



ผลของลูทีโอลินต่อการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งปอด
**Effects of Luteolin on Migration and Invasion of Non-Small
Lung Cancer Cell**

วุฒิพงษ์ มาสรัक्षा
Wuttipong Masraksa

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**

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ผลของลูทีโอลินต่อการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งปอด
**Effects of Luteolin on Migration and Invasion of Non-Small
Lung Cancer Cell**

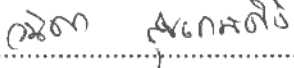
วุฒิพงษ์ มาสรัक्षा
Wuttipong Masraksa

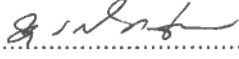
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Pharmacology
Prince of Songkla University
2562**
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของลูทีโอลินต่อการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งปอด
 ผู้เขียน นายวุฒิพงษ์ มาสรักษา
 สาขาวิชา เกษัตริศาสตร์

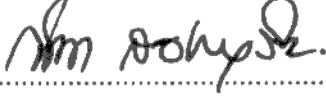
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


คณะกรรมการสอบ

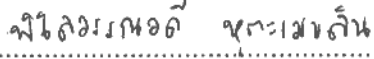

 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา สุขเกษศิริ)

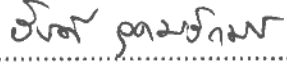

 ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. นพ. สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา)

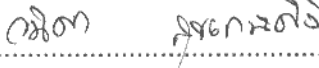
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม



 กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภก. กิจจา สว่างเจริญ)


 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภิดา ณะเสวตร)


 กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิไลวรรณวดี หุตะเมฆลิน)


 กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุดมอักษร)


 กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา สุขเกษศิริ)


 กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภิดา ณะเสวตร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
 หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เกษัตริศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา สุขเกษศิริ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ
(นายวุฒิพงษ์ มาสรักษา)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ วุฒิพงษ์⁶ มาสรักษา

(นาย วุฒิพงษ์ มาสรักษา)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของลูทีโอลินต่อการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งปอด

ผู้เขียน นายวุฒิพงษ์ มาสรักษา

สาขาวิชา เกษัตริวิทยา

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์ขนาดเล็กเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตายจากโรคมะเร็งทั้งหมด การรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการรักษาแต่ยังประสบปัญหาการกลับเป็นซ้ำและอัตราการตายที่สูงในผู้ป่วย ลูทีโอลินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ ที่มีการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการตรวจสอบกลไกการต้านมะเร็งปอดที่แน่ชัด การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของลูทีโอลินในการยับยั้งการเคลื่อนที่และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดที่ไม่ใช้เซลล์ขนาดเล็ก โดยทดสอบความเป็นพิษของลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 50 และ 50 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด เอ 549 และเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ เอ็ม อาร์ ซี 5 ด้วยวิธี เอ็ม ที ที การตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส ทดสอบการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์ โดยวิธี scratch wound healing, transwell invasion และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์น บลิตทิง ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 5-20 ไมโครโมลาร์ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด เอ 549 โดยมีค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ร้อยละ 50 คือ 78.86 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40-80 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด เอ 549 ตายแบบอะพอพโตซิสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ลูทีโอลินที่ทุกความเข้มข้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เอ็ม อาร์ ซี 5 ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20-40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งยับยั้งการสร้าง filopodia และ lamellipodia ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด เอ 549 การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42, RhoA, FAK และ Src ซึ่งเป็นตัวส่งสัญญาณให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ด้วยวิธีเวสเทิร์น บลิตทิง ผลการศึกษาพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20-40 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA นอกจากนี้สามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน FAK และ Src ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลของการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าลูทีโอลินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดโดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าลูทีโอลินมีประสิทธิภาพที่อาจพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษา มะเร็งต่อไปได้

Thesis title	Effects of Luteolin on Migration and Invasion of Non-Small Lung Cancer Cell
Author	Mr. Wuttipong Masraksa
Major	Pharmacology
Academic year	2018

ABSTRACT

Non-small cell lung cancer is the leading cause of cancer death. Chemotherapy is often considered to target cancer, but still experiencing recurrence and high mortality rate in the patients. Luteolin is a flavonoid which has been investigated for the anti-cancer properties; however, its anticancer mechanisms remain unclear. The objective of this study is to examine the effect and the molecular mechanism of luteolin on the inhibition of cell migration progression in non-small cell lung cancer. Cytotoxicity of luteolin (5, 10, 20, 40, 50 and 80 μM) on lung cancer A549 cells and normal lung fibroblast MRC-5 cells was assessed by MTT assay. The apoptosis cell death was also observed. In addition, the anti-migratory and anti-invasive potential of luteolin on lung cancer cell lines was determined by scratch wound healing and invasion assays. The protein expression was also examined by western blotting. The result showed that luteolin at the concentration of 5-20 μM was not toxic to the lung cancer cells A549 and its IC_{50} at 24 h was 78.86 μM . Exposure of A549 cells to luteolin at the concentration of 40-80 μM resulted in apoptotic cell death. Besides, the treatment of MRC-5 cells with luteolin at all concentrations showed no toxicity. Luteolin 20-40 μM was found to inhibit migration and invasion as well as the formation of filopodia and lamellipodia in A549 cells. The protein expression of the signaling molecules including Rac1, Cdc42, RhoA, FAK and Src was determined by using western blotting and found that luteolin (20-40 μM) significantly decreased the phosphorylation of FAK and its downstream targets, Src and decreased protein expression of cell motility-related Rac1, Cdc42 and RhoA when compared to the control. The findings from this study indicate that luteolin suppresses migration and invasion of lung cancer cells by altered cell motility-related protein expression, suggesting the potential role of luteolin for the development of cancer therapy.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงสมบูรณ์ด้วยดีได้ด้วยความช่วยเหลือ แนะนำ เอาใจใส่ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งเสมอมาจาก ผศ. ดร. วนิตา สุขเกษศิริ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ. ดร. ศุภิตา ธนะเสวตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ถูกต้องมากยิ่งขึ้น กระผมขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. พิไลวรรณวดี หุตะเมขลิน และ คุณฟูรอยดา มุลทรัพย์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ถ่ายทอดความรู้ และเทคนิคต่าง ๆ รวมทั้งข้อคิดที่เป็นประโยชน์ตลอดการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ทางด้านเภสัชวิทยา และให้คำแนะนำในการศึกษาตลอดหลักสูตรนี้

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนทุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2562 และทุนประเภททั่วไป เงินรายได้ มหาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2561

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา, ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

วุฒิพงษ์ มาสรักษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	5
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการรักษา	25
บทที่ 4 ผลการศึกษา	35
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	45
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	66
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	71
ประวัติผู้เขียน	75

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	การแบ่งระยะของมะเร็งปอด (stages of lung cancer) ตาม TNM staging system for lung cancer 7 th edition	11
2	แสดงอาการที่นำผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมาพบแพทย์ (%)	13
3	แสดงอัตราการรอดชีวิตใน 5 ปี ของผู้ป่วย NSCLC แบ่งตามระบบ TNM	22
ข1	ผลของลูทีโอลินต่อความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด human adenocarcinoma epithelial A549 cell line และเซลล์ปกติ human MRC5 lung fibroblast cell line	72
ข2	ผลของลูทีโอลินต่อรูปแบบการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 แบบ apoptosis	72
ข3	ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ด้วยวิธี scratch wound healing	73
ข4	ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ ด้วยวิธี transwell invasion assay	73
ข5	ผลของลูทีโอลินต่อการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42, RhoA, pFAK, FAK, pSrc และ Src	74

รายการรูปภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1 กลไกที่คาดว่าลูทีโอลินจะยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด	4
2 ยาที่ใช้รักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC	17
3 โครงสร้างทางเคมีของลูทีโอลิน	21
4 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอด A549	25
5 สันฐานวิทยาของเซลล์ปกติ MRC-5	26
6 ปฏิกริยาการเกิดผลึก formazan เมื่อด้วยวิธี MTT	30
7 การตายแบบ apoptosis ที่ย้อมด้วย Hoechst 33342	31
8 การยับยั้งการเคลื่อนที่โดยวิธี Scratch wound healing	32
9 ผลของลูทีโอลินต่อการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง A549 และ MRC-5	37
10 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด	38
11 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์	39
12 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการสร้าง filopodia	41
13 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแสดงออกของของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA	42
14 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน FAK และ Src	44
15 สรุปกลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลินในการยับยั้งการเคลื่อนที่และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด	50

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

μ M, uM	= micromole
%	= percentage
6-OHDA	= 6-hydroxydopamine
ADH	= antidiuretic hormone
AJCC	= American joint committee on cancer
Akt	= protein kinase B
ALK	= anaplastic lymphoma kinase
Apaf-1	= apoptotic protease activating factor 1
ARE	= antioxidant response element
Arp2/3	= actin-related proteins ARP2 and ARP3
ATCH	= adrenocorticotrophic hormone
Bax	= Bcl2 associated x
Bcl-2	= B-cell lymphoma 2
BSA	= bovine serum albumin
Cdc42	= cell division control protein 42
CDKN2A	= cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CM	= centimeter
CT-scan	= computed tomography scan
Cyt-c	= cytochrome complex
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DOCK3	= dedicator of cytokinesis 3
ECM	= extracellular matrix
EML4	= echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMT	= epithelial mesenchymal transition
ERK, ERKs	= extracellular signal–regulated kinases
F-actin	= filamentous actin
FAK	= focal adhesion kinase
FBS	= fetal bovine serum
FDA	= food and drug administration

FKBP-12	= FK-binding protein-12
Fyn	= proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn
GCL	= glutamate cysteine ligase
GDP	= guanosine diphosphate
GLUT-4	= glucose transporter type 4
GTP	= guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	= hydrogen peroxide
HER2	= human epidermal growth factor receptor type 2
HO-1	= heme oxygenase-1
IC ₅₀	= the half maximal inhibitory concentration
ICAM-1	= intercellular adhesion molecule 1
IGF-1	= Insulin-like growth factor 1
IL-6	= Interleukin 6
IRF	= interferon regulatory factor
IκBα	= nuclear factor of kappa in B-cells inhibitor alpha
JNK	= c-Jun N-terminal kinase
KRAS	= Kirsten rat sarcoma
LPS	= lipopolysaccharide
MMP	= matrix metalloproteinase
MPP ⁺	= 1-methyl-4-phenylpyridinium
mTOR	= mammalian target of rapamycin
NAD ⁺	= nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	= nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen
NEDD9	= neural precursor cell expressed developmentally-9
NF-κB	= nuclear factor κB
NOS-2	= nitric oxide synthase-2
Nrf2	= nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NSCLC	= non-small cell lung cancer
p130Cas	= crk-associated substrate
p53	= tumor protein 53
PAKS	= p21-activated protein kinases pathway

PBS	= phosphate buffer saline
PDGFR	= platelet-derived growth factor receptor
PET-CT Scan	= positron emission tomography-computed
pFAK	= phosphorylate focal adhesion kinase
PI3K	= phosphoinositide 3-kinase
pSrc	= phosphorylate steroid receptor coactivator
Rac1	= ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rb protein	= retinoblastoma protein
RET	= proto-oncogene encodes a receptor tyrosine
RhoA	= ras homolog gene family member A
S.E.M	= standard error of the mean
SCLC	= small cell lung cancer
Shc	= src homology 2 domain-containing
SIADH	= syndrome of inappropriate secretion
Src	= steroid receptor coactivator
STAT3	= signal transducer and activator of transcription 3
TGF- β	= tumor necrosis factor-beta
TKIs	= tyrosine kinase inhibitors
TNF- α	= tumor necrosis factor-alpha
VEGF	= vascular endothelial growth factor

