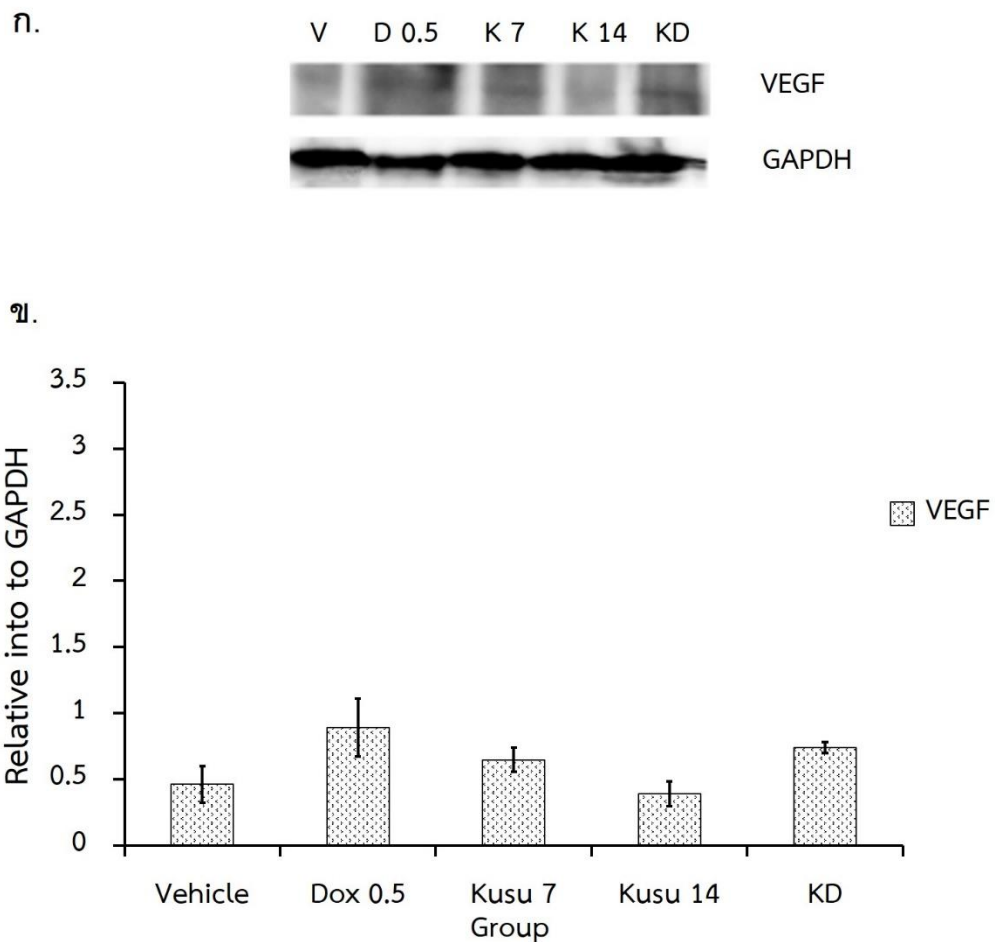
รูปที่ 25 ผลของสารคูนโนคินินต่อระดับโปรตีน E2f-1 และ Cyclin D1 ก. ระดับของโปรตีน E2f-1 และ Cyclin D1 ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ E2f-1 และ Cyclin D1 กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM ซี่งย่อ (V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ และ KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg)

### 3.2.2 กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่

จากผลการศึกษาที่บ่งบอกว่าสารคูลูโนคินินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของก้อนมะเร็ง และลดระดับโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต จึงได้ทำการศึกษาโปรตีนในกระบวนการสร้างหลอดเลือด คือ VEGF ด้วยวิธี Western blot analysis นำผลของระดับโปรตีนที่ได้ไปคำนวณค่าความเข้มของแบนด์ และสร้างเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบหารด้วยความเข้มของแถบโปรตีน GAPDH ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ แล้วจึงทดสอบค่าทางสถิติของกลุ่มตัวทำละลายกับกลุ่มทดสอบ

#### โปรตีน VEGF

พบว่าระดับโปรตีน VEGF ในกลุ่มที่ได้รับสารคูลูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน VEGF เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 ผลของสารคูนโนคินินต่อระดับโปรตีน VEGF ก. ระดับของโปรตีน VEGF ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ คือ VEGF กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM (ชื่อย่อ V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ และ KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg)

### 3.2.3 กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์

จากผลการศึกษาพบว่าสารคูลูโนคินินสามารถลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต และกระบวนการสร้างหลอดเลือดได้ จึงได้ทำการศึกษาระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 ด้วยวิธี Western blot analysis นำผลของระดับโปรตีนที่ได้ไปคำนวณค่าความเข้มของแบนด์ และสร้างเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบหารด้วยความเข้มของแถบโปรตีน GAPDH ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ แล้วจึงทดสอบค่าทางสถิติของกลุ่มตัวทำละลายกับกลุ่มทดสอบ

#### โปรตีน E-cadherin

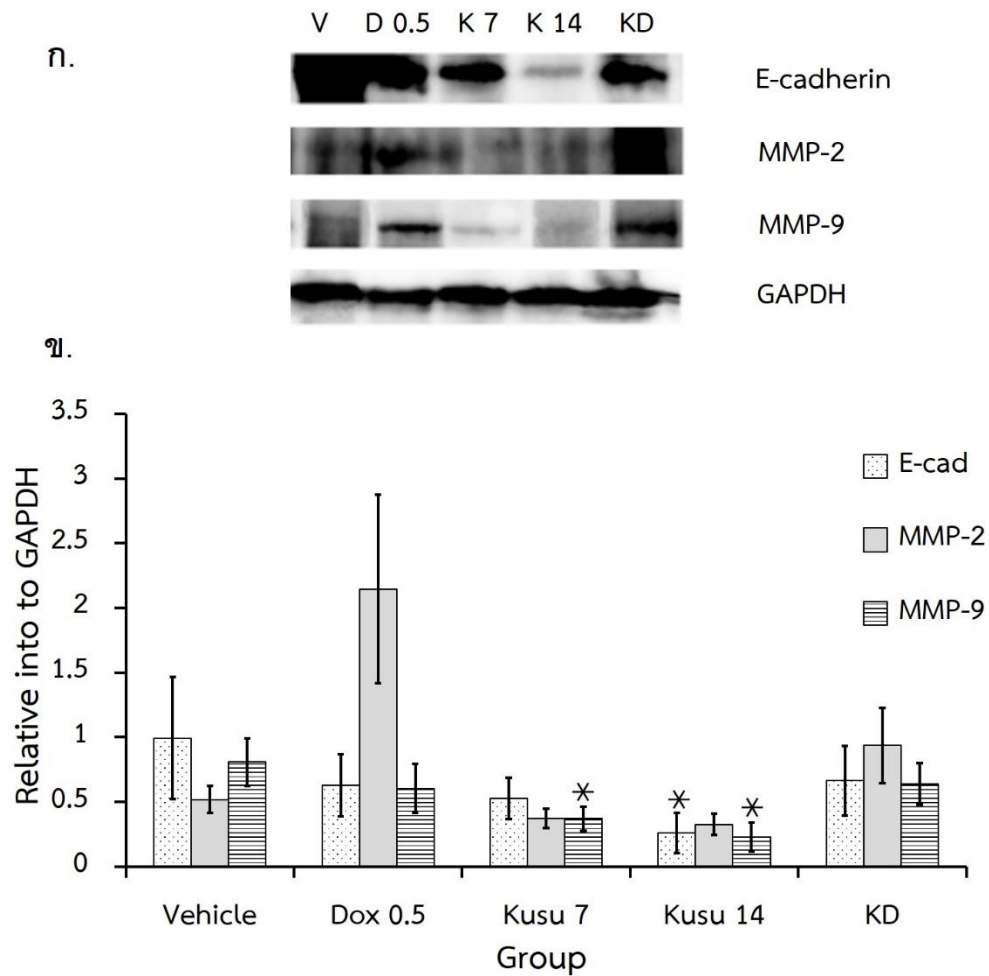
พบว่าระดับโปรตีน E-cadherin ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน สารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารคูลูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน E-cadherin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย (รูปที่ 27)

#### โปรตีน MMP-2

พบว่าระดับโปรตีน MMP-2 ในกลุ่มที่ได้รับสารคูลูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน พบว่าระดับโปรตีน MMP-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย ส่วนกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน MMP-2 เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 27)

#### โปรตีน MMP-9

พบว่าระดับโปรตีน MMP-9 ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน และกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินร่วมกับสารคูลูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารคูลูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีน MMP-9 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 ผลของสารคูนโนคินินต่อระดับโปรตีน E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 ก. ระดับของโปรตีน E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 ที่ได้จากการทำ Western blot analysis ข. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 กับโปรตีน GAPDH (โปรตีนควบคุมปริมาณ) แสดงข้อมูลด้วย mean  $\pm$  SEM และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ one way ANOVA (\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย) (ชื่อย่อ V = Vehicle, D 0.5 = doxorubicin 0.5 mg/kg, K 7 และ K 14 = kusunokinin 7 และ 14 mg/kg ตามลำดับ และ KD = doxorubicin 0.5 mg/kg ร่วมกับ kusunokinin 7 mg/kg)

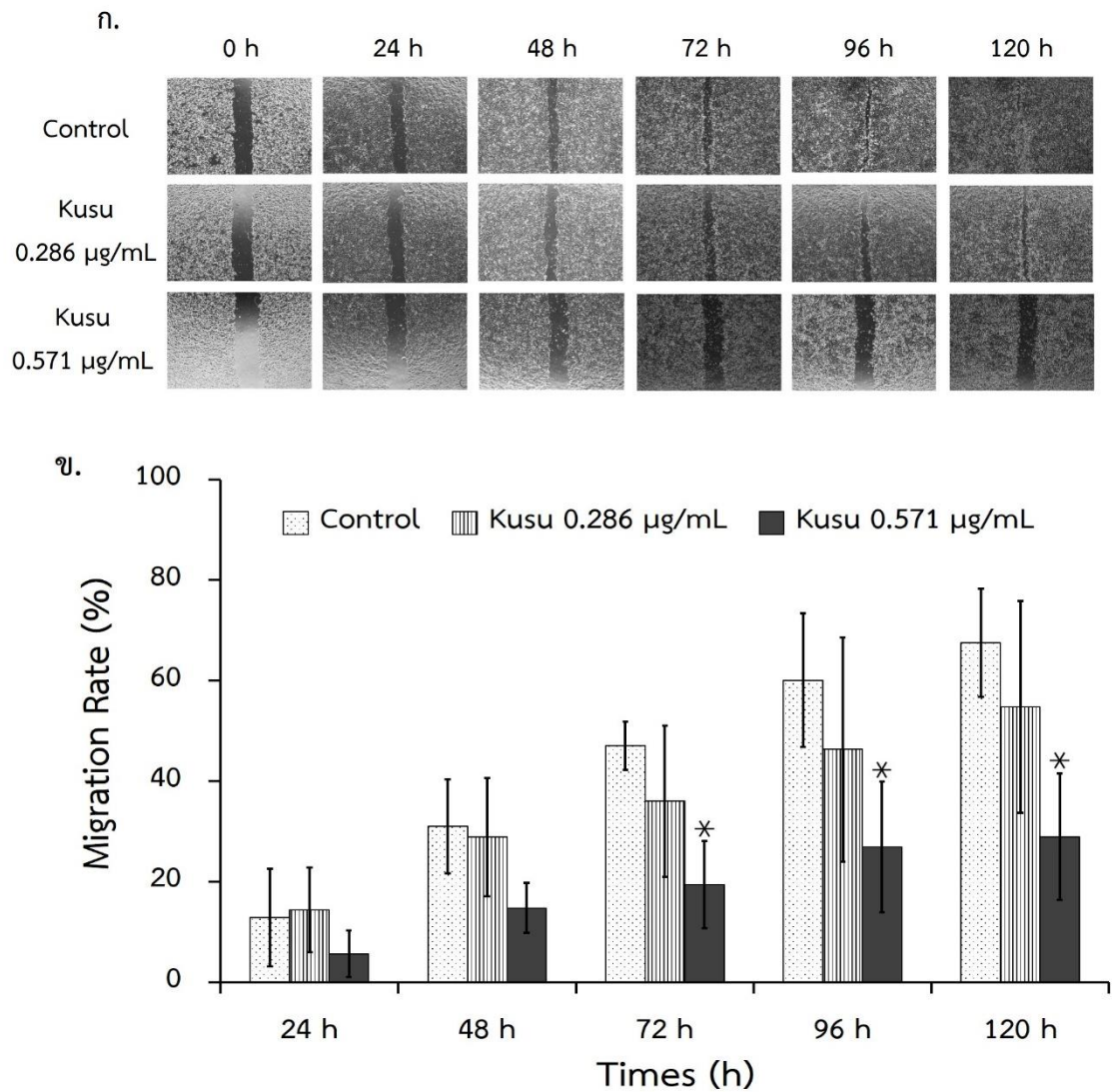
### 3.3 ฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7