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

จากข้อมูลของประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 2008-2012 พบรายงานอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งปอดในเพศชายเท่ากับ 330 คนต่อประชากร 100,000 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 14 ของการเกิดมะเร็งทั้งหมด ซึ่งสูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งต่อมลูกหมาก การเกิดมะเร็งปอดในเพศหญิงอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งปอดเท่ากับ 217 คนต่อประชากร 100,000 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 14 สูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งเต้านม สำหรับอุบัติการณ์การเสียชีวิตจากโรคมะเร็งปอดในเพศชายเท่ากับ 250 คน และเพศหญิงเท่ากับ 142 คนต่อประชากร 100,000 คน คิดเป็นร้อยละ 27 และ 26 ตามลำดับ ซึ่งเป็นอัตราการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั้งหมด (Siegel R.L. *et al.*, 2016) ในประเทศไทย ข้อมูลจากทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาลทั่วประเทศปี 2014 พบผู้ป่วยมะเร็งปอดเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งลำไส้ใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 17 ของมะเร็งที่พบในเพศชาย และเป็นอันดับสี่รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 6.5 ในเพศหญิง (Jiemin M. *et al.*, 2014) ยาเคมีบำบัดมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคมะเร็งปอดทั้งการรักษาเพื่อหายขาดและการรักษาเพื่อบรรเทาอาการ (palliative care) โดยขึ้นอยู่กับระยะของมะเร็งแต่ละชนิด ยาเคมีบำบัดเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไปทำลายเซลล์มะเร็ง และยังมีผลทำลายเซลล์ปกติด้วย ซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด เช่น คลื่นไส้ อาเจียน พิษต่อไต พิษต่อหู ระบบประสาทและกดไขกระดูก เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันการพัฒนายาชนิดใหม่จึงต้องสัมพันธ์กับโมเลกุลเป้าหมาย และมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด ดังนั้นการวิจัยและการพัฒนายาต้านมะเร็งที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงกลายเป็นเป้าหมายที่สำคัญของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก ด้วยความคาดหวังว่าจะสามารถลดผลที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ปกติ และมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง รวมทั้งมีอาการข้างเคียงต่ำ

ลูทีโอลิน (luteolin; 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น แครอท พริกหวาน ขึ้นฉ่าย น้ำมันมะกอก ใบสะระแหน่ โรสแมรี่ และคาร์โมไมล์ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งมีสรรพคุณต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย และต้านการอักเสบ (Chian S. *et al.*, 2014) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ลูทีโอลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29, มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มะเร็งตับ HepG2 มะเร็งปอด A549 เป็นต้น (Chang J. *et al.*, 2005; Lee H.J. *et al.*, 2005; Lim D.Y. *et al.*, 2007 and Tang X. *et al.*, 2011) ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่มะเร็งปอด โดยการศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลินต่อเซลล์มะเร็งปอด ในปัจจุบันมีการศึกษาทั้งในแง่ที่ลูทีโอลินเพิ่มการตายของ

เซลล์มะเร็งแบบ apoptosis และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด การศึกษาของ Leung H.W. และคณะ ได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งปอด CH27 โดยเซลล์ที่ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 30, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์ พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้นทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis โดยทำให้เซลล์เกิด DNA damage เพิ่มการแสดงออกของ caspase-3 และหยุดวัฏจักรเซลล์ให้อยู่ในระยะ S (Leung H.W. *et al.*, 2005; Leung H.W. *et al.*, 2006) การศึกษาของ Ju W. และคณะ (2007) ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งปอด H23, H2009, H460 และ A549 พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการกระตุ้นจาก tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) โดยยับยั้ง nuclear factor kB (NF-kB) และกระตุ้น c-Jun N-terminal kinase (JNK) ทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis (Ju W. *et al.*, 2007 and Bai L. *et al.*, 2009) การศึกษาของ Tang X. และคณะ (2011) ทำการศึกษากฎวิธีในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งปอดที่ได้รับลูทีโอลิน พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) ร้อยละ 34 เมื่อได้รับเป็นเวลา 30 นาทีและยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Nrf2 ลดการจับของ Nrf2 กับ antioxidant response element (ARE) และลดระดับ glutathione นอกจากนี้ลูทีโอลินยังมีผลเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัด oxaliplatin, bleomycin และ doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งปอด (Tang X. *et al.*, 2011 and Chian S. *et al.*, 2014) นอกจากนี้ลูทีโอลินทำให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดการตายแบบ apoptosis แล้ว ยังมีการศึกษาพบว่าลูทีโอลินมีผลยับยั้งการแพร่กระจายและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดด้วย การศึกษาของ Anso' E. และคณะ (2010) ทำการศึกษาคผลของลูทีโอลินในเซลล์มะเร็งปอด NCI-H157 พบว่าลูทีโอลินยับยั้งการแสดงออกของ vascular endothelial growth factor (VEGF) โดยผ่านการยับยั้งการ phosphorylation ของ signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) และเพิ่มการแสดงออกของ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) ส่งผลยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ไปยังเซลล์ที่เกิดภาวะ hypoxia (Anso' E. *et al.*, 2010) การศึกษาของ Zhao Y.X. และคณะได้ทำการศึกษาคผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis และหยุดวัฏจักรเซลล์ให้อยู่ในระยะ G1 อีกทั้งมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดโดยมีผลลด actin assembly และ stress fiber formation (Zhao Y.X. *et al.*, 2011) การศึกษาของ Chen K.C. และคณะ (2013) ทำการศึกษาคผลของลูทีโอลินในการต้านฤทธิ์ของ tumor growth factor beta (TGF- β) ที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าลูทีโอลินยับยั้งการกระตุ้น phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt/IkBa/NF-kB/Snail pathway ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของ E-cadherin ทำให้ยับยั้ง

การเกิด epithelial mesenchymal transition (EMT) ส่งผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 (Chen K.C. *et al.*, 2013) การศึกษาของ Meng G. และคณะ (2016) ทำการศึกษาผลของลูทีโอลินต่อการเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งและการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยเพิ่ม caspases-3 และ 9 ลดการแสดงออกของ B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) และเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 associated x (Bax) โดยไปกระตุ้น mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) และ Akt นอกจากนี้ในการศึกษาดังกล่าวยังพบว่าลูทีโอลินมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดด้วย โดยผ่านการกระตุ้น MEK/ERK pathway (Meng G. *et al.*, 2016)

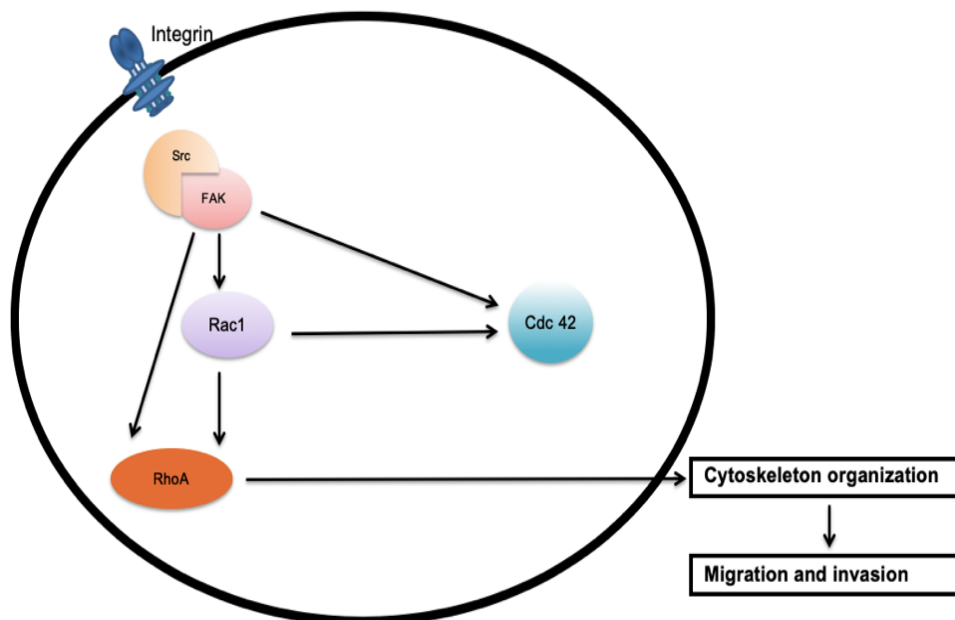
ปัจจุบันได้มีการศึกษาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งเป็นจำนวนมากโดยมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโปรตีนโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton) สูญเสียสภาพยึดเกาะระหว่างเซลล์ และการยึดเกาะของเซลล์ต่อ extracellular matrix (ECM) ซึ่งกลไกเหล่านี้เกิดจากการนำส่งสัญญาณของโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ focal adhesion kinase (FAK) เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการเกาะพื้นผิวของเซลล์กับ ECM โดย FAK เป็นโปรตีน ที่มีผลกระตุ้นโปรตีนต่าง ๆ ในเซลล์ เช่น Src family kinases, actin-related proteins ARP2 and ARP3 (Arp2/3), talin, paxillin, Ras homolog gene family member A (RhoA), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) และ cell division control protein 42 (Cdc42) เป็นต้น ซึ่งการกระตุ้นโปรตีนเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนโครงร่างของเซลล์ สร้างโปรตีนยึดเกาะของเซลล์ และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามและแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่น ๆ ได้ ปัจจุบันพบว่าในโรคมะเร็งหลายชนิดมีการแสดงออกหรือมีการทำงานของโปรตีน FAK ที่มากผิดปกติ จากผลการวิจัยสนับสนุนว่าโปรตีน FAK เป็นโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวกับมะเร็งและการแพร่กระจายของมะเร็ง ซึ่งแนวทางปัจจุบันในการพัฒนายารักษามะเร็งจะมุ่งเน้นที่เป้าหมายใหม่ของเซลล์มะเร็ง การศึกษาโมเลกุลที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน FAK ทั้งในระดับ upstream และ downstream จะส่งผลยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดได้ ทำให้การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยผ่าน FAK/Src/RhoA/Rac1/Cdc42

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก (non-small cell lung cancer; NSCLC)

3. กรอบแนวคิดการวิจัย (conceptual framework)

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก (non-small cell lung cancer; NSCLC) ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ focal adhesion kinase (FAK), steroid receptor coactivator (Src), ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1), cell division control protein 42 homolog (Cdc42) และ ras homolog gene family, member A (Rho A) ซึ่งส่งผลให้การแพร่กระจาย การเจริญเติบโต และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลดลง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กลไกที่คาดว่าลูทีโอลินจะยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. มะเร็งปอด (lung cancer)

1.1 สาเหตุของมะเร็งปอด (causes of lung cancer)

สาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปอด คือ การสูบบุหรี่ ซึ่งพบมากกว่าร้อยละ 80-90 ของสาเหตุการเกิดมะเร็งปอดทั้งหมด และการได้รับควันบุหรี่มือสอง (passive smoker) ยังเป็นความเสี่ยงให้เกิดมะเร็งปอดด้วย (Alberg A.J. and Samet J.M., 2003) เนื่องจากภายในบุหรี่ประกอบไปด้วยสารเคมีประมาณ 7,000 ชนิด มีสารก่อมะเร็งมากกว่า 60 ชนิด เช่น นิโคติน, ทาร์, คาร์บอนมอนอกไซด์, โทลูอิน, เมทิลามีน, เมทานอล, ยาฆ่าแมลง, สารหนู, อะซิโตน และโพลีเนียม-210 เป็นต้น ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดมะเร็งปอด รวมไปถึงมะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น มะเร็งในช่องปากและมะเร็งหลอดอาหารได้ในภายหลัง นอกจากนี้ยาสูบประเภทอื่น เช่น ยานัดชิการ์ ยาเส้น กัญชาผสมบุหรี่ ก็ยังสามารถเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งปอดได้มากขึ้นด้วยเช่นกัน สารก่อมะเร็งเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำลายเนื้อเยื่อภายในปอดได้ทันที ซึ่งปกติร่างกายจะพยายามซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้น แต่หากมีการสูดดมเข้าไปมากขึ้นและต่อเนื่องเป็นเวลานาน จะส่งผลให้เกิดความเสียหายกับเซลล์มากขึ้นจนร่างกายซ่อมแซมไม่ทันกระทั่งเกิดความเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ผิดปกติที่สามารถกลายเป็นเซลล์มะเร็งบริเวณปอด รวมไปถึงสาเหตุต่าง ๆ ที่เป็นปัจจัยสำคัญดังนี้ แร่ใยหิน (asbestos), เรดอน (radon), มลพิษทางอากาศ (air pollution), การได้รับรังสี (radiation exposure), สารเคมีในอุตสาหกรรม (industrial substances) และการติดเชื้อวัณโรค (tuberculosis) เป็นต้น (Doll R. and Peto R., 1981)

1.2 พยาธิสภาพของมะเร็งปอด (pathogenesis of lung cancer)

พยาธิสภาพการเกิดมะเร็งปอดมีลักษณะคล้ายกับโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ โดยเมื่อได้รับสารก่อมะเร็งเป็นเวลานาน ๆ ส่งผลกระตุ้นให้เซลล์ปกติพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ 1) initiation แล้วจะเข้าสู่ระยะ 2) promotion ตามด้วยระยะ 3) progression ทำให้เกิดเป็น neoplastic cells ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่ในระยะที่ 1 เกิดจากการได้รับพวก genotoxic carcinogens ระยะที่ 2 และ 3 เกิดจากการได้รับสารพิษพวก epigenetic carcinogens ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม เช่น DNA methylation, histone tail modification หรือเกิดผลโดยตรงต่อการควบคุมการแสดงออกของ microRNA มีผลให้ tumor suppressor genes หยุดทำงาน (Jakopovic M. et al., 2013) ส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นเซลล์เนื้อร้าย

(malignant cells) แล้วมีการแบ่งตัวซ้ำ ๆ เรื่อย ๆ จนพัฒนาไปเป็นมะเร็ง (Tobias J. and Hochhauser D., 2014) มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่าในคนที่สูบบุหรี่หรือได้รับควันบุหรี่รอบข้างพบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งปอด เช่น tumor protein 53 (p53) นอกจากนี้ยังพบ chromothripsis ของโครโมโซม 3p โดยพบว่าในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่มี common chromothripsis region อยู่ในส่วนที่มีผลให้ tumor suppressor genes บน 3p ขาดหายไป ส่งผลทำให้เซลล์เยื่อหุ้มผิวของเยื่อหุ้มปอดมีการเพิ่มจำนวนและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์มากขึ้น ทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ progression ผ่านการกระตุ้น ๆ แบบซ้ำ ๆ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 20-25 ปีในการเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลดลงได้หลังจากเลิกสูบบุหรี่ แต่เซลล์ที่ได้รับความเสียหายในระยะนี้อาจได้รับ carcinogen carries มากระตุ้นให้เกิดมะเร็งได้อีก

Small cell lung cancer (SCLC) และ non-small cell lung cancer (NSCLC) มีลักษณะในการเกิดมะเร็งที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีนที่ต่างกัน SCLC มักมีการกลายพันธุ์ใน Myc protein family, Bcl-2, tyrosine-protein kinase Kit, p53 และ retinoblastoma protein (Rb protein) ในขณะที่ NSCLC มักมีการกลายพันธุ์ใน epidermal growth factor receptor (EGFR), kirsten rat sarcoma (KRAS), CD44 และ cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) จึงทำให้มีการดูแลรักษาที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของมะเร็งปอด (York E.M., 2005) นอกจากนี้พบว่าร้อยละ 10-30 เกิดจากการกลายพันธุ์ของ KRAS proto-oncogene ทำให้เกิด adenocarcinomas (Aviel-Ronen S. *et al.*, 2006 and Herbst R.S. *et al.*, 2008) และยังมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดการกลายพันธุ์ของ echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) และ anaplastic lymphoma kinase (ALK) ซึ่ง EML4-ALK tyrosine kinase fusion gene ใน NSCLC พบประมาณร้อยละ 4 (Martelli M. *et al.*, 2009) การกลายพันธุ์และการเพิ่มจำนวนของ EGFR พบได้ทั่วไปในมะเร็งปอดชนิด NSCLC ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาที่ไปยับยั้งการทำงานของตัวรับ (receptor) หลายตัว

จากการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell lines) และกลไกการเกิดมะเร็งในช่องอกโดยศึกษาในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ยังไม่ทราบกลไกที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าการแสดงออกของ keratin 5 มากขึ้น มีแนวโน้มที่จะนำไปสู่การเป็นมะเร็งปอดแบบ NSCLC มากขึ้น ส่วน squamous-cell lung carcinoma จะพบได้บริเวณส่วนกลางของทางเดินหายใจ มีความเกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของ neuroepithelial cells มีจำนวนมากขึ้น เกิดการเกาะกลุ่มมากขึ้น

มะเร็งปอดสามารถแพร่กระจายได้โดยตรงจากตำแหน่งที่เกิดในหลอดลม ผนังทรวงอก หลอดเลือดใหญ่ เยื่อหุ้มหัวใจ กะบังลม และที่อื่น ๆ เช่น superior vena cava, phrenic nerves,

หลอดเลือดอาหาร เป็นต้น เนื้ออกในปอดมักแพร่กระจายไปทั่วทั้งปอด (intraparenchymal) และต่อมน้ำเหลือง มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กมีแนวโน้มที่จะเกิดมากกว่ามะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก โดยปกติจะพบที่ hilar lymph nodes ก่อน และจากนั้นเข้าไปใน mediastinal lymph nodes โดยพบร้อยละ 25 ของผู้ป่วยจะเริ่มจากมะเร็งทางกลีบปอดซ้ายแล้วแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ต่อไป นอกจากนี้มะเร็งปอดสามารถแพร่กระจายไปยังตับ ต่อมหมวกไต กระดูก ทางเดินหายใจและสมองได้ การแพร่กระจายไปที่กระดูกมักจะพบแบบ osteolytic (Frank V. *et al.*, 2003)

1.2.1 Focal adhesion kinase (FAK)

เป็นโปรตีนขนาด 125 กิโลดัลตันที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น endothelial, neutrophil, platelet, macrophage และ fibroblast นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การเกาะติดเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ และการสร้างหลอดเลือดใหม่ ในทางตรงกันข้ามหากเพิ่มการทำงานของ FAK นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็งจากการเพิ่มกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้ยังยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในเซลล์มะเร็งและมะเร็งที่มีการแพร่กระจาย (cancer progression) เนื่องจาก FAK สามารถกระตุ้นให้เกิดการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์จากการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนหลาย pathway (Sulzmaier F.J. *et al.*, 2014) การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน FAK ซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีนกลุ่ม Src-family protein tyrosine kinase เมื่อมีการจับกับโปรตีนกลุ่มนี้ ส่งผลเพิ่มการทำงานของ Src kinase และ FAK kinase เกิดการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งไทโรซีนที่ 576 และ 577 (Ruest P.J. *et al.*, 2000) นอกจากนี้โปรตีน Src ที่อยู่ใ้ในโครงสร้างเชิงซ้อนร่วมกับโปรตีน FAK ช่วยให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตในโปรตีนที่เป็น adaptor proteins เช่น Shc, paxillin และ p130Cas โครงสร้างเชิงซ้อนของ FAK-Src complex สามารถนำไปสู่การกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์อย่างต่อเนื่อง (intracellular signaling cascades) มีการศึกษาพบว่า FAK มีการแสดงออกสูงขึ้นในมะเร็งปอดและมีความสำคัญในมะเร็งปอดโดยมีการทำงานร่วมกับ steroid receptor coactivator (Src) ส่งเสริมให้เพิ่มกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง จึงมีผลให้มะเร็งปอดแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ได้ดีขึ้น (Carretero J. *et al.*, 2010) ซึ่งมีการพัฒนายา เช่น dasatinib ออกฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้น Src และ FAK (Schaller M.D. *et al.*, 1992) การเพิ่มการแสดงออกของ FAK จะพบมากในมะเร็งปอดชนิด NSCLC ซึ่งอาจนำไปใช้ในการตรวจหาและแบ่งระยะของมะเร็ง

ปอดชนิด NSCLC ระยะที่ I ออกจากผู้ป่วยระยะอื่น ๆ ได้เพื่อลดความเสี่ยงจากการเสียชีวิตในมะเร็งปอดโดยใช้การประเมินทาง immunohistochemistry (Dy G.K. *et al.*, 2014)

1.2.2 Steroid receptor coactivator (Src)

เป็นโปรตีนมีขนาด 52-62 กิโลดัลตัน ซึ่ง c-Src เป็น nonreceptor tyrosine kinase เจอครั้งแรกในปี ค.ศ. 1909 ประกอบด้วย 8 members เช่น Src, Fyn, Yes, Lyn, Lck, Hck, Blk และ Fgr (Hong H. *et al.*, 1996 and Torchia J. *et al.*, 1997) พบการแสดงออกของ c-Src สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งสมอง มะเร็งกระดุก มะเร็งมดลูก (Wieser F. *et al.*, 2002) พบว่าการเพิ่มการแสดงออกของ Src สัมพันธ์กับการเพิ่มการแบ่งตัว การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การสร้างหลอดเลือดใหม่ รวมทั้งการต่อต้านยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง (Kushner P.J. *et al.*, 2000)

1.2.3 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)

เป็นโปรตีนมีขนาด 21 กิโลดัลตัน ซึ่งประกอบด้วย Ras superfamily จับอยู่กับ small GTP-binding proteins เกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการภายในเซลล์เช่น ควบคุมการเจริญเติบโต ควบคุมการทำงานของ cytoskeletal reorganization ควบคุมการทำงานของ glucose transporter type 4 (GLUT-4) (Ueda S. *et al.*, 2010) และกระตุ้นการทำงานผ่าน protein kinases (Ridly A.J., 2006) นอกจากนี้ Rac1 ยังควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ cell-cell adhesion กระบวนการ motility ผ่านเส้นใย actin และกระบวนการ epithelial differentiation เป็นต้น Rac1 เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดยทำงานร่วมกับ Rho ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ได้มากยิ่งขึ้น Rac1 มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่หลากหลายและเกี่ยวข้องกับการสร้าง lamellipodia (Parri M. and Chiarugi P., 2010) เซลล์มะเร็งจึงแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ใช้ศึกษาและติดตามการเกิด invasion และ metastasis (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011) พบการแสดงออกของ Rac1 เพิ่มขึ้นในหนูที่เหนียวทำให้เกิดเนื้องอก Kaposi's sarcoma (Ma Q. *et al.*, 2009) การถูกกระตุ้นและการกลายพันธุ์ของ RAC1 มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนที่ของ mesenchymal cell โดยอาศัย neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9 (NEDD9) และ dedicator of cytokinesis 3 (DOCK3) ทำให้เกิดโครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีนเกิดขึ้น (Sanz-Moreno V. *et al.*, 2008) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ epithelial mesenchymal transition (EMT) ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเนื้องอกและเกิดการต่อต้าน

ตามมา (Yang W.H. *et al.*, 2012) และยังพบการกลายพันธุ์ของ Rac1 ใน non-small cell lung cancer (Stallings-Mann M.L. *et al.*, 2012)