จากการศึกษาพบว่าสารคูชูโนคินินสามารถลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของสารคูชูโนคินินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยทำการขูดบริเวณกลางเซลล์ให้เกิดช่องว่าง จากนั้นวัดความกว้างของช่องและคำนวณหาร้อยละของการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยในงานวิจัยครั้งนี้ศึกษาฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 เพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ได้ในสัตว์ทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เซลล์ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ (ควบคุม) และเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารคูชูโนคินินที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 เท่าของค่า  $IC_{50}$  ( $IC_{50} = 1.142$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งจะใช้สารคูชูโนคินินความเข้มข้น 0.286 และ 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการถ่ายภาพและวัดความกว้างของช่องว่างที่ขูดที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 120 เท่ากับ 67.51 ส่วนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินที่ความเข้มข้น 0.286 และ 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 54.75 และ 28.96 ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินที่ความเข้มข้น 0.286 และ 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ลดลงตามช่วงเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยพบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินิน ความเข้มข้น 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 28) ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้นี้อาจสรุปได้ว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม เพาะเลี้ยงชนิด MCF-7

กลุ่มทดลอง	ความกว้างของช่อง ( $\mu\text{m}$ ) ที่เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) (n=3)				
	24	48	72	96	120
ควบคุม	427.44	341.27	262.78	199.49	162.10
สารคูชูโนคินินความเข้มข้น 0.286 $\mu\text{g/mL}$	472.66	393.11	354.07	297.85	250.83
สารคูชูโนคินินความเข้มข้น 0.571 $\mu\text{g/mL}$	502.52	454.74	428.53	392.46	381.63

n=3 : ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย



รูปที่ 28 ผลของสารคูซูโนคินินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7  
 รูป ก. การเคลื่อนที่ของเซลล์ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารคูซูโนคินินที่ความเข้มข้น 0.286 และ  
 0.571 µg/mL ที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง รูป ข. ร้อยละของการเคลื่อนที่ของเซลล์  
 MCF-7 (mean ± S.D. ที่ n=3) (\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



## บทที่ 4

### บทวิจารณ์

#### 4.1 กระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม

กระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม มักเกี่ยวข้องกับ การกลายพันธุ์ของยีน หรือมีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนต่าง ๆ เช่น c-Src, PI3K และ Akt โดยเริ่มจากโกรทแฟคเตอร์ เช่น estrogen, EGF และ IGF เป็นต้น จับกับตัวรับบริเวณผิวเซลล์ เช่น ER, HER2, IGER หรือ EGFR ทำให้โมเลกุล c-Src ทำงาน และเกิดการกระตุ้นต่อไปยังโมเลกุล PI3K ไปจนถึง Akt จากนั้น Akt จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเกิดกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่สำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 29 ได้แก่ (1) เติมห่วงฟอสเฟตให้แก่โปรตีน p21 ส่งผลให้อยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน เมื่อโปรตีน p21 ไม่ทำงานจึงส่งผลให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง จนไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ได้ (Li et al., 2002) (2) กระตุ้น IKK $\alpha$  ทำให้เกิดการสลายของโมเลกุล I $\kappa$ B $\alpha$  จากนั้นโมเลกุล NF- $\kappa$ B จะหลุดเป็นอิสระและทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ c-Myc ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่สำคัญ เช่น Cyclin D1 (Bai et al., 2009) ซึ่ง cyclin D1 จะไปจับกับ CDK2, CDK4 และ CDK6 ได้สารเชิงซ้อน CDK2/cyclin D, CDK4/cyclin D และ CDK6/cyclin D ซึ่งจะไปเติมห่วงฟอสเฟตให้แก่โปรตีน Rb ทำให้โมเลกุล E2F-1 หลุดเป็นอิสระ และกระตุ้นให้สร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่จะทำหน้าที่ผลักดันให้เซลล์ให้เข้าสู่วัฏจักรเซลล์ (Usia et al., 2005) ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจาก Cyclin D1 ยังมีการสร้างโปรตีนที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ คือ VEGF และโปรตีนในกลุ่มที่ต้านการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ bcl-2 และ bcl-xl ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตได้ (3) ในกระบวนการรอดชีวิตของเซลล์พบว่า Akt สามารถเติมห่วงฟอสเฟตให้กับ MDM2 ซึ่งจัดเป็น p53 negative regulator โดย MDM2 จะจับกับ p53 เข้าสู่นิวเคลียสและทำให้เกิดการสลาย p53 โดยกระบวนการ ubiquitination proteosome pathway ทำให้ p53 ไม่สามารถกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิส ส่งผลให้เซลล์รอดชีวิต (Gottlieb et al., 2002) นอกจากกระตุ้น MDM2 ยังพบว่า Akt ยับยั้งการทำงานของโปรตีนในกลุ่มที่ส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิส (bad, bax, bid) ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (4) Akt ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโมเลกุล TSC1/2 ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง Rheb ทำให้ mTORC1 ไปควบคุมการทำงานของซับสเตรทที่สำคัญ ได้แก่ mTORC1 ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นทรานสเลชันแฟคเตอร์ ส่งผลให้เกิดการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เช่น VEGF (Mattioli et al., 2013) (5) ในวิธีการส่งสัญญาณ Wnt-4 พบว่า Akt สามารถยับยั้งการทำงานของ GSK3 $\beta$  ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายโมเลกุล  $\beta$ -catenin เมื่อเอนไซม์ GSK3 $\beta$  ไม่ทำงาน จึงทำให้  $\beta$ -catenin ไม่ถูกสลาย และเพิ่ม

ระดับขึ้นในไซโทพลาสซึม จากนั้น  $\beta$ -catenin จะจับกับโมเลกุล galectin-3 และเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียส ซึ่งภายในนิวเคลียส  $\beta$ -catenin/galectin-3 จะจับกับ T cell factor ทำหน้าที่ควบคุมการ สร้างโปรตีนที่สำคัญ เช่น c-Myc, Cyclin D1 และ p53 ทำให้เกิดกระบวนการเจริญเติบโตและ กระบวนการอะพอโทซิส (Brown AM., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า  $\beta$ -catenin สามารถกระตุ้นการ ทำงานของยีน *Slug* ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่สำคัญต่อกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถ ลุกกลามจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นการทำงานของยีน *Snail* ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน *CDH1* ส่งผลให้การสร้าง E-cadherin ลดลง ทำให้ เซลล์มะเร็งสามารถหลุดจากโมเลกุลยึดเกาะ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการเคลื่อนที่มากขึ้น (Larue and Bellacosa, 2005) (6) นอกจากนี้กระตุ้นโมเลกุล Akt การทำงานของ c-Src ยังทำให้เกิดการ กระตุ้นการทำงานของโมเลกุล Ras ซึ่ง Ras จะทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ Raf-1 จากนั้นจะเกิด การเติมฟอสเฟตให้กับโมเลกุลที่อยู่ถัดไปจนถึงโมเลกุล Erk1/2 จากนั้น Erk1/2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ใน รูปพร้อมทำงานจะเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียส ไปกระตุ้นให้ c-Jun, c-Fos, c-Myc และ Elk-1 ซึ่งเป็น ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน Cyclin D1, Cyclin B1 และ MMP-9 ทำงาน นอกจากนี้โมเลกุล Erk1/2 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ p90RSK ส่งผล c-Jun และ c-Fos กระตุ้นการสร้างโปรตีน Cyclin D1 ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้โมเลกุล c-Src การจับกันระหว่างโกรท- แฟกเตอร์ และตัวรับบนผิวเซลล์ยังทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของวิถีการส่งสัญญาณ JAK/STAT โดยเริ่มจากไซโตไคน์ หรือ EGFR จับกับตัวรับบนผิวเซลล์ เกิดการกระตุ้น JAK ทำให้เกิดกระบวนการ เติมหมู่ฟอสเฟตให้ STAT5 ได้เป็น p-STAT5 ซึ่งเป็นรูปที่สามารถทำงานได้ จากนั้น p-STAT5 จะเกิด การจับคู่กัน เคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ และกระตุ้นการสร้าง โปรตีน VEGF โดย VEGF จะไปจับกับ VEGFR หลังจากนั้นจะเกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน ต่าง ๆ ผ่านวิถีการส่งสัญญาณ MAPK ได้แก่ Ras, Raf, MEK และ Erk ไปกระตุ้นการทำงานของ c-Jun และ c-Fos ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ เกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดเพื่อเลี้ยง เซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตได้ (Hirano et al., 2000)

## 4.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการยับยั้งมะเร็งเต้านม

จากการศึกษาพบว่าสารคูชูโนคินินทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) บ่งบอกได้ว่าสารคูชูโนคินินจากพริกไทยดำมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม จึงได้นำมาสู่การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารคูชูโนคินินจากพริกไทยดำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสาร NMU

ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของก้อนมะเร็ง ในหนูกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยสารต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสารคูชูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมในหนูขาวใหญ่ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร NMU ได้ร้อยละ 62.3 และ 71.65 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดดีออกโซรูบิซิน ดังนั้นจึงคาดว่าฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง จึงทำการสกัดโปรตีนจากก้อนมะเร็งเต้านม เพื่อศึกษาระดับของโปรตีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, STAT5, Wnt-4, E2f-1 และ Cyclin D1 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือด ได้แก่ VEGF และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9

เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมระดับโมเลกุลของสารคูชูโนคินินพบว่าหนูขาวใหญ่ที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตลดลง ได้แก่ โปรตีน c-Src ทำให้ระดับโปรตีน PI3K ลดลงอย่างเป็นลำดับ และส่งผลให้ระดับโปรตีน Akt ลดลง (รูปที่ 30) เช่นเดียวกับการศึกษาสารไดเมทิลพิโนเรซินอล (*dimethylpinorexinol*) ซึ่งเป็นสารกลุ่มลิแกนที่แยกได้จากดอกของพืช *Magnolia fargesii* พบว่าสามารถลดการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของวิถีสัญญาณไซโทไคน์ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำลายเพาะเลี้ยงชนิด NCI-H292 โดยการลดระดับโปรตีน Erk และ Akt (รูปที่ 31) (Lee et al., 2018) ในวัฏจักรเซลล์พบว่าระดับโปรตีน Akt ที่ลดลงอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับโปรตีน p21 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sriwiriyan และคณะ 2017 ที่พบว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยลดระดับโปรตีน topoisomerase II เพิ่มระดับโปรตีน p21 และชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส และเพิ่มระดับโปรตีน p53 ซึ่งจากการลดระดับโปรตีน topoisomerase II อาจทำให้กระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหยุดชะงักลง ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย จากนั้นเซลล์จะกระตุ้นให้ p53 ทำงาน ซึ่ง p53 จะทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ควบคุมการสร้างโปรตีน p21 ซึ่งระดับ p21 ที่เพิ่มขึ้นจะออกฤทธิ์ป้องกันไม่ให้มีการเติมหมู่

ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน Rb ทำให้อยู่ในรูปที่ทำงาน (hypophosphorylated) จึงจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ E2F ทำให้ไม่มีการสร้าง Cyclin E เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ส่งผลให้วัฏจักรเซลล์หยุดลง (Scully and Livingstom, 2000) จากระดับโปรตีน topoisomerase II ที่ลดลงอาจทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ p53 กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพอโทซิส โดยการเพิ่มระดับโปรตีน bax, cytochrome c, caspase-3, caspase-7 และ caspase-8 ดังนั้นจึงส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และเกิดการตายแบบอะพอพอโทซิสในที่สุด (รูปที่ 30)

นอกจากโมเลกุลข้างต้นแล้วจากการศึกษาายังพบว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งกระบวนการเติมฟอสเฟตให้กับโมเลกุล Erk1/2 ส่งผลให้ระดับโปรตีน p-Erk1/2 ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสารซัวชินอน (sauchinone) สารกลุ่มลิแกนที่แยกได้จากพืช *Saururus chinensis* สามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดยการลดระดับโปรตีน NF- $\kappa$ B, p-Raf, p-MEK1/2 และ p-Erk1/2 (รูปที่ 31) (Beom et al., 2010) เนื่องจากการลดระดับโปรตีน p-Erk1/2 จึงได้ศึกษาระดับของโปรตีนปลายทางที่เกี่ยวข้อง โดยพบว่าระดับโปรตีน MMP-9 ลดลงเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนายอามานร์ เทศอาเส้น ที่พบว่าระดับโปรตีน Cyclin B1 ซึ่งเป็นโปรตีนปลายทางจากการทำงานของ p-Erk1/2 ลดลงเช่นเดียวกัน (รูปที่ 30) (อามานร์ เทศอาเส้น, 2561)

จากการศึกษาที่พบว่าสารคูชูโนคินินลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต จึงได้ศึกษาระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งพบว่าระดับโปรตีน E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 ลดลงในหนูขาวใหญ่ที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน Akt ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GSK3 $\beta$  ทำให้โมเลกุล Wnt-4 ทำงานได้เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษาได้พบว่าระดับของโปรตีน Wnt-4 มีการเพิ่มขึ้นในหนูขาวใหญ่ที่ได้รับสารคูชูโนคินิน จากระดับโปรตีน Wnt-4 ที่เพิ่มขึ้นและคาดว่า GSK3 $\beta$  จะถูกยับยั้งการทำงาน จึงส่งผลให้โมเลกุล  $\beta$ -catenin เพิ่มขึ้นและเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 จากนั้นจึงได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 พบว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ในการศึกษากลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์ในระดับโมเลกุลจำเป็นต้องพิจารณาโปรตีน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ (1) E-cadherin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะระหว่างโมเลกุล (van Roy and Bex, 2008) ดังนั้นการสูญเสียหน้าที่หรือการลดปริมาณของ E-cadherin จะชักนำให้เกิดกระบวนการ epithelial mesenchymal transition (EMT) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้มีลักษณะยาวหรือเรียวยาวขึ้น เพื่อให้เหมาะสมต่อการ

เคลื่อนที่ (Larue and Bellacosa, 2005) ทำให้เซลล์มีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย กลุ่มที่ (2) MMP-2 และ MMP-9 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ (Roomi et al., 2008) ดังนั้นในก้อนมะเร็งเต้านมจึงควรมีระดับโปรตีน E-cadherin คงที่ ส่วน MMP-2 และ MMP-9 ควรลดลง ซึ่งจากการศึกษาในระดับของโปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม ในก้อนมะเร็งเต้านมพบว่าสารคิซุนโนคินินสามารถลดระดับโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 ส่วนระดับโปรตีน E-cadherin พบว่าลดลงในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัด ชนิดด็อกโซรูบิซิน และสารคิซุนโนคินิน ขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้การลดระดับของโปรตีน E-cadherin อาจมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งในหนูขาวใหญ่กลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน และสารคิซุนโนคินินทั้ง 2 ขนาด เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะระหว่างโมเลกุล (cell-cell adhesion) ดังนั้นในกลุ่มที่ก้อนมะเร็งมีขนาดลดลง อาจส่งผลต่อการยึดเกาะระหว่างเซลล์ภายในก้อนมะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Deng และคณะ 2016 พบว่าระดับโปรตีน E-cadherin ลดลงในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาดจากพริกไทยดำที่ปราศจากพิเพอริน (piperine free *P. nigrum* extract; PFPE) ขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดก้อนมะเร็งที่ลดลง

ในกระบวนการสร้างหลอดเลือดของเซลล์ จากการศึกษาพบว่าระดับโปรตีน VEGF ลดลงในหนูขาวใหญ่กลุ่มที่ได้รับสารคิซุนโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระดับโปรตีน Akt ที่ลดลง ส่งผลให้การส่งสัญญาณกระตุ้นโมเลกุล IKK $\alpha$  ลดลง ซึ่ง IKK $\alpha$  เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้ NF- $\kappa$ B เข้าสู่นิวเคลียส ทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ กระตุ้นการสร้าง VEGF ดังนั้นเมื่อระดับโปรตีน Akt ลดลงจึงส่งผลให้ระดับโปรตีน VEGF ลดลงตามไปด้วย (รูปที่ 30) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Kim และคณะ 2013 ที่พบว่าสารแมกโนลอล (magnolol) สารกลุ่ม hydroxylated biphenyl ที่แยกได้จากพืช *Magnolia officinalis* สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ กระบวนการสร้างหลอดเลือดของโปรตีน VEGF ในเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำสายสะดือ (Human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) โดยยับยั้งการทำงานของวิถีสัญญาณ Ras และยับยั้งการทำงานของโมเลกุล Erk และ Akt (รูปที่ 31) (Kim et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับโปรตีน VEGF เพิ่มขึ้นในหนูขาวใหญ่กลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน เนื่องมาจากยาเคมีบำบัดชนิดดังกล่าวมีผลเพิ่มระดับโปรตีน IL-6 (Dinesh et al., 2016) ซึ่งระดับโปรตีน IL-6 ที่เพิ่มขึ้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ผ่านการกระตุ้นวิถีสัญญาณ JAK/STAT โดย IL-6 จะเข้าจับกับตัวรับไซโตไคน์บริเวณผิวเซลล์ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นโมเลกุล JAK และทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้ STAT3 จากนั้น STAT3 จะมีการจับคู่กันและเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่

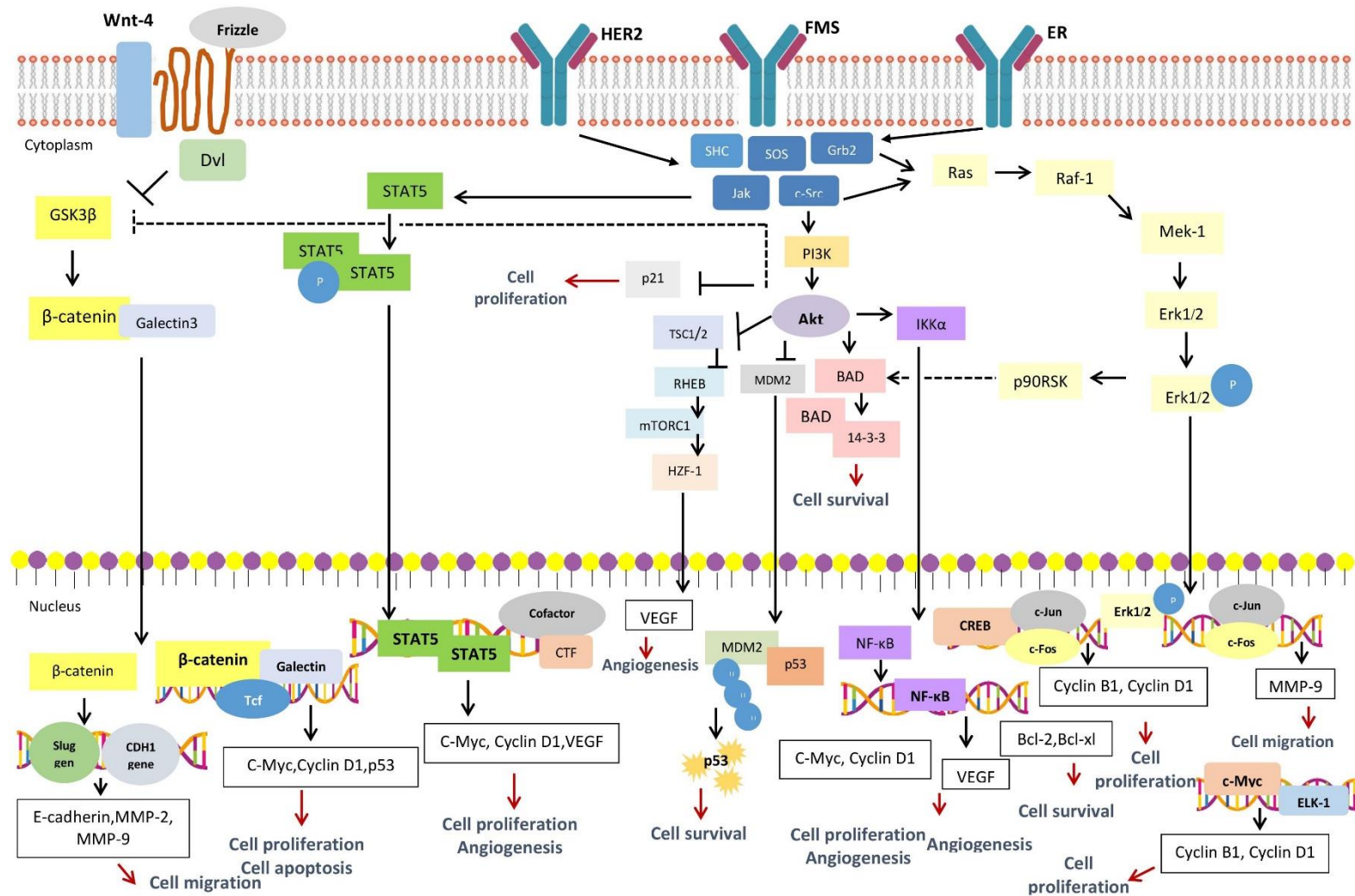
เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดเพื่อหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ได้แก่ VEGF และ HIF- $\alpha$  (Alvarez and Frank, 2004)