1.2.4 Cell division control protein 42 homolog (Cdc42)

เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ มีขนาด 21.33 กิโลดัลตัน ประกอบด้วย homodimer สาย A และ B จัดเป็น GTPase ขนาดเล็ก ซึ่งควบคุมการทำงานของเซลล์ เช่น การเคลื่อนที่ของเซลล์, การแพร่กระจายของเซลล์, การก่อตัวของ invadopodia, การก่อตัวของ filopodia นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์และ cell cycle progression ซึ่งมีความสำคัญกับการเกิดมะเร็งโดยตรง (Qadir M.I. *et al.*, 2015) จากการศึกษาบ่งชี้ให้เห็นว่า Cdc42 มีความสำคัญกับการเกิด progression ในมะเร็ง พบการแสดงออกของ Cdc42 เพิ่มขึ้นในมะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, มะเร็งเต้านม, มะเร็งอวัยวะ การแสดงออกของ Cdc42 เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของผู้ป่วยเชิงลบ (Stengel K. and Zheng Y., 2011) จากข้อมูลการศึกษาในเนื้องอกและเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H1299 และ H520 ซึ่งเป็น non-small cell lung cancer พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ของยีน LKB1 ร้อยละ 30 ทำให้มีผลต่อการแสดงออกของ Cdc42 และการเติมหมู่ฟอสเฟตด้าน downstream ให้กับ p21-activated protein kinases pathway (PAKs) เพิ่มมากขึ้นมีผลให้ส่งเสริมการเกิด lamellipodia เพิ่ม motility ของเซลล์และทำให้เกิดการแพร่กระจายของมะเร็งปอดได้มากยิ่งขึ้น (Zhang S. *et al.*, 2008)

1.2.5 Ras homolog gene family, member A (RhoA)

เป็น GTPase ที่มีขนาดเล็กใน Rho family ซึ่งจะเข้าจับกับ inactive GDP ให้เป็น active GTP ทำหน้าที่เป็นตัวเปิดปิด signal transduction cascades ซึ่ง RhoA เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์สร้าง actin cytoskeleton การคงรูป การยึดติดและการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแสดงออกของยีนที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการขยายตัว และการแพร่กระจายของเนื้องอก และเซลล์มะเร็งหลายชนิด การศึกษาในมะเร็งปอดทั้ง small cell lung cancer และ non-small cell lung cancer พบการแสดงออกของ RhoA มากขึ้นและสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมากขึ้น จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ RhoA จะพบใน SCLC มากกว่า NSCLC ซึ่ง RhoA จะไปเพิ่มการทำงานของ nitric oxide synthase-2 (NOS-2) ในเซลล์มะเร็งปอด และยังทำให้เกิด motility เพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระดับของ delta-catenin และพบได้บ่อยใน NSCLC แต่ไม่พบในเนื้อเยื่อปกติทั่วไป (Zhang D. *et al.*, 2014)

1.3 ชนิดเซลล์มะเร็งปอด (type of lung cancer)

1.3.1 มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancer; SCLC)

เป็นมะเร็งปอดที่พบเป็นอันดับ 2 โดยพบร้อยละ 15-20 ของมะเร็งปอดทั้งหมด มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กเกิดบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวของหลอดลมเช่นเดียวกับมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก แต่เป็นเซลล์ต่างชนิดกันโดยเกิดจากเซลล์ที่เรียกว่า neuroendocrine cell ที่สามารถสร้างฮอร์โมนและสารเคมีผิดปกติต่าง ๆ ได้หลายชนิด ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่ผิดปกติในมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่เรียกว่า paraneoplastic syndrome โดยพบว่ามี การเติบโตเป็นเซลล์มะเร็งเพียงขนาดเล็กและมักไม่มีการลุกลาม มะเร็งชนิดนี้มีโอกาสรักษาให้หายขาดได้ง่าย โดยพบลักษณะเซลล์คือมีไซโตพลาสซึมน้อย และมีสัดส่วนของนิวเคลียสมากกว่า จึงเห็นเป็นลักษณะของเซลล์เล็ก ๆ ที่มีนิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ ลักษณะนิวเคลียสจะคล้าย ๆ กันทั้งหมด มีเส้นโครมาทินบาง ๆ และไม่เห็นเม็ดนิวคลีโอล (finely granular chromatin และ small หรือ inapparent nucleoli) ลักษณะเฉพาะอีกอย่างคือจะเห็นการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (cell mitosis) และมีบริเวณเซลล์ที่ตายเป็นหย่อม ๆ (necrotic areas) (รจนา ศิริศิริโร, 2556)

1.3.2 มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (non-small cell lung cancer; NSCLC)

เป็นมะเร็งปอดชนิดที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลมในปอด ในต่างประเทศพบร้อยละ 75-80 ส่วนในประเทศไทยพบมากกว่าร้อยละ 90 แบ่งออกเป็น squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma และ adenosquamous cell carcinoma เป็นมะเร็งปอดที่พบมีการเติบโตเป็นเซลล์มะเร็งขนาดใหญ่และมีการลุกลามมาก ลักษณะของเซลล์มะเร็งจะมีเซลล์ขนาดใหญ่ มีไซโตพลาสซึมเป็นส่วนใหญ่ ไม่พบการเรียงตัวของ squamous cell carcinoma หรือคล้ายต่อมแบบ adenocarcinoma มะเร็งชนิดนี้จะมีนิวเคลียสสีไม่เข้ม

1.4 ระยะของมะเร็งปอด (stages of lung cancer)

หลักการแบ่งระยะของมะเร็งปอดชนิด NSCLC อาศัยหลักการแบ่งระยะเหมือนกับมะเร็งชนิดอื่น ๆ คือระบบที่เรียกว่า TNM staging system (T = tumor, N = regional nodes, M = metastasis) ซึ่งจะแยกผู้ป่วยออกเป็นระยะต่าง ๆ 4 ระยะ และแบ่งเป็นระยะย่อย 2 ระยะ (ตารางที่ 1) การแบ่งระยะนี้ทำให้สามารถบอกการพยากรณ์และอัตราการตายของโรคได้ เช่น อัตราการตายของผู้ป่วยที่ 5 ปีอยู่ในช่วงร้อยละ 61 ในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะที่ 1A ถึงร้อยละ 100 ในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะที่ 4

ตารางที่ 1 การแบ่งระยะของมะเร็งปอดตาม TNM staging system for lung cancer 7th edition (Goldstraw P. *et al.*, 2007)

Primary tumor (T)	
T1	Tumor \leq 3 cm diameter, surrounded by lung or visceral pleura, without invasion more proximal than lobar bronchus
T1a	Tumor \leq 2 cm in diameter
T1b	Tumor $>$ 2 cm but \leq 3 cm in diameter
T2	Tumor $>$ 3 cm but \leq 7 cm, or tumor with any of the following features:
	Involves main bronchus, \geq 2 cm distal to carina
	Invades visceral pleura
	Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung
T2a	Tumor $>$ 3 cm but \leq 5 cm
T2b	Tumor $>$ 5 cm but \leq 7 cm
T3	Tumor $>$ 7 cm or any of the following:
	Directly invades any of the following: chest wall, diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium, main bronchus $<$ 2 cm from carina (without involvement of carina)
	Atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung
	Separate tumor nodules in the same lobe
T4	Tumor of any size that invades the mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, carina, or with separate tumor nodules in a different ipsilateral lobe
Regional lymph nodes (N)	
N0	No regional lymph node metastases
N1	Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node (s)
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node (s)

ตารางที่ 1 (ต่อ) การแบ่งระยะของมะเร็งปอดตาม TNM staging system for lung cancer 7th edition (Goldstraw P. *et al.*, 2007)

Distant metastasis (M)			
No distant metastasis			
Distant metastasis			
Separate tumor nodule (s) in a contralateral lobe; tumor with pleural nodules or malignant pleural or pericardial effusion			
Distant metastasis (in extrathoracic organs)			
Stage groupings			
Stage IA	T1a-T1b	N0	M0
Stage IB	T2a	N0	M0
Stage IIA	T1a T1b, T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stage IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T1a T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stage IIIB	T4	N2	M0
	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1a or M1b

1.5 อาการของมะเร็งปอด (symptom of lung cancer)

อาการของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งปอดมักไม่จำเพาะทำให้เกิดการวินิจฉัยที่ล่าช้ามีผลต่อระยะของโรคในเวลาที่ใช้การวินิจฉัย มีผู้ป่วยประมาณร้อยละ 40 ที่พบโรคเมื่อทำการค้นหาในประชากรจะมีอาการเทียบกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลซึ่งจะมีอาการถึงร้อยละ 98 (ตารางที่ 2) อาการที่นำผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมาพบแพทย์ ส่วนมากแล้วผู้ป่วยมักเริ่มด้วยอาการทางการหายใจที่เกิดขึ้นใหม่และเป็นมากขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนน้อยที่ไม่มีอาการ นอกจากนี้ยังพบผลเอกซเรย์ปอดผิดปกติ บางครั้งพบว่าผู้ป่วยมาด้วยอาการที่ไม่จำเพาะของโรคมะเร็ง เช่น อาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด อ่อนเพลีย เป็นต้น

1.5.1 อาการที่เกิดจากมะเร็งปอดที่อยู่ที่หลอดลมส่วนกลาง (central airway)

สามในสี่ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดจะเกิดโรคในหลอดลมใหญ่โดยเฉพาะมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma และ small cell carcinoma อาการที่อาจเกิดขึ้นคือ ไอ ไอเป็นเลือด อาการเหนื่อยจากการที่ก้อนมะเร็งไปอุดกั้นบางส่วนของหลอดลม (ตารางที่ 2) และอาการเจ็บหน้าอกที่จะเป็นการเจ็บตื้อ ๆ ไม่สามารถระบุตำแหน่งที่แน่นอนได้ พบได้มากถึงร้อยละ 60 ของผู้ป่วยที่ทำให้การวินิจฉัยโรคนี้ อาการไอจะเป็นอาการที่เกิดขึ้นได้บ่อยที่สุด โดยผู้ป่วยมักมีอาการไอเป็นเวลานานมากกว่า 2 สัปดาห์และมีอายุมากกว่า 40 ปี โดยเฉพาะถ้ามีความเสี่ยงของการเกิดโรค เช่น สูบบุหรี่ด้วยให้สงสัยว่าอาจจะเป็นโรคมะเร็งปอด แต่ส่วนมากแล้วจะเป็นเพียงการอักเสบเรื้อรังของหลอดลมเท่านั้น อาการไอเป็นเลือดมักมีจำนวนน้อยปนมากับเสมหะหรือออกมาเป็นก้อนไม่มากนัก โอกาสที่จะมีเลือดออกมาเป็นจำนวนมากเกิดขึ้นได้น้อยมาก

ตารางที่ 2 อาการที่นำผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมาพบแพทย์ (สุพัตรา รักเอียด และคณะ, 2558)

อาการ	สัดส่วนของผู้ป่วย (%)
อาการไอ	45-75
น้ำหนักลด	8-68
อาการเหนื่อย	37-58
อาการไอเป็นเลือด	27-57
เจ็บหน้าอก	27-49
เสียงแหบ	2-18

1.5.2 อาการที่เกิดจากมะเร็งปอดที่อยู่ที่หลอดลมส่วนปลาย (peripheral airway)

มะเร็งชนิด adenocarcinoma หรือ large cell มักเป็นบริเวณชายปอด ดังนั้นจะไม่มีโอกาสที่จะทำให้เกิดการอุดกั้นที่หลอดลมใหญ่ ทำให้มีอาการเหนื่อย โดยอาการเหนื่อยที่เกิดขึ้นจะพบในกรณีที่มีมะเร็งมีการกระจายไปยังท่อน้ำเหลืองในปอดเป็นบริเวณกว้าง ทำให้มีผลต่อการแลกเปลี่ยนแก๊ส หรือมีการกระจายของมะเร็งเข้าไปในเยื่อหุ้มปอด ทำให้เกิดการบวมน้ำไปกอดเนื้อปอด อาการไอหรือไอเป็นเลือดจะเกิดขึ้นได้บ่อย ถ้ามะเร็งลุกลามเข้าไปยัง parietal pleura หรือผนังทรวงอกจะทำให้เกิดอาการปวดที่เกิดจากการกระจายของมะเร็งปอด (distance metastasis) ประมาณหนึ่งในสามของผู้ป่วยจะมีอาการของการกระจายของมะเร็งออกนอกปอดแล้วเมื่อมาพบแพทย์ การกระจายไปกระดูกพบบ่อยใน small cell และ large cell ทำให้เกิดอาการปวดเฉพาะที่หรือมีกระดูกหัก การกระจายไปยังสมองทำให้ผู้ป่วยอ่อนแรงเฉพาะที่ ต่อมา

น้ำเหลืองที่คั่งและต่อมหมวกไตเป็นอวัยวะที่มักเกิดการกระจายได้บ่อยแต่ไม่ทำให้เกิดอาการ เช่นเดียวกับการกระจายไปที่ตับ

1.5.3 อาการ paraneoplastic syndrome

Paraneoplastic syndrome เป็นอาการและอาการแสดงที่เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งหลังสารที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์อื่น ๆ ของร่างกายทำให้เกิดความผิดปกติขึ้น โดยที่ไม่ได้เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งกระจายไป มักพบในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ขนาดเล็ก ซึ่งเป็นที่ทราบมานานแล้วว่า มีเซลล์ต้นกำเนิดจาก neuroendocrine cell ในหลอดลม ทำให้มีคุณสมบัติในการสร้าง polypeptide protein ที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน อาการและอาการแสดงที่พบได้บ่อยคือ syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH) แม้ว่าการเพิ่มปริมาณของ antidiuretic hormone (ADH) พบได้ในหลายพยาธิสภาพแต่พบได้บ่อยใน small cell carcinoma วินิจฉัยได้จากการที่ผู้ป่วยมีระดับโซเดียม ยูเรีย และออสโมลาลิตี (osmolality) ในเลือดต่ำ ในขณะที่มีออสโมลาลิตีในปัสสาวะสูงกว่า นอกจากนี้มีรายงานว่าร้อยละ 1-69 ในผู้ป่วย small cell carcinoma ที่ทำให้ระดับโซเดียมต่ำมากจนเกิดอาการ และร้อยละ 25 พบว่าภาวะนี้ไม่สัมพันธ์กับระยะของโรค และร้อยละ 80 ของผู้ป่วยที่เกิดภาวะโซเดียมต่ำจะหายไปภายใน 3 สัปดาห์หลังจากเริ่มให้ยาเคมีบำบัดและจะกลับมาเมื่อโรคลุกลามมากขึ้น

1.5.3.1 Ectopic adrenocorticotrophic hormone (ACTH)

มักพบใน small cell carcinoma หรือ carcinoid tumor พบว่าร้อยละ 30 ของผู้ป่วยจะมีระดับ adrenocorticotrophic hormone (ACTH) ในเลือดสูง แต่ไม่ค่อยเกิดอาการของ Cushing syndrome เพราะระยะเวลาการดำเนินโรคนั้น การเกิดอาการของ ACTH สูงทำให้การพยากรณ์โรคไม่ดี

1.5.3.2 Hypercalcemia

ภาวะนี้มักเกิดในกรณีที่มีการกระจายของมะเร็งไปที่กระดูกแต่บางครั้งเกิดในขณะที่ยังไม่มีการกระจายของมะเร็งไปที่ใด ซึ่งพบได้ร้อยละ 6 ของมะเร็งปอดชนิด squamous cell สาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดจากสาร parathyroid hormone like peptide ที่สร้างจากเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องผูก กระหายน้ำ เกิดภาวะขาดน้ำ สภาพการรับรู้สติลดลงจน coma ได้

1.5.3.3 Neuromyopathies

ผู้ป่วยร้อยละ 70 ที่เกิดอาการของ Lambert Eaton myasthenic syndrome จะเกิดจากมะเร็งปอดชนิด small cell โดยจะมีอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อต้นแขน ขา reflex ลดลง การทำ electrophysiology ของเส้นประสาทจะพบความผิดปกติของการหลัง

acetylcholine ที่ปลายประสาท ภาวะนี้มักเกิดก่อนอาการของโรคมะเร็งได้ถึง 2 ปี แต่โดยเฉลี่ยจะประมาณ 8 เดือน

1.5.3.4 Hypertrophic osteoarthropathy

มีภาวะ periosteal proliferation ของ tubular bones ร่วมกับมีนิ้วป้อม (clubbing of finger) ผู้ป่วยจะมีอาการปวดตามข้อต่าง ๆ ทั้งสองข้าง เช่น ข้อเท้า ข้อเข่า ข้อศอกหรือข้อมือ หรือแม้กระทั่งฝ่ามือ ฝ่าเท้าหรือนิ้ว

1.6 การวินิจฉัย (diagnosis)

การเอกซเรย์ทรวงอก (chest X-ray) นิยมใช้เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยมะเร็งปอดเบื้องต้น หากพบเนื้องอกในปอดจะแสดงเป็นลักษณะทอนสีขาว-เทาให้เห็นถึงสภาพปอดของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถแยกความชัดเจนระหว่างก้อนเนื้อมะเร็งหรือสภาวะอื่น ๆ ที่อาจเกิดกับปอดได้ อย่างโรคฝีในปอด (lung abscess) ก่อนที่แพทย์จะตรวจด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เพื่อดูอีกครั้งว่าสิ่งผิดปกตินั้นเป็นมะเร็งปอดหรือไม่ รวมถึงชนิดของมะเร็ง และการแพร่กระจายของมะเร็ง

การเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ หรือซีทีสแกน (CT-scan) เป็นวิธีการตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในโดยรังสีเอกซ์ก่อนที่จะสร้างออกมาเป็นภาพด้วยเครื่องมือพิเศษ เพื่อให้แพทย์สามารถเห็นเนื้อปอดได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยแพทย์อาจมีการตรวจด้วยวิธีนี้หลังการเอกซเรย์ทรวงอก ก่อนการทำ ซีทีสแกนแพทย์อาจจะฉีดสารทึบรังสีให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งสารทึบสารทึบรังสีนี้จะทำให้สามารถตรวจพบสิ่งผิดปกติภายในปอดได้ชัดเจน การทำซีทีสแกนจะไม่ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวด และใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที

การเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ เพทซีทีสแกน (Positron Emission Tomography-Computed Tomography: PET-CT Scan) อาจจะมีการตรวจในกรณีหลังจากการตรวจพบสิ่งผิดปกติที่คาดว่าน่าจะเป็นมะเร็งภายหลังการตรวจซีทีสแกน โดยจะช่วยประเมินการแพร่กระจายของมะเร็ง ทำให้รู้ได้ว่าผู้ป่วยเป็นมะเร็งอยู่ในระยะใด ซึ่งจะช่วยในการวินิจฉัยและการรักษาได้ตรงจุดมากขึ้น ก่อนทำการตรวจเพทซีทีสแกน แพทย์จะฉีดสารกัมมันตรังสีให้แก่ผู้ป่วยก่อนผ่านเข้าเครื่องตรวจ การตรวจด้วยวิธีนี้จะไม่ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวด และใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที (Vansteenkiste J.F. and Stroobants S.S., 2006)

การส่องกล้องและการตัดชิ้นเนื้อ (bronchoscopy และ biopsy) หากพบสิ่งผิดปกติที่คาดว่าน่าจะเป็นมะเร็งบริเวณกลางหน้าอก แพทย์อาจใช้วิธีการส่องกล้องโดยใช้ท่อขนาดเล็กสอดลงไปในหลอดลม เพื่อตรวจดูความผิดปกติของปอดและตัดชิ้นเนื้อบางส่วนออกมาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ก่อนทำการส่องกล้องแพทย์อาจจะให้ผู้ป่วยรับประทานยาที่ช่วย

คลายกังวล เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยรู้สึกผ่อนคลายขึ้นก่อนทำการตรวจ ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้เวลาไม่นาน ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถใช้วิธีการตัดชิ้นเนื้อไปตรวจด้วยวิธีการข้างต้นได้ แพทย์อาจพิจารณาวิธีอื่นในการใช้ในการวินิจฉัยโรค เช่น การเจาะตัดชิ้นเนื้อผ่านผิวหนังด้วยเข็มขนาดเล็ก (percutaneous needle biopsy) การผ่าตัดปอดโดยใช้กล้องส่อง (thoracoscopy) หรือการส่องกล้องในช่องอก (mediastinoscopy)

1.7 การรักษาตามระยะต่าง ๆ (treatment of stages)

ระยะที่ I เซลล์มะเร็งยังเป็นที่ปอด ยังไม่มีการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียงในปอด เกิดเฉพาะส่วนใดส่วนหนึ่งของเนื้อปอด ระยะนี้สามารถรักษาให้หายขาดได้ด้วยการผ่าตัดเอาก่อนเนื้อมะเร็งออก โดยไม่ต้องรักษาโดยวิธีอื่น ๆ

ระยะที่ II เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียงในปอด และยังคงอยู่ในช่องปอด สามารถตรวจพบได้ด้วยการตรวจ CT-scan หรือการส่องกล้อง การรักษาในระยะนี้จะใช้วิธีการผ่าตัดเอาเซลล์มะเร็งออก พร้อมกับเลาะต่อมน้ำเหลืองที่ติดเซลล์มะเร็ง และต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียงออก และอาจใช้วิธีการรักษาอื่นร่วมด้วย เช่น การฉายรังสีและเคมีบำบัด เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งที่อาจติดในเซลล์อื่น ๆ ข้างเคียง

ระยะที่ III เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณส่วนกลางของปอด แต่ยังไม่แพร่สู่อวัยวะอื่น ๆ ใกล้เคียง แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่ IIIA พบการกระจายของเซลล์มะเร็งสู่ต่อมน้ำเหลืองเพียงจุดเดียว ระยะนี้รักษาด้วยด้วยการฉายรังสีและการให้ยาเคมีบำบัดก่อน เมื่อก่อนมะเร็งค่อย ๆ ลดขนาดจะใช้วิธีการผ่าตัดเอาเซลล์มะเร็งออก ระยะที่ IIIB พบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งสู่ต่อมน้ำเหลืองหลายจุด จนรักษาด้วยการผ่าตัดไม่ได้ การรักษาจะใช้การฉายรังสี และการให้ยาเคมีบำบัด

ระยะที่ IV เป็นระยะที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งสู่ต่อมน้ำเหลืองหลายจุด และแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับ กระดูก และสมอง การรักษาจะใช้การฉายรังสี และการให้ยาเคมีบำบัด