จากการศึกษาทั้งหมดเมื่อพิจารณาระดับโปรตีนกับขนาดของสารในหนูแต่ละกลุ่มพบว่าในกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลายมีระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุลส่วนใหญ่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้างโปรตีนปลายทางที่เพิ่มขึ้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะไปทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์ เช่น กระบวนการเจริญเติบโต, กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นต้น จึงส่งผลให้ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในตัวทำละลายสารที่ใช้มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ คลีโมเฟอร์ ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าคลีโมเฟอร์นิยมใช้เป็นตัวทำละลายยาหลายชนิด โดยเฉพาะยาต้านมะเร็ง คือ แพลกตินเทคเซล โดยจากการศึกษาพบว่าคลีโมเฟอร์สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้, ภาวะสารไขมันสูงในเลือด และทำให้เกิดการอักเสบของระบบประสาทส่วนปลาย เป็นต้น (Gelderblom et al., 2001) ดังนั้นจึงส่งผลให้ระดับโปรตีนต่าง ๆ ของหนูในกลุ่มดังกล่าวไม่เป็นไปตามผลที่คาดหวังระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล และโปรตีนปลายทางที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต, กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ในหนูกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซิน และสารคูชูโนคินินขนาดต่าง ๆ พบว่าระดับโปรตีนส่วนใหญ่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมที่ลดลง (รูปที่ 32)

#### 4.3 สารคูชูโนคินินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม

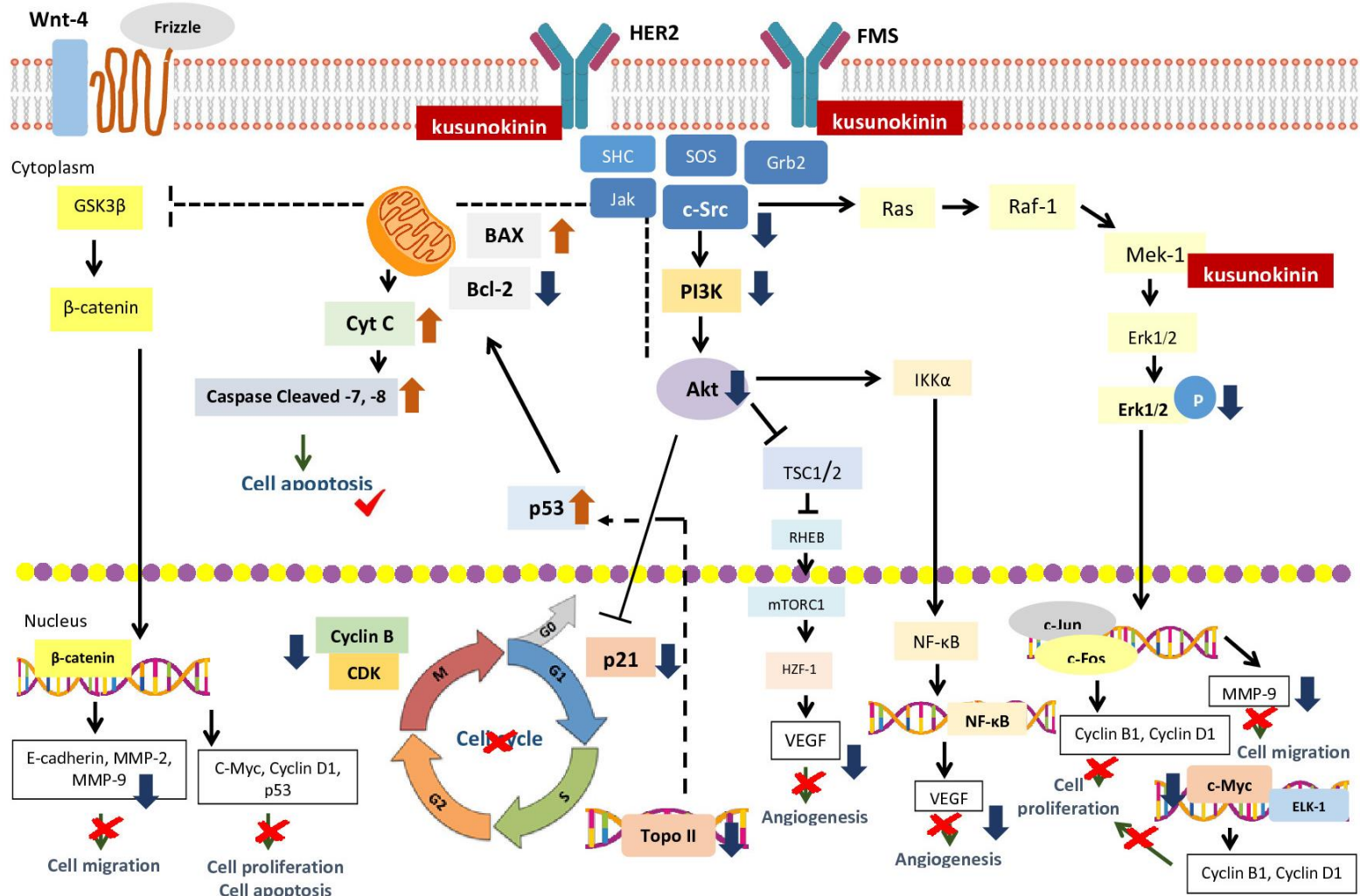
จากผลการศึกษาในระดับโปรตีนในก้อนมะเร็งเต้านม พบว่าสารคูชูโนคินินสามารถลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay พบว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ซึ่งผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาสารอาร์คิจินิน (arctigenin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มลิแกนเช่นเดียวกับสารคูชูโนคินินที่สกัดจาก *Artium lappa* สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยการลดระดับโปรตีน MMP-9 (Maxwell et al., 2017) หรือการศึกษาสารอาร์คิจินินที่ความเข้มข้น 10–200 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231 โดยลดระดับโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 (Hsieh et al., 2014; Lou et al., 2017) หรือการศึกษาสารเซซามิน (sesamin) ที่สกัดจาก *Seasamum indicum* พบว่ายับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด KBM-5 โดยลดระดับโปรตีน MMP-9 (Harikumar et al., 2010)

จากผลการศึกษาที่ได้ทำให้ทราบว่าสารคูชูโนคินินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะการลดระดับโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งเป็นโปรตีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอส (matrix metalloproteinases: MMPs) ในกลุ่ม gelatinases ที่สามารถย่อยเจลาตินและคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนเมทริกซ์ที่เป็นส่วนประกอบใน basement membrane ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามได้ ดังนั้นจากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลหรือเป็นแนวทางในการพัฒนาสารดังกล่าวเป็นยาเพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

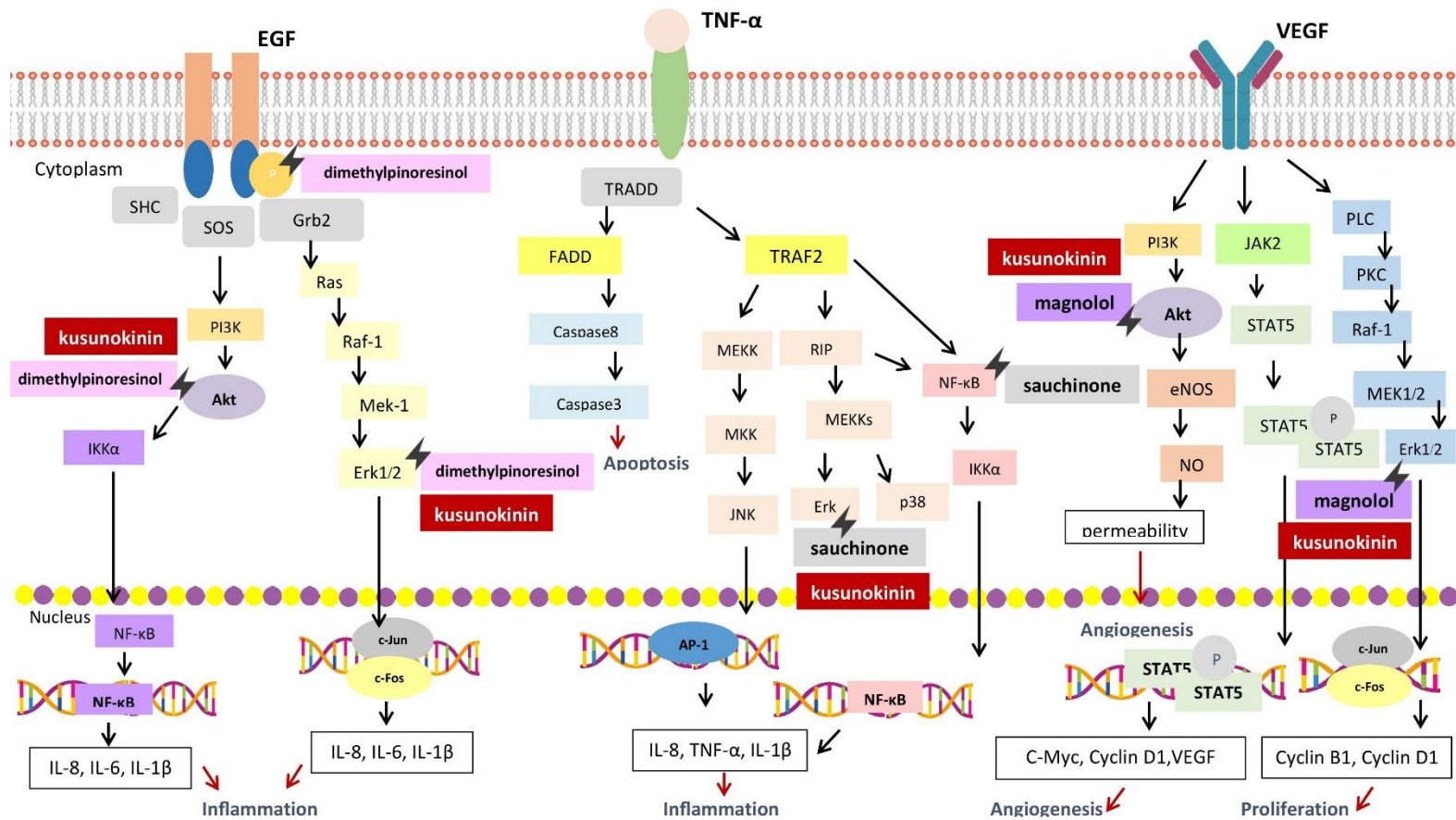


รูปที่ 29 กลไกการเกิดมะเร็งผ่านโมเลกุล (ดัดแปลงจาก Li et al., 2002; Gottlieb et al., 2002; Mattioli et al., 2013; Hirano et al., 2000)

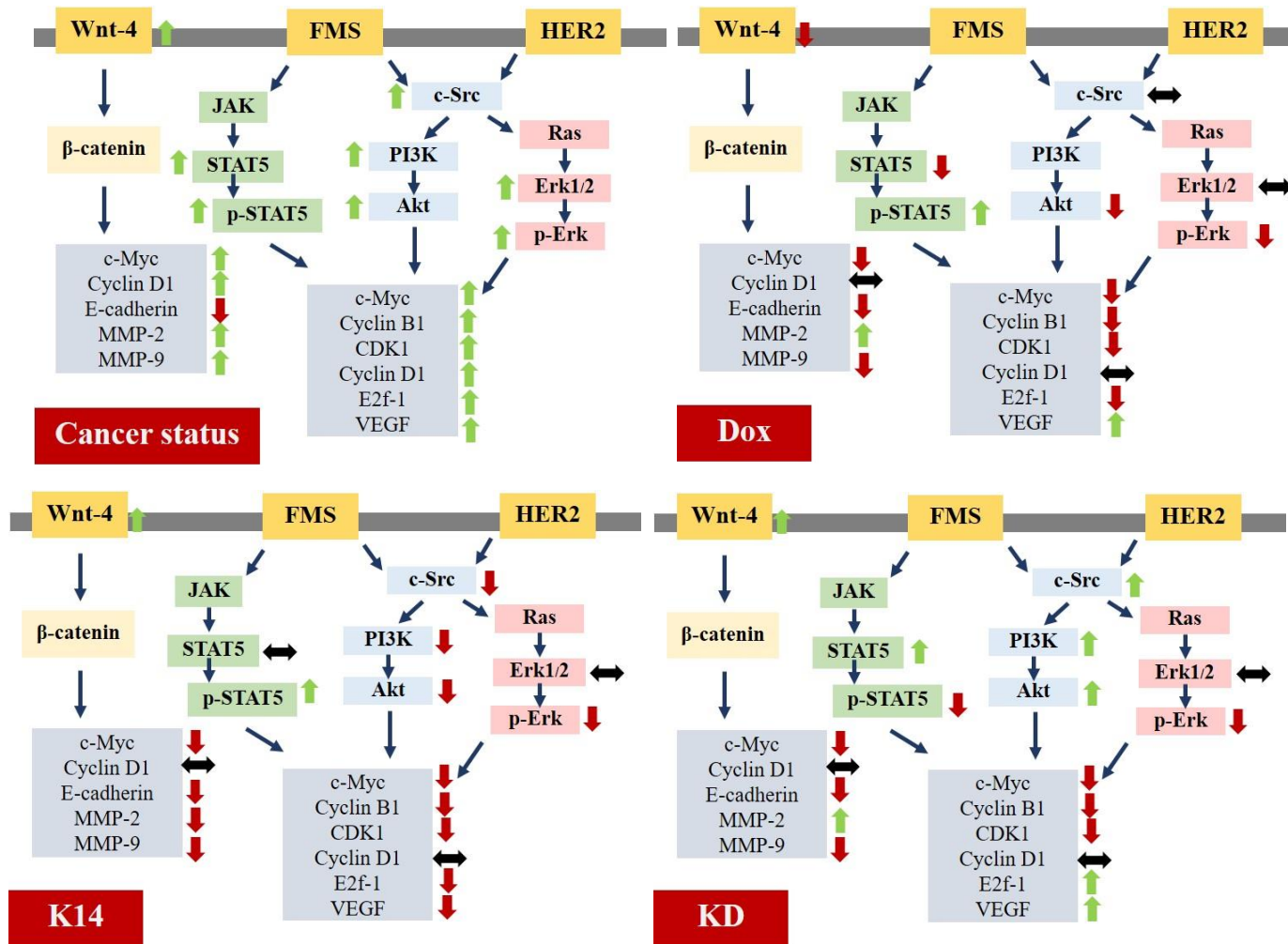




รูปที่ 30 กลไกการต้านมะเร็งเต้านมในระดับโมเลกุลของสารคูนอกินิน



รูปที่ 31 กลไกการต้านมะเร็งต้านในระดัโมเลกุลของสารไดเมธิลพินเรซินอล, ซัวชินอน และสารแมกโนลอล เมื่อเทียบกับสารคูชูโนคินิน (ดัดแปลงจาก Lee et al., 2018; Beom et al., 2010; Kim et al., 2013)



รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนภายในหนูกุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดดีออกโซรูบิซิน (Dox), สารคูชูโนคินินขนาด 14 mg/kg (K14) และได้รับยาเคมีบำบัดร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 mg/kg (KD) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย

## บทที่ 5

### บทสรุป และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 บทสรุป

จากผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งในหนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Sprague-Dawley ในระดับโมเลกุลของสารคิโนซินด้วยวิธี Western blot analysis และการศึกษาฤทธิ์ของสารคิโนซินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ในกลุ่มที่ได้รับตัวทำลาย พบว่าระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt, Wnt-4, และ p-Erk1/2 มีระดับเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้างโปรตีนปลายทาง ได้แก่ Cyclin D1, E2f-1, VEGF, E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 เพิ่มขึ้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะไปทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์ เช่น กระบวนการเจริญเติบโต, กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ จึงส่งผลให้ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง
2. ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดตอกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล ได้แก่ PI3K, Akt, Wnt-4, STAT5 และ p-Erk1/2 มีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะระดับโปรตีน p-Erk12 พบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำลาย และเนื่องจากระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณลดลง จึงส่งผลให้โปรตีนปลายทาง ได้แก่ E2f-1, E-cadherin และ MMP-2 มีแนวโน้มลดลงด้วย ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านม
3. ในกลุ่มที่ได้รับสารคิโนซินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล ได้แก่ Akt, Wnt-4 และ p-Erk1/2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และโปรตีน c-Src, PI3K, STAT5, p-STAT5 และ Erk1/2 ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนระดับโปรตีนปลายทาง ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 มีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะระดับโปรตีน MMP-9 พบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำลาย ส่วนโปรตีน Cyclin D1, E2f-1 และ VEGF ไม่เปลี่ยนแปลง จากผลการศึกษาที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสารคิโนซินขนาด 7

มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่มีผลต่อระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล แต่สามารถลดระดับโปรตีนปลายทางบางชนิดได้

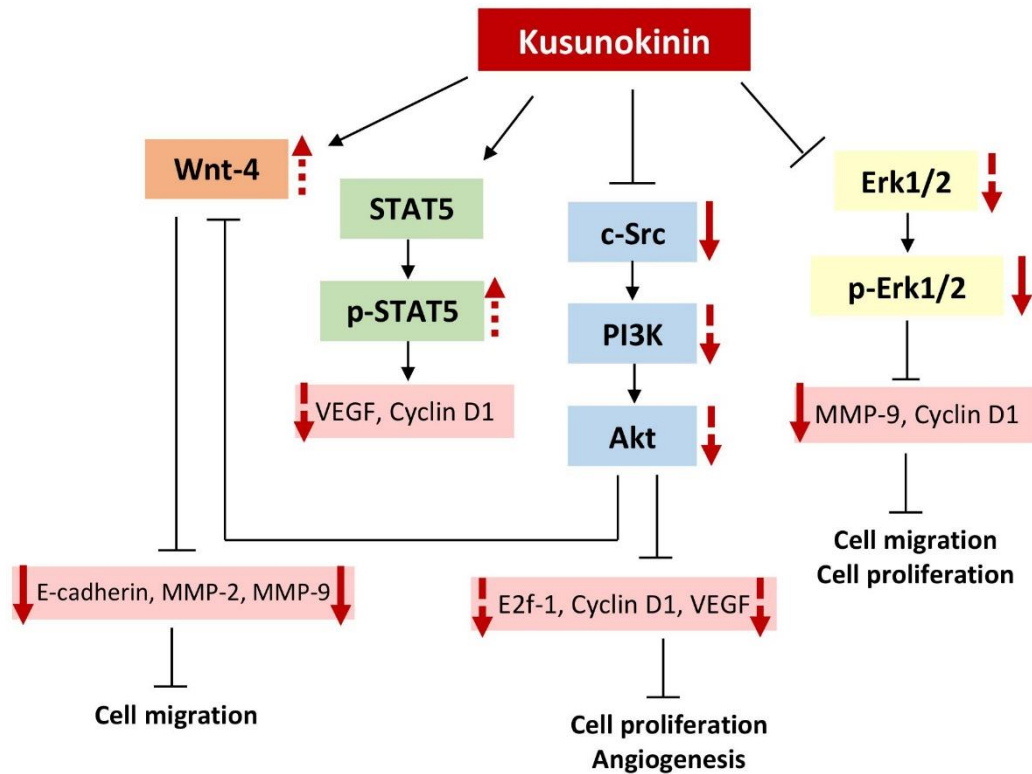
4. ในกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt และ p-Erk1/2 มีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะระดับโปรตีน c-Src และ p-Erk1/2 พบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย และเนื่องจากระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณลดลง จึงส่งผลให้โปรตีนปลายทางส่วนใหญ่ลดลง เช่น E2f-1, VEGF, E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 โดยเฉพาะระดับโปรตีน E-cadherin และ MMP-9 พบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย จากผลการศึกษาที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในก้อนมะเร็งเต้านมได้ตั้งแต่โปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุลไปจนถึงโปรตีนปลายทาง

5. ในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับสารคูชูโนคินินขนาด 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุลเพิ่มขึ้น ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt, Wnt-4 และ STAT5 ส่วนระดับโปรตีน p-Erk1/2 พบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย โปรตีนปลายทาง ได้แก่ E-cadherin และ MMP-9 มีแนวโน้มลดลง ส่วนระดับโปรตีน VEGF และ MMP-2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขนาดของสารไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนต่าง ๆ ดังนั้นจึงเห็นว่าระดับโปรตีนของหนูในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าการให้สารคูชูโนคินินร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดด็อกโซรูบิซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งมะเร็งเต้านมได้ดีเท่าการให้สารคูชูโนคินินเพียงชนิดเดียว

6. ในการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าสารคูชูโนคินินที่ความเข้มข้น 0.286 และ 0.571 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ได้ โดยผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น

จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าสารคูชูโนคินินสามารถลดระดับโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล ได้แก่ c-Src, PI3K, Akt และ p-Erk1/2 โดยเฉพาะ c-Src และ p-Erk1/2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเนื่องมาจากระดับโปรตีนดังกล่าวลดลง จึงส่งผลให้ระดับโปรตีน Wnt-4 เปลี่ยนแปลง และการสร้างโปรตีนปลายทางที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ

ลดลง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่ากลไกระดับโมเลกุลของสารคูกูโนคินินในการยับยั้งมะเร็งเต้านม เกี่ยวข้องกับการลดระดับโปรตีนที่อยู่ในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างหลอดเลือด และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยผ่านทางวิถีสัญญาณ Akt, Ras และ Wnt-4 (รูปที่ 33)



รูปที่ 33 กลไกการออกฤทธิ์ของสารคูกูโนคินินในการยับยั้งมะเร็งเต้านมในหนูขาว

- ↓ = ระดับโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ
- ⇓ = ระดับโปรตีนมีแนวโน้มลดลง
- ⋮ = ระดับโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารคูชูโนคินินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณก้อนมะเร็ง โดยไปลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างหลอดเลือด กระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ และยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาผลกระทบด้านมะเร็งเต้านมของสารคูชูโนคินินเพิ่มเติม คือ

1. ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารคูชูโนคินินในสัตว์ทดลองที่มีจำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยคำนวณจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ดังสมการ

$$n = 2 \left[ \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})\sigma}{D} \right]^2$$

โดย -  $Z_{\alpha/2}$  คือ ค่าคงที่จากตาราง Z ตามค่า  $\alpha = 1.96$  (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก ค.)

-  $Z_{\beta}$  คือ ค่าคงที่จากตาราง Z ตามค่า power การกระตุ้นให้เกิดมะเร็งเต้านมด้วยสาร NMU สามารถทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองชนิด SD rats เพศเมียได้ร้อยละ 80 คิดเป็น 0.842 (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก ค.)