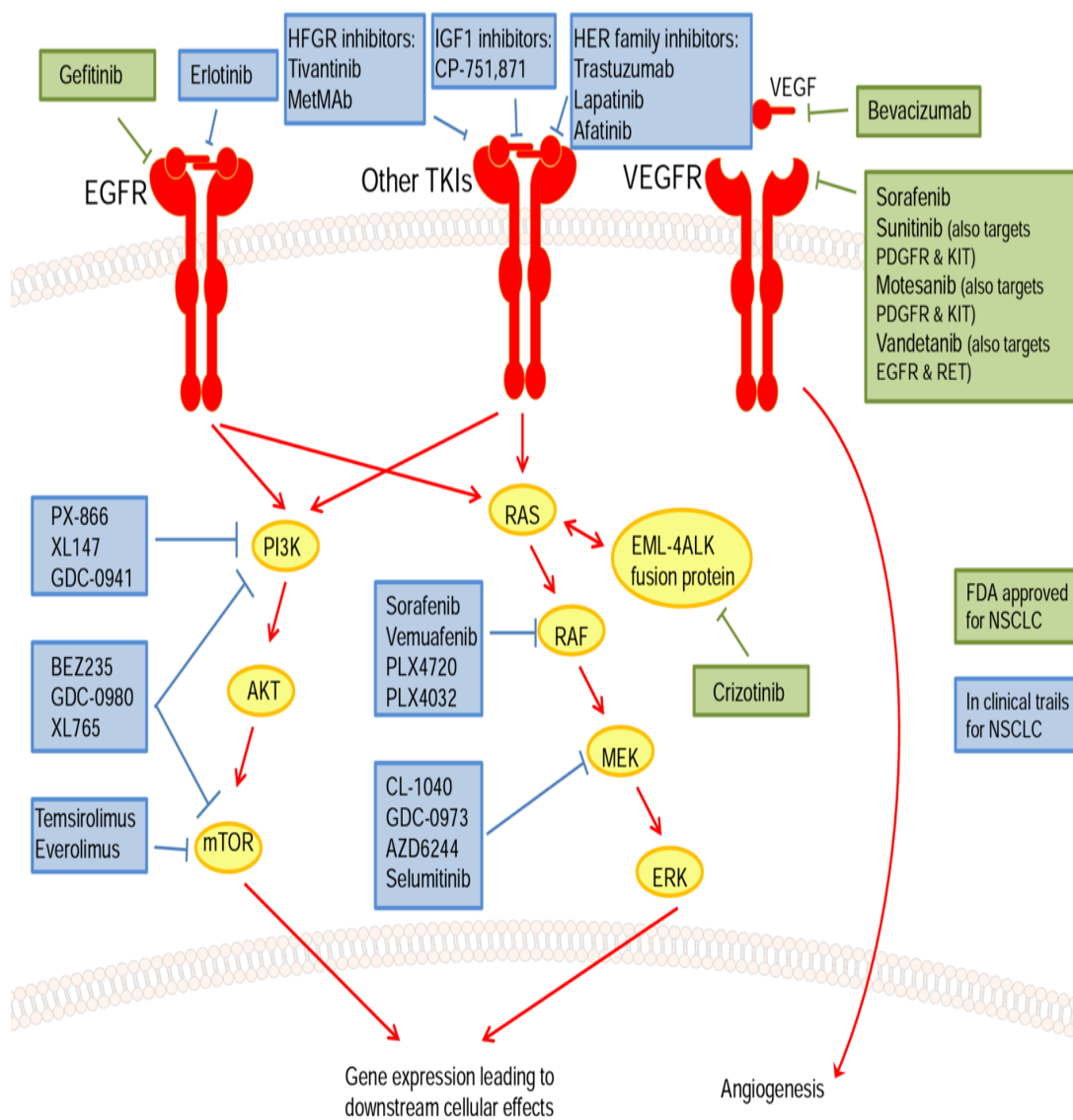
1.8 การรักษาโดยการยา (drug of non-small cell lung cancer; NSCLC) (รูปที่ 2)

1.8.1 Gefitinib

ปิดกั้นตัวรับของ EGFR โดยจับที่ส่วน tyrosine kinase การใช้ในทางคลินิกเป็นยา กินรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่การรักษาอื่นไม่ได้ผล อาจมีผลข้างเคียง เช่น อูจจาระร่วง คลื่นไส้ ผิวหนังมีผื่นคัน กระจกตาลอก (corneal erosion)

1.8.2 Bevacizumab

จับกับ VEGF ทำให้ VEGF ไม่สามารถจับกับ VEGF receptor (VEGFR) ได้ VEGF มีบทบาทในการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ให้แก่เซลล์มะเร็ง ผลข้างเคียงคือ เลือดออกง่าย ลำไส้ทะลุ แผลผ่าตัดหายยาก



รูปที่ 2 ยาที่ใช้รักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC (Gately K., 2013)

1.8.3 Sorafenib

ยับยั้ง RAF kinase แต่มีอาการข้างเคียงที่ร้ายแรงหลายอย่างเช่น ภาวะลิ่มเลือดอุดตัน ไตวายเฉียบพลัน ความดันเลือดสูง

1.8.4 Sunitinib

ยับยั้ง VEGFR และ platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) จึงยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ผลข้างเคียง เช่น เป็นพิษต่อหัวใจห้อง ventricle ซ้าย เกิดเลือดต่ำ เลือดออกง่าย ซีด เม็ดเลือดขาวต่ำ และเป็นพิษต่อตับ

1.8.5 Crizotinib

ยับยั้งตัวรับ tyrosine kinase ใช้ในการรักษาผู้ป่วย NSCLC ที่มีความผิดปกติของ anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene ซึ่งพบได้ประมาณ 1-7% ของผู้ป่วย NSCLC ผลข้างเคียงของยา เช่น ท้องผูก อาเจียน อูจาระร่วง ใช้ กลืนลำบาก และอาหารไม่ย่อย (สุรเกียรติ์ อาชานานภาพ, 2553)

1.8.6 Vandetanib

เป็นตัวยับยั้ง VEGFR, EGFR ผลข้างเคียง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน (DrugBank, 2018)

1.8.7 Everolimus

เป็นสารกลุ่ม macrolide ที่สกัดได้จากเชื้อราในดินเดิมมีชื่อว่า rapamycin จับกับ FK-binding protein-12 (FKBP-12) ในไซโตซอลได้เป็น everolimus-FKBP-12 complex ทำให้จับและยับยั้ง mammalian target of rapamycin (mTOR) มีผลยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของ T cells และยับยั้งการตอบสนองของ T cell ต่อ interleukin 2 (IL-2) ผลข้างเคียง เช่น กดไขกระดูก ซีด ติดเชื้อง่าย ไขมันในเลือดสูง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน โปแทสเซียมในเลือดต่ำ (DrugBank, 2018)

1.8.8 Tivantinib

ยับยั้ง c-Met receptor tyrosine kinase มีบทบาทสำคัญหลายอย่างในมะเร็ง รวมถึงการเติบโตเซลล์มะเร็งต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การบุกรุกและการแพร่กระจาย c-Met ที่ทำงานผิดปกติ ควบคุมการรับส่งสัญญาณหลายอย่างเกี่ยวข้องกับ การเติบโตของเนื้องอกและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ผลข้างเคียง เช่น เป็นผื่น ท้องเสีย และมีอาการเมื่อยล้า (DrugBank, 2018)

1.8.9 Lapatinib

ยับยั้ง 4-anilinoquinazoline kinase ของ tyrosine kinase domains เกี่ยวข้องกับ epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR/ERBB1) และ human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2/ERBB2) ผลข้างเคียง เช่น ผื่นแพ้ ไอ หายใจถี่ เมื่อยล้า

1.8.10 XL765

ยับยั้งการทำงานของ phosphoinositide-3 kinase (PI3K) ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์และการอยู่รอด เพิ่มความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี นอกจากนี้ XL765 ยังยับยั้งเป้าหมาย mTOR มีบทบาทสำคัญในการเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Gately K., 2013)

1.9 การพยากรณ์โรค (prognosis)

การวินิจฉัยและการประเมินระยะลุกลามของโรคมักอาศัยการซักประวัติและการตรวจร่างกายที่แม่นยำ การถ่ายภาพรังสีทรวงอกเป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะอาจช่วยให้พบลักษณะเงาเนื้ออกในปอด ต่อม้าน้ำเหลืองที่ mediastinum ภาวะसरน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดหรือลักษณะที่มะเร็งลุกลามเข้าผนังทรวงอกได้ การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ของทรวงอกร่วม upper abdomen มีประโยชน์สูงเพราะจะช่วยให้ทราบขนาดก้อนและการลุกลามของก้อนเข้าสู่อวัยวะใกล้เคียง (T) รวมทั้งตรวจหาต่อมน้ำเหลือง (N) และการกระจายสู่อวัยวะนอกทรวงอก (M) การรักษาและพยากรณ์โรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC อาศัยการแบ่งระยะโรคตามระบบ TNM ของ American Joint Committee on Cancer (AJCC)

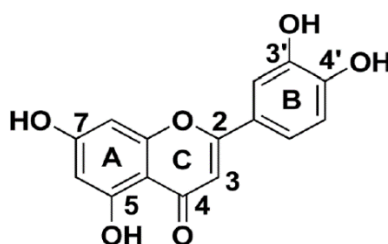
ตารางที่ 3 อัตราการรอดชีวิตใน 5 ปี ของผู้ป่วย NSCLC แบ่งตามระบบ TNM (Mountain C.F., 1997)

ระยะ	TNM Classification	อัตราการอยู่รอด 5 ปี (%)
0	Carcinoma in situ	NR (not reported)
IA	T1N0M0	61
IB	T2N0M0	38
IIA	T1N1M0	34
IIB	T2N1M0 or T3N0M0	24
IIIA	T1-3N2M0 or T3NM0	13
IIIB	T4 Any N M0 or Any T N3M0	5
IV	Any T Any N M1	1

2. ลูทีโอลิน (luteolin)

ลูทีโอลิน (3', 4', 5,7-tetrahydroxy flavone) (รูปที่ 3) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งพบในพืชหลายชนิด เช่น carrots (*Daucus carota* L.), peppers (*Capsicum annuum* L.), celery (*Apium graveolens* L.), olive oil (*Olea europaea* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), perilla leaves (*Perilla frutescens* L. Britton), pomegranate (*Punica granatum* L.), artichoke (*Cynara scolymus* L.), chocolate (*Theobroma cacao* L.), rooibos tea (*Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren), buckwheat sprouts (*Fagopyrum esculentum* Moench), turnip (*Brassica napus* L.), capers (*Capparis spinosa* L.) และ cucumber (*Cucumis sativus* L.) นอกจากนี้ยังพบใน เลมอน, บี้ทรูท, กะหล่ำดาว, กะหล่ำปลี, กะหล่ำดอก, ต้นหอมจีน, ผักชีลาว, ฮอรัสแรติช, กะหล่ำปม, ผักชีใบเล็ง็ก, ผัก

โฆม และ ซาเชียว (Shimoi K. *et al.*, 1998 and Lo'pez-La'zaro M. 2009) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของลู่ทีโอลิน (Lin Y. *et al.*, 2009)

2.1 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological effects)

2.1.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของลู่ทีโอลินโดย Ruiz P.A. และคณะ (2006) พบว่าลู่ทีโอลินยับยั้งการอักเสบที่กระตุ้นด้วย tumor necrosis factor- α (TNF- α) โดยผ่านการยับยั้ง NF- κ B signaling pathway (Ruiz P.A. *et al.*, 2006) นอกจากนี้ลู่ทีโอลินยังยับยั้งการอักเสบผ่านการยับยั้ง protein kinase B (Akt) และเพิ่มการ degradation ของ interferon regulatory factor (IRF)-1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองโดยการให้ลู่ทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมแก่หนูที่ชักนำให้เกิดการแพ้ด้วย dinitrochlorobenzene พบว่าลู่ทีโอลินมีผลลดจำนวนการเกิด scratching ลด vascular permeability ลด ear thickness รวมทั้งยับยั้งการหลั่งสารก่ออักเสบ (Baolin L. *et al.*, 2005) การศึกษาในหนูที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยการฉีด lipopolysaccharide (LPS) พบว่าในหนูที่ได้รับลู่ทีโอลินก่อนการฉีด LPS จะเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ลดการสร้าง TNF- α และลดการแสดงออกของ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) ในตับ นอกจากนี้ยังลดการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังตับและปอด (Kotanidou A. *et al.*, 2002)