-  $D$  คือ ค่า effect size ในที่นี้ คือ กลุ่มทดลองสามารถลดขนาดก้อนมะเร็งได้ร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจึงจะหยุดการทดลอง ดังนั้นคือให้  $D$  เท่ากับ 0.5

-  $\sigma$  คือ ค่า standard deviation ของกลุ่มควบคุม = 1 (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก ค.) แทนค่าในสมการ

$$n = 2 \left[ \frac{(1.96 + 0.842)1}{0.5} \right]^2$$

$$n = 62.72 = 63 \text{ ตัว}$$

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการให้สารคูชูโนคินินขนาด 7 และ 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารคูชูโนคินินขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านม และลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ได้ (effective dose) ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปอาจแบ่งกลุ่มการทดลองโดยใช้จำนวนสัตว์ทดลองที่คำนวณได้จากสมการข้างต้น ซึ่งจะแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 9 ตัว ดังนี้

- (1) หนูกลุ่มปกติ เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร NMU และไม่ได้รับสารทดสอบ
- (2) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU
- (3) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับตัวทำละลาย
- (4) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับยาเคมีบำบัดชนิดดีออกโซริบิซิน ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- (5) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับสารคูซูโนคินินในขนาด 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (effective dose)
- (6) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับสารคูซูโนคินินในขนาด 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (2 เท่าของ effective dose)
- (7) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับสารคูซูโนคินินในขนาด 42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (3 เท่าของ effective dose)

2. จากผลการศึกษาทำให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารคูซูโนคินิน ซึ่งผ่านทางวิถีสัญญาณ Akt, Ras และ Wnt-4 เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมโมเลกุลต่าง ๆ ในวิถีสัญญาณดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปอาจทำการศึกษาโมเลกุลเพิ่มเติม ได้แก่ p-HER2, p-Src, c-Jun, c-Fos และ  $\beta$ -catenin เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ด้านมะเร็งของสารคูซูโนคินินเพิ่มเติม และพัฒนาสารดังกล่าวเป็นยารักษามะเร็งเต้านมต่อไป



## บรรณานุกรม

- จุฬาลักษณ์ โกมลตรี. บทความพิเศษ การคำนวณขนาดตัวอย่าง. วารสารสุขภาพจิตแห่งประเทศไทย. 2555; 20: 192-98.
- ภรณ์ เหล่าอิทธิ, และนภา ปริญญาติกุล. มะเร็งเต้านม: ระบาดวิทยา การป้องกันและแนวทางการตรวจคัดกรอง. จุฬาลงกรณ์เวชสาร. 2559; 5: 497-507.
- วสุ ศุภรัตน์สิทธิ. ยาต้านมะเร็ง. [อินเทอร์เน็ต] 2556. [เข้าถึงเมื่อ 28 พฤศจิกายน 2561] เข้าถึงได้จาก <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/176>.
- วิระพล ภิมาลย์. เกสัชกรรมบำบัดโรคมะเร็งเต้านม Pharmacotherapy in breast cancer. 2555; 256-86.
- วิชญ์ โล่ห์สิริวัฒน์ และศุภกร โรจนนินทร์. Oncoplastic breast reconstruction. Head neck and breast. 2552; 373-89.
- ศิริมาศ กางนวาส และวิจิตรา ทศนียกุล. โมโนโครนอล แอนติบอดี: เป้าหมายของการรักษามะเร็ง. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2551; 23: 440-6.
- สรายุทธ์ จันทรมหเสถียร. ยาต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งไซคลินดีเพนเดนทีไคเนส. วารสารไทยเภัชชนิพนธ์. 2549; 7: 1-15.
- อดุลย์ รัตน์วิจิตรศิลป์ และนิตย์ ศุภะพงษ์. Surgical treatment of malignant breast disorder. ศัลยศาสตร์ ศีรษะ คอ และเต้านม 2547; 3: 153-67.
- อามานร์ เทศอาเส็น. ฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเถาวัลย์เปรียงและพริกไทยดำ [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทชั้นบัณฑิต]. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2561.
- เอื้อมแข สุขประเสริฐ. Cancer therapy. ขอนแก่น: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2554; 25-39.
- Albo D, Wang TN, Tuszynski GP. Antiangiogenic therapy. Curr Pharm Des. 2004; 10: 27-37.
- American Cancer Society. breast cancer [Internet]. 2017 [Cited 2018 November 28] Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>.
- Andjelkovic M, Maira SM, Cron P, Parker PJ, Hemmings BA. Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. Mol Cell Biol. 1999; 7: 5061-72.

- Awale S, Kato M, Dibwe DF, Li F, Miyoshi C, Esumi H, et al. Antiausterity activity of arctigenin enantiomers: Importance of (2R, 3R)-absolute configuration. *Nat Prod Commun.* 2014; 9: 79-82.
- Bae HB, Li M, Son JK, Seo CS, Chung SH, Kim SJ, et al. Sauchinone, a lignan from *Saururus chinensis*, reduces tumor necrosis factor- $\alpha$  production through the inhibition of c-raf/MEK1/2/ERK 1/2 pathway activation. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10: 1022-8.
- Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T, et al. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2058.
- Barros MT, Leal IC, Kuster RM, Amaral AC, Kokis V, Silva MG, et al. Brazilian phytopharmaceuticals-evaluation against hospital bacteria. *Phytother Res.* 2005; 19: 519-25.
- Bergman JM, Thompson LU, Dabrosin C. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 1061-7.
- Beth AW. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014; 25: 2677-81.
- Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR activating mutations. *Mod Pathol.* 2005; 18: 1027-33.
- Brian IR. Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma: Current Status and Future Directions. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 1098-1106.
- Chen LH, Fang J, Li H, Demark WW, Lin X. Enterolactone induces apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells via a mitochondrial-mediated, caspase-dependent pathway. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 2581-90.
- Clark AR, Toker A. Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem Soc Trans.* 2014; 42: 1349-55.
- Costa M, Lisa MM. mTOR Complexes in Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders. *Nat Neurosci.* 2013; 16: 1537-43.

- Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 72-9.
- Deng Y, Sriwiriyan S, Tedasen A, Hiransai P, Graidist P. Anti-Cancer Effects of *Piper Nigrum* via Inducing Multiple Molecular Signaling in Vivo and in Vitro. *J Ethnopharmacol.* 2016; 188: 87-95.
- Devendra ST. Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Treatment. *IJPSN.* 2011; 3: 1173-81.
- Di Y, De SF, Krol ES, Alcorn J. Flaxseed Lignans Enhance the Cytotoxicity of Chemotherapeutic Agents against Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and SKBR3. *Nutr Cancer.* 2018; 70: 306-15.
- Dinesh V, Kaivalya D, Lakshmishankar C, Laput G, Karen C. Rapid Extensive Recurrence of Triple Negative Breast Cancer: Are Both Therapy and Cancer Biology the Culprit?. *Clin Med Res.* 2016; 8: 162-67.
- Dong , Lynn U, Peter KV. Akt-mediated regulation of NF- $\kappa$ B and the essentialness of NF- $\kappa$ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer.* 2009; 125: 2863-70.
- Donoso FC, Tiezzi A, Ovivi E, Ceccarelli D, Mastrogiovanni F, et al. Antiproliferative activity of yatein isolated from *Austrocedrus chilensis* against murine myeloma cells: Cytological studies and chemical investigations. *Pharm Biol.* 2015; 53: 378-85.
- Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF an its receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 669-76.
- Gang S, Gaoliang O, Shideng B. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9: 59-71.
- Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer.* 2001; 37: 1590-8.
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and Cancer: Mutations within Caspase Genes. *J Med Gent.* 2009; 46: 497-510.
- Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: Possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2002; 21: 1299-303.

- Greenshields AL, Doucette CD, Sutton KM, Madera L, Annan H, Yaffe PB, et al. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2015; 357: 129-40.
- Hallman K, Aleck K, Dwyer B, Lloyd V, Quigley M, Sitto N, et al. The Effects of Turmeric (Curcumin) on Tumor Suppressor Protein (p53) and Estrogen Receptor in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer.* 2017; 9: 153-61.
- Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 292-302.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000; 19: 2548-56.
- Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15: 4897-902.
- Hsieh CJ, Kuo PL, Hsu YC, Huang YF, Tsai EM, Hsu YL. Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. *Free Radic Biol Med.* 2014; 67: 159-70.
- Hui L, Sang C, Wang D, Wang X, Wang M, Jia Q, et al. Newly synthesized podophyllotoxin derivative, LJ12, induces apoptosis and mitotic catastrophe in non-small cell lung cancer cells in vitro. *Mol Med Rep.* 2016; 13: 339-46.
- Ikeda R, Nagao T, Okabe H, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M, Mori M. Anti-proliferative constituents in Umbelliferae plants. IV. Constituents in the fruits of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Chem. Pharm. Bull.* 1998; 46: 875-8.
- Irmgard T, Gerd G. Opioids As Modulators of Cell Death and Survival-Unraveling Mechanisms and Revealing New Indications. *Pharmacological.* 2004; 56: 351-69.
- Jack K, Hye YM, Eun JL, Yeong SK, Ki HB, Sam SK. Growth inhibition and cell cycle arrest in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> by schizandrin, a dibenzocyclooctadiene lignan isolated from *Schisandra chinensis*, on T47D human breast cancer cells. *Phyther. Res.* 2009; 24: 193-7.

- Jagetia GC, Nayak V, Vidyasagar MS. Evaluation of the antineoplastic activity of guduchi (*Tinospora cordifolia*) in cultured HeLa cells. *Cancer Lett.* 1998; 127: 71-82.
- James VA, David AF. Genome-wide analysis of STAT target genes: Elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol Ther.* 2004; 3: 1045-50.
- Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF, Liden G. Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol Bioeng.* 2005; 92: 541-52.
- Kim KM, Kim NS, Kim J, Park JS, Yi JM, Lee J, et al. Magnolol suppresses vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by inhibiting Ras-dependent mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Nutr Cancer.* 2013; 65: 1245-53.
- Kuzhuvelil BH, Bokyoung S, Sheeja TT, Manoj KP, Beena J, Sushovan G, et al. Sesamin Manifests Chemopreventive Effects through Suppression of NF- $\kappa$ B-regulated Cell Survival, Proliferation, Invasion and Angiogenic Gene products. *Mol Cancer Res.* 2010; 8: 751-61.
- Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005; 24: 7443-54.
- Le PN, McDermott JD, Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers. Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther.* 2015; 146: 1-11.
- Lee IS, Kim YS, Jung SH, Yu SY, Kim JH, Sun H, et al. Lignans from the stems and leaves of *Brandisia hancei* and their effects on VEGF-induced vascular permeability and migration of HRECs and DLAV formation in zebrafish. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015; 79: 581-6.
- Lee SU, Ryu HW, Lee S, Shin IS, Choi JH, Lee JW, et al. Lignans Isolated From Flower Buds of *Magnolia fargesii* Attenuate Airway Inflammation Induced by Cigarette Smoke *in vitro* and *in vivo*. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 970-83.