2.1.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลู่ทีโอลินโดย Romanova' และคณะ (2001) พบว่า ลู่ทีโอลินมีผลปกป้องการทำลาย DNA จาก hydrogen peroxide (H₂O₂) และ ferrous ion ได้มากที่สุด นอกจากนี้ลู่ทีโอลินยังปกป้องเซลล์ตับจากการถูกทำลายในสภาวะที่มี ferrous ion สูง (Galvez J. *et al.*, 1995) Horva'thova' K. และคณะ (2003) ทำการศึกษาในเซลล์ murine

leukemia L1210 พบว่าลูทีโอลินมีผลลดทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) (Horva'thova' K. *et al.*, 2003) จากการชักนำของ H_2O_2 ได้ร้อยละ 40 และในเซลล์ human myelogenous leukemia K562 สามารถลดการเกิดการทำลายดีเอ็นเอจากการชักนำด้วย H_2O_2 ได้ร้อยละ 44 (Horva'thova' K. *et al.*, 2004) Shimoi K. และ คณะ (1994) ทำการศึกษาใน ICR mice ที่ได้รับ irradiation (1.5 Gy) พบว่าลูทีโอลินลดการเกิด micronucleated reticulocytes และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation นอกจากนี้ยังลดการเกิด oxidative stress และลดการเกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีนและไขมันในสมองของหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยการฉีด morphine และ opiates (Qiusheng Z. *et al.*, 2005)

2.1.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer activity)

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ลูทีโอลินมีประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29, HCT116 มะเร็งตับ HepG2 มะเร็งปอด A549 (Chang J. *et al.*, 2005; Lee H.J. *et al.*, 2005; Lim D.Y. *et al.*, 2007 and Tang X. *et al.*, 2011) การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลินต่อเซลล์มะเร็งปอด การศึกษาของ Leung H.W. และคณะได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งปอด CH27 โดยเซลล์ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 30, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์ พบว่าลูทีโอลินที่ ความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้นทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis โดยการทำให้เซลล์เกิด DNA damage เพิ่ม caspase-3 และหยุดวัฏจักรเซลล์ให้อยู่ในระยะ S (Leung H.W. *et al.*, 2005) และทำให้เซลล์มะเร็งปอด CH27 ตายแบบ apoptosis โดยการกระตุ้น antioxidant enzymes เช่น superoxide dismutase และ catalase (Leung H.W. *et al.*, 2006) การศึกษาของ Ju W. และคณะ (2007) ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งปอด H23, H2009, H460 และ A549 พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการกระตุ้นจาก TNF- α โดยยับยั้ง NF- κ B และกระตุ้น JNK ทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis (Ju W. *et al.*, 2007 and Bai L. *et al.*, 2009) การศึกษาของ Tang X. และคณะ (2011) ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งปอดที่ได้รับลูทีโอลิน พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน Nrf2 ลดการจับของ Nrf2 กับ ARE และลดระดับ glutathione นอกจากนี้ลูทีโอลินยังมีผลเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัด oxaliplatin, bleomycin และ doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งปอด (Tang X. *et al.*, 2011 and Chian S. *et al.*, 2014) นอกจากลูทีโอลินทำให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดการตายแบบ apoptosis แล้ว ยังมีการศึกษาพบว่า ลูทีโอลินมีผลยับยั้งการแพร่กระจายและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดด้วย การศึกษาของ Anso' E. และคณะ (2010) ทำการศึกษาลูทีโอลินในเซลล์มะเร็งปอด NCI-H157 พบว่าลูทีโอลินยับยั้งการ

แสดงออกของ VEGF โดยผ่านการยับยั้งการ phosphorylation ของ STAT3 และเพิ่มการแสดงออกของ HIF-1 ส่งผลยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ไปยังเซลล์ที่เกิดภาวะ hypoxia (Anso' E. *et al.*, 2010) การศึกษาของ Zhao Y.X. และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549 พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์มีผลทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis และหยุดวัฏจักรเซลล์ให้อยู่ในระยะ G1 อีกทั้งมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดโดยมีผลลด actin assembly และ stress fiber formation แต่ในการศึกษาดังนี้ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลิน (Zhao Y.X. *et al.*, 2011) การศึกษาของ Chen K.C. และคณะ (2013) ทำการศึกษาผลของ ลูทีโอลินในการต้านฤทธิ์ของ TGF- β ที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าลูทีโอลินยับยั้งการกระตุ้น PI3K, Akt, I κ B α , NF- κ B และ Snail ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของ E-cadherin ทำให้ยับยั้งการเกิด EMT ส่งผลลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด A549 (Chen K.C. *et al.*, 2013) การศึกษาของ Meng G. และคณะ (2016) ทำการศึกษาผลของลูทีโอลินต่อการเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งและการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยเพิ่ม caspases-3 และ 9 ลดการแสดงออกของ Bcl-2 และเพิ่มการแสดงออกของ Bax โดยไปกระตุ้น MEK/ERK และ Akt นอกจากนี้ลูทีโอลินมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดด้วย โดยผ่านการกระตุ้น MEK/ERK pathway (Meng G. *et al.*, 2016)

2.1.4 ฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท (neuroprotective effect)

ลูทีโอลินมีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทโดยการศึกษาของ Zhou และคณะ (2011) พบว่าลูทีโอลินลดการเกิด oxidative stress ในเซลล์ neuroblastoma ลูทีโอลินมีผลลดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (cognitive impairment) เพิ่มความสามารถการจดจำระยะยาวในเรื่องทิศทาง (long-term spatial memory) และพบว่ามีผลลดการสร้าง amyloid- β และ amyloid precursor protein ในหนูที่มีการตัดแต่งทางพันธุกรรมของโมเดลโรคอัลไซเมอร์ (transgenic model of Alzheimer's disease) (Choi S.M. *et al.*, 2014) นอกจากนี้ลูทีโอลินมีผลลด 6-hydroxydopamine (6-OHDA) และ 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) ที่ชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท โดยลด (HO-1) และ glutamate cysteine ligase (GCL) (Hu L.W. *et al.*, 2014 and Patil S.P. *et al.*, 2014)

2.2 ความเป็นพิษ (toxicity) ของลูทีโอลิน

ความเป็นพิษของลูทีโอลินยังไม่ชัดเจน ในปัจจุบันมีรายงานว่าลูทีโอลินและอนุพันธ์ของลูทีโอลินมีผลต่อเซลล์ของมนุษย์เนื่องจากสารมีผลต่อ endocrine system (Nordeen S.K. *et al.*, 2013) โดยไปมีผลยับยั้งการสร้าง oestrogen (Scippo M.L. *et al.*, 2004) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของลูทีโอลินที่อยู่ในพืชนั้น ปริมาณไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดความเป็นพิษ (Nordeen S.K. *et al.*, 2013)

บทที่ 3

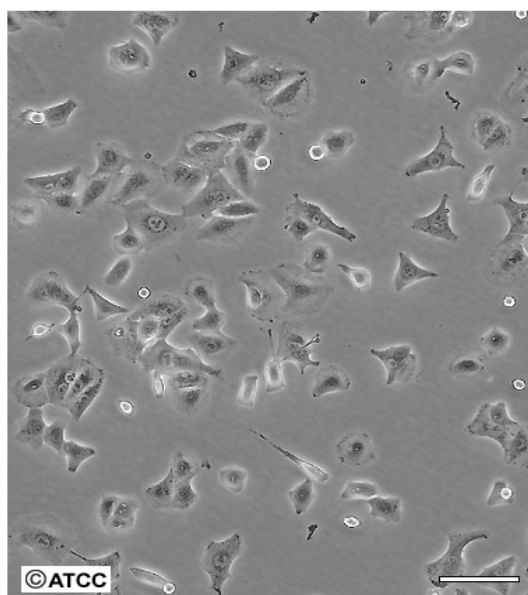
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture)

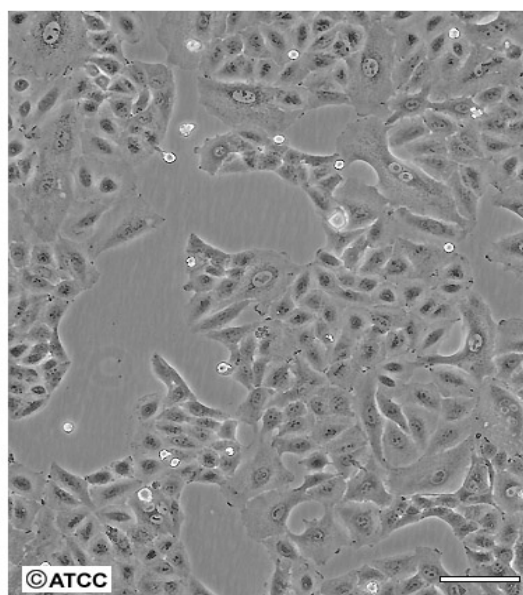
เซลล์เพาะเลี้ยง human adenocarcinoma epithelial A549 cell line (รูปที่ 4) และ human MRC-5 lung fibroblast cell line (รูปที่ 5) ซึ่งได้จากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, USA) ประเทศสหรัฐอเมริกา

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



Low Density

Scale Bar = 100µm

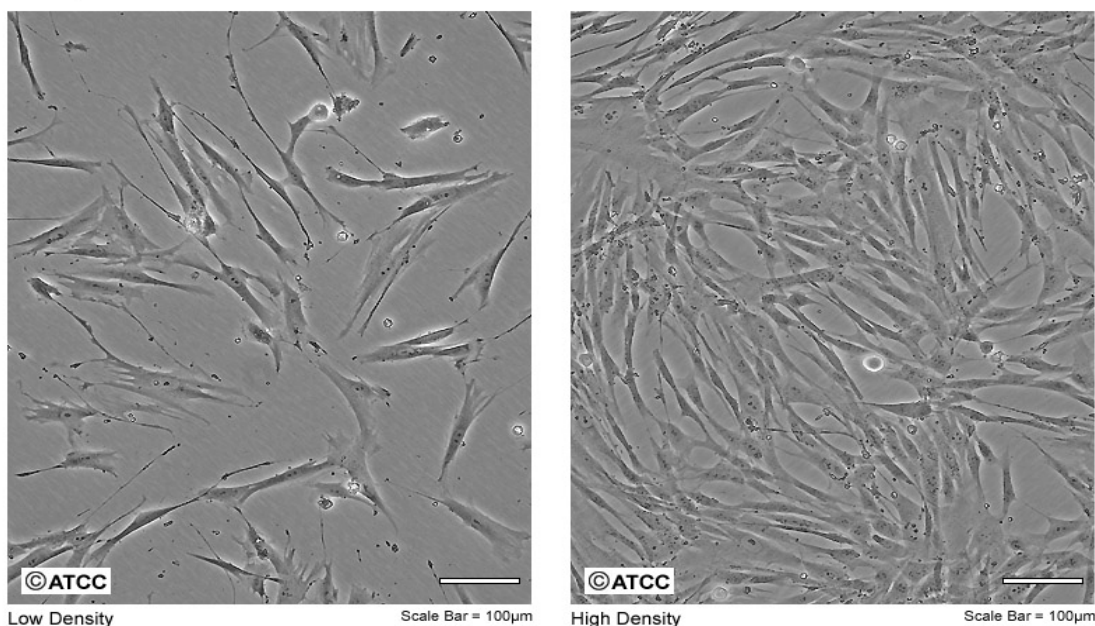


High Density

Scale Bar = 100µm

รูปที่ 4 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอด A549
(<https://www.atcc.org/products/all/ccl-185.aspx>)

ATCC Number: **CCL-171**
 Designation: **MRC-5**



รูปที่ 5 สันฐานวิทยาของเซลล์ปกติ MRC-5

(<https://www.atcc.org/products/all/ccl-171.aspx>)