- Li Y, Dowbenko D, Lasky LA. AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11352-61.
- Lin X, Switzer BR, Demark WW. Effect of mammalian lignans on the growth of prostate cancer cell lines. *Anticancer Research.* 2001; 21: 3995-99.
- Lionel L, Alfonso B. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 30 kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005; 24: 7443-54.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 330-8.
- Lou C, Zhu Z, Zhao Y, Zhu R, Zhao H. Arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., inhibits metastasis of human breast cancer cells through the downregulation of MMP-2/-9 and heparanase in MDA-MB-231 cells. *Oncol Rep.* 2017; 37: 179-84.
- Louise J, Anna L, Gustav S, Christian C, Kristian F N, Gunnar L. Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *J Biotechnol Bioeng.* 2005; 92: 541-52.
- Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, Ellis MJ. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 261-75.
- Mali AV, Wagh UV, Hegde MV, Chandorkar SS, Surve SV, Patole MV. In vitro anti-metastatic activity of enterolactone, a mammalian lignan derived from flax lignan, and down-regulation of matrix metalloproteinases in MCF-7 and MDA MB 231 cell lines. *Indian J Cancer.* 2012; 49: 181-7.
- Manna SK, Bose JS, Gangan V, Raviprakash N, Navaneetha T, Raghavendra PB, et al. Novel derivative of benzofuran induces cell death mostly by G2/M cell cycle arrest through p53-dependent pathway but partially by inhibition of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem.* 2010; 285: 22318-27.
- Maxwell T, Chun SY, Lee KS, Kim S, Nam KS. The anti-metastatic effects of the phytoestrogen arctigenin on human breast cancer cell lines regardless of the status of ER expression. *Int J Oncol.* 2017; 50: 727-35.
- Messiano GB, Vieira L, Machado MB, Lopes LMX, De Bortoli SA, Zukerman-Schpector J. Evaluation of Insecticidal Activity of Diterpenes and Lignans from *Aristolochia*

- malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. J Agric Food Chem. 2008; 56: 2655-59.
- Moss GP. Nomenclature of Lignans and Neolignans (IUPAC Recommendations 2000). Pure Appl Chem. 2000; 72: 1493-523.
- Naohiro T, Don HCh, Keigo M, Tomoya O. Lignans of *Chamaecyparis obtusa*. J. Wood Sci. 2001; 47: 476-82.
- Ogungbe IV, Erwin WR, Setzer WN. Antileishmanial phytochemical phenolics: molecular docking to potential protein targets. J Mol Graph Model. 2014; 48: 105-17.
- Pan LL, Wang XL, Zhang QY, Luo XL, Xu P, Liu SY. Boehmenan, a lignan from the Chinese medicinal plant *Clematis armandii*, induces apoptosis in lung cancer cells through modulation of EGF-dependent pathways. Phytomedicine. 2016; 23: 468-76.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. Photochemistry. 1997; 46: 597-673.
- Pena OA, Villarreal ML, Alvarez BL, Meneses CA, Rodriguez LV. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. Molecules. 2016; 21: 1013-28.
- Pettit GR, Meng Y, Gearing RP, Herald DL, Pettit RK, Doubek DL, et al. Antineoplastic agents. 522. *Hernandia peltata* (Malaysia) and *Hernandia nymphaeifolia* (Republic of Maldives). J Nat Prod. 2004; 67: 214-20.
- Peuhu E, Paul P, Remes M, Holmbom T, Eklund P, Sjöholm R, et al. The antitumor lignan Nortrachelogenin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced cell death by inhibition of the Akt pathway and growth factor signaling. Biochem Pharmacol. 2013; 86: 571-83.
- Rajalekshmi DS, Kabeer FA, Madhusoodhanan AR, Bahulayan AK, Prathapan R, Prakasan N, et al. Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives. Bioorg Med Chem Lett. 2016; 26: 1767-71.
- Rong H, Leena H C, Rbert C. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). Oncol Lett. 2015; 9: 1495-1501.

- Sakpakdeejaroen I, Itharat A. Cytotoxic compounds against Breast Adenocarcinoma cell (MCF-7) form Pikutbenjakul. *J Health Res.* 2009; 23: 71-6.
- Samyikutty A, Shetty AV, Dakshinamoorthy G, Bartik MM, Johnson GL, Webb B, et al. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. *PLoS One.* 2013; 8: e65889.
- Sartorelli P, Carvalho CS, Reimao JQ, Lorenzi H, Tempone AG. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. *Planta Med.* 2010; 76: 1454-56.
- Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature.* 2000; 408: 429-32.
- Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16: 15-31.
- Siao AC, Chien WH, Yung HK, Kee CJ. Effect of Sesamin on Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16: 3779-83.
- Sriwiryajan S, Ninpesh T, Sukpondma Y, Nasomyon T, Graidist P. Cytotoxicity Screening of Plants of Genus Piper in Breast Cancer Cell Lines. *Trop J Pharm Res.* 2014; 6: 921-8
- Sriwiryajan S, Sukpondma Y, Srisawat T, Madla S, Graidist P. (-)-Kusunokinin and Piperloguminine from *Piper Nigrum* : An Alternative Option to Treat Breast Cancer. *Biomed Pharmacother.* 2017; 92: 732-43.
- Sriwiryajan S, Tedasen A, Lailerd N, Boonyaphiphat P, Nitiruangjarat A, Deng Y, et al. Anticancer and cancer prevention effects of Piperine-free *Piper nigrum* extract on N-nitrosomethylurea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016; 9: 74-82
- Tedasen A, Choomwattana S, Graidist P, Tipmanee V. Structure-guided cancer blockade between bioactive bursehernin and proteins: Molecular docking and molecular dynamics study. *J Mol Graph Model.* 2017; 74: 215-24.



- Thi VTL, Phi HN, Hong SC, Jun LY, Keon WK, Sang GA, et al. Diarylbutane-type Lignans from *Myristica fragrans* (Nutmeg) show the Cytotoxicity against Breast Cancer Cells through Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Nat Prod Sci.* 2017; 23: 21-8.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez BT, McLeod H, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21: 440-6.
- Tomoya O, Toshiaki U, Mikio S. Enantiomeric compositions and biosynthesis of *Wikstroemia sikokiana* lignans. *J WOOD SCI.* 2000; 46: 234-42.
- Wilson RC, Marcio LA, Rodrigo SV, Sergio RA, Jairo KB. Lignans: Chemical and Biological Properties. *Am J Agric Biol Sci.* 2012; 10: 215-29.
- Yang YJ, Qi SN, Shi RY, Yao J, Wang LS, Yuan HQ, et al. Induction of apoptotic DNA fragmentation mediated by mitochondrial pathway with caspase-3-dependent BID cleavage in human gastric cancer cells by a new nitroxyl spin-labeled derivative of podophyllotoxin. *Biomed Pharmacother.* 2017; 90: 131-8.
- Yuba RP, Qing HL, Dipendra KA, Yoon GK, Eun RW, et al. 7,7 Dihydroxy bursehernin inhibits the expression of inducible nitric oxidase synthase through NF- $\kappa$ B DNA binding suppression. *Nitric Oxide.* 2007; 16: 274-85.
- Zhang L, Chen F, Wang J, Chen Y, Zhang Z, Lina Y, et al. Novel isatin derivatives of podophyllotoxin: synthesis and cytotoxic evaluation against human leukaemia cancer cells as potent anti-MDR agents. *RSC Adv.* 2015; 5: 97816-23.
- Zhenfeng Z, Amy LS, Titus JB, Susumu K, Balazs H. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget.* 2010; 1: 497-514.
- Zilla MK, Nayak D, Amin H, Nalli Y, Rah B, Chakraborty S, et al. 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside isolated from *Podophyllum hexandrum* exhibits potential anticancer activities by altering Chk-2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2014; 224: 100-7.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก.

### 1. สารละลายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

#### 1.1 การเตรียมอาหารสมบูรณ์สำหรับเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) นำ RPMI 1 ซอง ปริมาณ 10.4 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาณ 2 กรัม และปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเพนิซิลินและสเตรปโตมัยซินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเพนิซิลิน 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอล-กลูตามีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 และฟีตัลโบวีนซีรัมร้อยละ 10 จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 เซนติเมตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลชีพในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการนำไปใช้

#### 1.2 การเตรียมบัฟเฟอร์ 10X PBS

บัฟเฟอร์ 10X PBS ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 80 กรัม, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 2 กรัม, โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิกแอนไฮไดรส์ ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 14.4 กรัม และโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องกวนสารละลายจนละลายหมด จากนั้นปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้ได้ pH สุดท้ายเท่ากับ 7.38 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร และนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วย autoclave ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่อต้องการนำมาใช้ให้เจือจางเป็น 1X PBS โดยใช้ 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร

## 2. สารละลายต่างๆ ที่ใช้ใน Western blot analysis

### 2.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 5X TBS-T

บัฟเฟอร์ 5X-TBS-T ประกอบด้วย ทริส-เบส ปริมาณ 5.8 กรัม, ทริสไฮโดรคลอไรด์ ปริมาตร 31.75 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ ปริมาณ 45 กรัม และทวิน-20 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาใช้ให้เจือจางเป็น 1X-TBS-T โดยใช้ 5X-TBS-T ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร

### 2.2 การเตรียมสารละลาย 5X running (SDS-PAGE buffer)

บัฟเฟอร์ 5X running ประกอบด้วย ทริส-เบส ปริมาณ 15.1 กรัม, ไกลซีน ปริมาณ 94 กรัม และโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาใช้ให้เจือจางเป็น 1X running buffer โดยใช้ 5X running buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร

### 2.3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ transferring (glycine transfer buffer)

บัฟเฟอร์ transferring ประกอบด้วย ทริส-เบส ปริมาณ 5.8 กรัม และไกลซีน ปริมาณ 7.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

### 2.4 การเตรียมสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร

ซังโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต ปริมาณ 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.5 การเตรียมสารละลาย APS ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร

ซังแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ปริมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

## 2.6 การเตรียมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่ pH 6.8

ซัง ทริส-เบส ปริมาณ 12.114 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ได้ pH 6.8 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.7 การเตรียมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ที่ pH 8.8

ซัง ทริส-เบส ปริมาณ 18.171 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ได้ pH 8.8 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วย autoclave ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.8 การเตรียมสารละลาย Ponceau S ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยมวลต่อปริมาตร

ซัง Ponceau S ปริมาณ 0.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดอะซิติกปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.9 การเตรียม 4X loading buffer

4X loading buffer ประกอบด้วยโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต ปริมาณ 4 กรัม, ไดไฮโอรีอิทอล ปริมาณ 3.1 กรัม, โบรโมฟินอลบลู ปริมาณ 0.2 กรัม, เบต้าเมอเคปโตเอทานอล ปริมาตร 3.58 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าโดยใช้เครื่อง

เขย่า เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนละลายหมด แบ่งใส่หลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

#### 2.10 การเตรียมสารละลาย non-fat milk ความเข้มข้นร้อยละ 5 ใน 1X TBS-T

ชั่งนมผงขาดมันเนยปริมาณ 5 กรัม ละลายใน 1X TBS-T ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนละลายหมด ควรเตรียมแล้วใช้ทันที

#### 2.11 การเตรียมสารละลาย non-fat milk ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน 1X TBS-T

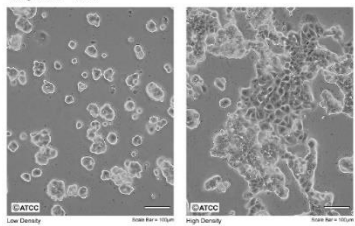
ชั่งนมผงขาดมันเนยปริมาณ 5 กรัม ละลายใน 1X TBS-T ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนละลายหมด ควรเตรียมแล้วใช้ทันที

## ภาคผนวก ข.

## 1. เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ซึ่งแสดงลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ในตารางที่ 15

## ตารางที่ 15 ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ MCF-7

Category	Biological property
ATCC no.	HTB-22™
Organism	<i>Homo sapiens</i> , human
Tissue	mammary gland; breast: pleural effusion
Cell Type	Epithelial
Morphology	Epithelial
Disease	adenocarcinoma
Applications	These cells are suitable as a transfection host.
Receptor Expression	estrogen receptor, expressed
Oncogene	The cells express the WNT7B oncogene.
Complete Growth Medium	The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 0.01 mg/ml human recombinant insulin; fetal bovine serum to a final concentration of 10%.
Cryopreservation	Freeze medium: Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase
Culture Conditions	Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO <sub>2</sub> ), 5% Temperature: 37.0°C
Images	<p>ATCC Number: <b>HTB-22</b> Designation: <b>MCF-7</b></p>  <p>Low Density      High Density</p>

## ภาคผนวก ค.

### 1. การคำนวณค่า $Z_{\alpha/2}$

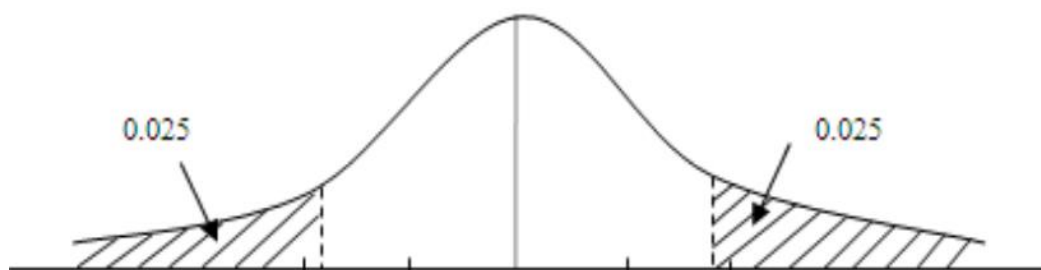
ค่า  $\alpha$  คือ คือระดับความเสี่ยงที่จะสรุปผิด โดยสรุปว่าข้อมูลของสองประชากรนั้น มีความแตกต่างกัน ทั้งที่จริง ๆ แล้วไม่ได้มีความแตกต่างจนถือว่ามีความสำคัญ (false positive) หรือเรียกว่า Type I Error โดยมาตรฐานในงานวิจัยจะกำหนดระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นระดับความเสี่ยงที่จะสรุปผิดในการทดลองจะมีค่าเท่ากับร้อยละ 5

ในการทดลองนี้กำหนดระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นจะได้ค่า  $\alpha = 0.05$  โดยการทดสอบเป็นการทดสอบแบบ 2 ทาง (Two-tailed test) ซึ่งกำหนดสมมุติฐานดังนี้

$H_0$  = ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินิน เท่ากับ ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูกลุ่มควบคุม

$H_1$  = ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูกลุ่มที่ได้รับสารคูชูโนคินิน น้อยกว่า ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูกลุ่มควบคุม

จากค่า  $\alpha = 0.05$  ซึ่งการทดสอบนี้เป็นแบบ 2 ทาง ดังนั้นจึงคิดเป็น  $\alpha/2$  ซึ่งเท่ากับ 0.025



หาค่า  $Z_{\alpha/2}$  จาก  $\alpha/2 = 0.025$  สามารถหาค่าวิกฤตได้โดยนำพื้นที่รวมใต้กราฟทั้งหมดลบด้วยค่า  $\alpha/2$  จะได้  $1 - 0.025 = 0.975$  จากนั้นหาค่า  $Z_{0.975}$  โดยการเปิดตาราง Z (รูปที่ 34) หาค่า 0.975 จากนั้นลากแกนตั้งและแกนนอนเพื่อหาจุดตัด จะได้ 1.9 และ 0.06 นำค่ามาบวกกันจะได้ค่าของ  $Z_{\alpha/2}$  เท่ากับ 1.96 จากนั้นนำค่าไปแทนในสมการ



z	.00	.01	.02	.03	.04	.05	.06	.07	.08	.09
0.0	.5000	.5040	.5080	.5120	.5160	.5199	.5239	.5279	.5319	.5359
0.1	.5398	.5438	.5478	.5517	.5557	.5596	.5636	.5675	.5714	.5753
0.2	.5793	.5832	.5871	.5910	.5948	.5987	.6026	.6064	.6103	.6141
0.3	.6179	.6217	.6255	.6293	.6331	.6368	.6406	.6443	.6480	.6517
0.4	.6554	.6591	.6628	.6664	.6700	.6736	.6772	.6808	.6844	.6879
0.5	.6915	.6950	.6985	.7019	.7054	.7088	.7123	.7157	.7190	.7224
0.6	.7257	.7291	.7324	.7357	.7389	.7422	.7454	.7486	.7517	.7549
0.7	.7580	.7611	.7642	.7673	.7704	.7734	.7764	.7794	.7823	.7852
0.8	.7881	.7910	.7939	.7967	.7995	.8023	.8051	.8078	.8106	.8133
0.9	.8159	.8186	.8212	.8238	.8264	.8289	.8315	.8340	.8365	.8389
1.0	.8413	.8438	.8461	.8485	.8508	.8531	.8554	.8577	.8599	.8621
1.1	.8643	.8665	.8686	.8708	.8729	.8749	.8770	.8790	.8810	.8830
1.2	.8849	.8869	.8888	.8907	.8925	.8944	.8962	.8980	.8997	.9015
1.3	.9032	.9049	.9066	.9082	.9099	.9115	.9131	.9147	.9162	.9177
1.4	.9192	.9207	.9222	.9236	.9251	.9265	.9279	.9292	.9306	.9319
1.5	.9332	.9345	.9357	.9370	.9382	.9394	.9406	.9418	.9429	.9441
1.6	.9452	.9463	.9474	.9484	.9495	.9505	.9515	.9525	.9535	.9545
1.7	.9554	.9564	.9573	.9582	.9591	.9599	.9608	.9616	.9625	.9633
1.8	.9641	.9649	.9656	.9664	.9671	.9678	.9686	.9693	.9699	.9706
1.9	.9713	.9719	.9726	.9732	.9738	.9744	.9750	.9756	.9761	.9767
2.0	.9772	.9778	.9783	.9788	.9793	.9798	.9803	.9808	.9812	.9817
2.1	.9821	.9826	.9830	.9834	.9838	.9842	.9846	.9850	.9854	.9857
2.2	.9861	.9864	.9868	.9871	.9875	.9878	.9881	.9884	.9887	.9890
2.3	.9893	.9896	.9898	.9901	.9904	.9906	.9909	.9911	.9913	.9916
2.4	.9918	.9920	.9922	.9925	.9927	.9929	.9931	.9932	.9934	.9936
2.5	.9938	.9940	.9941	.9943	.9945	.9946	.9948	.9949	.9951	.9952
2.6	.9953	.9955	.9956	.9957	.9959	.9960	.9961	.9962	.9963	.9964
2.7	.9965	.9966	.9967	.9968	.9969	.9970	.9971	.9972	.9973	.9974
2.8	.9974	.9975	.9976	.9977	.9977	.9978	.9979	.9979	.9980	.9981
2.9	.9981	.9982	.9982	.9983	.9984	.9984	.9985	.9985	.9986	.9986
3.0	.9987	.9987	.9987	.9988	.9988	.9989	.9989	.9989	.9990	.9990
3.1	.9990	.9991	.9991	.9991	.9992	.9992	.9992	.9992	.9993	.9993
3.2	.9993	.9993	.9994	.9994	.9994	.9994	.9994	.9995	.9995	.9995
3.3	.9995	.9995	.9995	.9996	.9996	.9996	.9996	.9996	.9996	.9997
3.4	.9997	.9997	.9997	.9997	.9997	.9997	.9997	.9997	.9997	.9998

รูปที่ 34 การอ่านค่า  $Z_{\alpha/2}$  จากตารางทางสถิติ Z

## 2. การคำนวณค่า $Z_\beta$

ค่า  $\beta$  คือ ระดับความเสี่ยงที่จะสรุปข้อมูลของสองประชกรนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งที่จริง ๆ แล้วข้อมูลทั้งสองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (false negative) หรือเรียกว่า Type II Error โดยค่าที่ใช้โยทั่วไปจะอยู่ที่ร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 20

จากการทดลองคาดว่าสาร NMU สามารถเหนี่ยวนำให้หนูขาวใหญ่เกิดก้อนมะเร็งเต้านมได้ร้อยละ 100 แต่ความจริงปรากฏว่าอีกร้อยละ 20 ไม่พบก้อนมะเร็ง ดังนั้นจากการทดลองสามารถหาค่า  $\beta$  ได้จาก

$$\begin{aligned}\text{Power of the test} &= 1 - \beta \\ &= 1 - 0.2 \\ &= 0.8\end{aligned}$$

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้พบว่าสาร NMU สามารถเหนี่ยวนำให้หนูขาวใหญ่เกิดก้อนมะเร็งเต้านมได้ร้อยละ 80

หาค่า  $Z_\beta$  หรือ  $Z_{0.2}$  โดยการเปิดตาราง Z (รูปที่ 35) โดยดูจากแกนนอนซึ่ง คือ ค่าความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นได้ ซึ่งในที่นี้เท่ากับ 0.2 และอ่านค่าแกนตั้งที่  $\infty$  ซึ่งคือค่าความผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้ จะได้ค่า  $Z_\beta$  เท่ากับ 0.842 จากนั้นนำค่าไปแทนในสมการ

$\nu$	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	15.90	31.82	63.66	127.3
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	4.849	6.965	9.925	14.09
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030
35	0.682	0.852	1.052	1.306	1.690	2.030	2.133	2.438	2.724	2.996
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971
45	0.680	0.850	1.049	1.301	1.679	2.014	2.115	2.412	2.690	2.952
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.109	2.403	2.678	2.937
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871
200	0.676	0.843	1.039	1.286	1.653	1.972	2.067	2.345	2.601	2.839
500	0.675	0.842	1.038	1.283	1.648	1.965	2.059	2.334	2.586	2.820
1000	0.675	0.842	1.037	1.282	1.646	1.962	2.056	2.330	2.581	2.813
$\infty$	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807

รูปที่ 35 การอ่านค่า  $Z_{\beta}$  จากตารางทางสถิติ Z

### 3. การคำนวณค่า $\sigma$

$\sigma$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่าง กำหนดแทนค่า SD ในสูตรคำนวณ ตัวอย่างสัตว์ทดลอง ดังนี้

กำหนด SD = 0.5

$$n = 2 \left[ \frac{(1.96 + 0.842)0.5}{0.5} \right]^2$$

$n = 15.7 = 16$  จะได้จำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่ม  $16/7 = 3$  ตัวต่อกลุ่ม

กำหนด SD = 1

$$n = 2 \left[ \frac{(1.96 + 0.842)1}{0.5} \right]^2$$

$n = 62.72 = 63$  จะได้จำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่ม  $63/7 = 9$  ตัวต่อกลุ่ม

กำหนด SD = 2

$$n = 2 \left[ \frac{(1.96 + 0.842)2}{0.5} \right]^2$$

$n = 251.23 = 250$  จะได้จำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่ม  $250/7 = 35.7 = 36$  ตัวต่อกลุ่ม

จากการแทนค่า SD จะเห็นได้ว่าการกำหนดค่า SD เท่ากับ 1 จะสามารถคำนวณ จำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่มได้เพียงพอ และอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ในขณะที่การกำหนดค่า SD เท่ากับ 0.5 หรือ 2 จะทำให้คำนวณตัวอย่างสัตว์ทดลองต่อกลุ่มไม่เพียงพอต่อการทดลอง หรือได้ จำนวนสัตว์ทดลองที่มากเกินไป แต่ทั้งนี้การกำหนดค่า SD ขึ้นอยู่กับการออกแบบการทดลอง และความแปรปรวนของผลการทดลองที่ได้ในสัตว์ทดลองแต่ละตัว

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวศิริินภา ดอกดวง		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5910220064		
วุฒิการศึกษา			
	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2559

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีการศึกษา 2561 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## การนำเสนองานวิจัยแบบโปสเตอร์

1. Dokduang S, Tedasen A, Madla S, Sriwiryajan S, Graidist P. Anticancer activity of kusunokinin extract from *Piper nigrum* in NMU-induced mammary tumor rats. The 13<sup>th</sup> RSU National Graduate Research Conference, 16 August 2018; Bangkok, Thailand

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. Tedasen A, Dokduang S, Sukpondma Y, Tipmanee V, Lailerd N, Graidist P. Kusunokinin: a potential molecule from *Piper nigrum* on breast cancer treatment. (งานวิจัยนี้จะตีพิมพ์ในวารสาร British Journal of Cancer). Impact Factor (2018): 6.176