3.1.2 การเตรียมลู่ที่โอลิน

เตรียมสารละลายลู่ที่โอลินความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ร้อยละ 10 และทำการเจือจางเพื่อใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์

3.1.3 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.3.1 สารเคมี

- Acrylamide/Bis solution 30 % (Merck, Germany)
- Ammonium persulphate (Vivantis, USA)
- Anti-mouse IgG HPR-linked antibody (Thermo scientific, USA)
- Bradford reagent (Bio rad, USA)
- Chemiluminescent substrate (Thermo scientific, USA)
- Deionized water
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (VMR chemicals, France)
- Distilled water

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma, USA)
- DMEM/Ham's F-12 (1:1) (Biochrom GmbH, Germany)
- Fetal bovine serum (Gibco BRL Life technologies, USA)
- Formaldehyde (Ajax Finechem, New Zealand)
- Glycine (Ajax Finechem, New Zealand)
- Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamine 200 mM (Gibco BRL Life technologies, USA)
- Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxy flavone) (Medchem express, USA)
- Mouse monoclonal antibody to Cdc 42 (Merck, Germany)
- Mouse monoclonal antibody to FAK (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Mouse monoclonal antibody to pFAK (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Mouse monoclonal antibody to pSrc (Abcam, UK)
- Mouse monoclonal antibody to RAC1 (Merck, Germany)
- Mouse monoclonal antibody to RhoA (Abcam, UK)
- Mouse monoclonal antibody to Src (Abcam, UK)
- Mouse monoclonal antibody to β -actin (Thermo scientific, USA)
- Non-fat dry milk powder
- Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL Life technologies, USA)
- Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (LOBA chemie, UK)
- Potassium chloride (Ajax Finechem, New Zealand)
- Potassium di-potassium orthophosphate (Ajax Finechem, New Zealand)
- Precision plus proteinTM dual color standard (Bio-rad, USA)
- Propanol-2-ol (Fisher chemical, UK)
- Rhodamine phalloidin (Sigma-Aldrich, USA)
- Sodium chloride (Gyeonggi-do, Korea)
- Sodium dodecyl sulfate (LOBA chemie, UK)
- Sodium hydrogen carbonate (Ajax Finechem, New Zealand)
- Sodium phosphate dibasic anhydrous (Rankem, India)
- Sodium pyruvate (100mM) (Gibco BRL Life technologies, USA)
- Tris (hydroxymethyl) methylamine (Ajax Finechem, New Zealand)
- Trypan blue (Dojindo, Japan)

- Trypsin EDTA 0.25% (Gibco BRL Life technologies, USA)
- β -mercaptoethanol (LOBA Chemie, India)

3.1.3.2 อุปกรณ์

- Clear blue X-ray film (Thermo scientific, USA)
- Conical tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- Culture flash T75 (Corning, USA)
- Culture plate 6, 24, 96 well plates (SPL Life Sciences, Korea)
- Culture plate P100 (SPL Life Sciences, Korea)
- Hypercassette (Amersham Biosciences, England)
- Microtube ขนาด 1.5, 2 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- Mini Rocker-Shaker (BioSan, Latvia)
- Nitrocellulose membrane (Merck, Germany)
- Pipette boy (Biohit, Germany)
- Pipette tip ขนาด 10, 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร (Corning, USA)
- Power supply (Bio-rad, USA)
- Seropipette 5 และ 10 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
- Vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- เครื่องกวนสาร (hotplate stirrer) (Corning, USA)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa, Switzerland)
- เครื่องทำความสะอาดด้วยคลื่นเสียง (Elma, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (high speed refrigerator centrifuge) (Hettich, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารขนาดเล็ก (minicentrifuge) (WiseSpin[®], Korea)
- เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter) (Thermo scientific, Singapore)
- เครื่องอบลมร้อน (hot air oven) (Heraeus, USA)
- เครื่องอบหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (Zealway, USA)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) (Biotek, USA)
- เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (dry bath incubator) (Major science, Taiwan)
- เครื่องโฮโมจีไนเซออร์ (homogenizer) (IKA, USA)
- แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar)
- กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (WhatmanTM, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) (Olympus, Japan)

- กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับ (Olympus, Japan)
- ขวดฝาเกลียว ขนาด 250, 500 และ 1 000 มิลลิลิตร (Schott duran, USA)
- ชุด gel electrophoresis (gel electrophoresis set) (Bio-rad, USA)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- ตู้เย็น (refrigerator) (Toshiba, Japan)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (Thermo Forma Scientific, USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (biological safety cabinet class 2) (Astek, UK)
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 250, และ 500 มิลลิลิตร (Schott duran, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (WiseBath, Korea)

3.2 วิธีการวิจัย

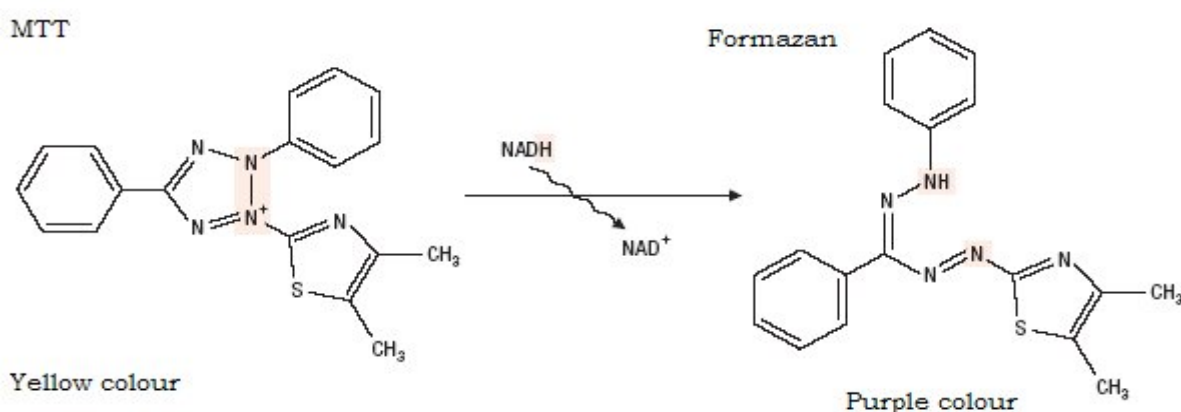
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด (cell culture)

เซลล์เพาะเลี้ยง human adenocarcinoma epithelial A549 cell line และ human MRC-5 lung fibroblast cell line เลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์คือ DMEM/Ham's F-12 และ DMEM ตามลำดับ เสริมด้วย fetal bovine serum (FBS) 10%, ยาเพนนิซิลิน 1%, ยาสเตรปโตมัยซิน 1%, แอลกลูตามีน 1% และโซเดียมไพรูเวท 1% เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3-4 วัน และ trypsinized ด้วย trypsin EDTA 0.25% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เมื่อเซลล์เติบโตประมาณ 85-90% ของภาชนะเลี้ยงเซลล์

3.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของลูทีโอลินต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 และเซลล์ปกติ MRC-5 ด้วยวิธี MTT

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human adenocarcinoma epithelial A549 cell line และเซลล์ปกติ human MRC-5 lung fibroblast cell line เริ่มต้นที่ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุมในภาชนะเลี้ยง 96-well plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/Ham's F-12 และ DMEM complete medium ตามลำดับ บ่มเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นเซลล์ทั้งสองชนิดได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาวิเคราะห์ความเป็นพิษของลูทีโอลินโดยเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำผลึกสี

ม่วงของ formazan มาละลายด้วย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในที่มืด แล้วนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยน MTT โดยอาศัย mitochondrial reductase enzymes มารีดิวซ์ nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) ให้ไปเป็น nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) จึงเกิดเป็นผลึกของ formazan ขึ้น (รูปที่ 6)



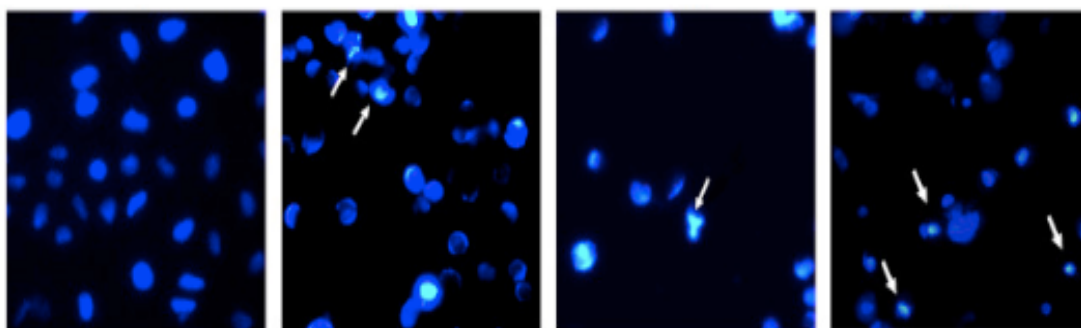
รูปที่ 6 ปฏิกริยาการเกิดผลึก formazan เมื่อด้วยวิธี MTT (Sukhramani P.S. *et al.*, 2011)

3.2.3 การทดสอบผลของลูทีโอลินต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยการย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33342

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human adenocarcinoma epithelial A549 cell line เริ่มต้นที่ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใน 24 well plate ที่มีอาหาร DMEM/Ham's F-12 complete medium บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์เพาะเลี้ยงจะได้รับลูทีโอลินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 2-3 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วย Hoechst 33342 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่ม 30 นาที ในที่มีดบน mini rocker-shaker เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBS pH 7.4 แล้วนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 20x ที่ความยาวคลื่นแสง 460-490 นาโนเมตร แบบสุ่ม 5 field แล้วนำมานับจำนวนเซลล์ทั้งหมดและจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis การคำนวณการตายแบบ apoptosis (%) ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{Apoptosis cells (\%)} = (\text{total apoptosis cells} / \text{total cells}) \times 100$$

โดยสี Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bibenzimidazole) สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วไปจับกับบริเวณร่องเล็ก (minor groove) ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ระหว่างเบสอะดีนีน (adenine) และเบสไทมีน (thymine) ซึ่งเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จะเห็นเป็นสีฟ้าของ Hoechst 33342 สว่างขึ้น (รูปที่ 7) เนื่องจากเกิดการหดตัวของโครมาตินแน่นลง (chromatin condensation) เกิดการหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า pyknotic nuclei และการแยกสลายของเซลล์เป็นรูปแบบที่เรียกว่า apoptotic body ทำให้เกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์โดยเยื่อหุ้มเซลล์จะหดแฟบลง (ปกป้อง ประยงค์ และคณะ, 2550)

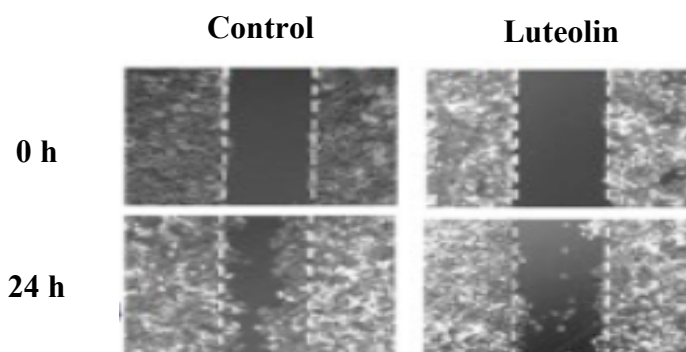


รูปที่ 7 การตายแบบ apoptosis (ลูกศรสีขาว) ที่ย้อมด้วย Hoechst 33342

(Meng G. *et al.*, 2016)

3.2.4 การทดสอบผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ด้วยวิธี scratch wound healing

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human adenocarcinoma epithelial A549 cell line เริ่มต้นที่ 7.5×10^5 เซลล์ต่อหลุมในภาชนะเลี้ยง 24 well plate ที่มีอาหาร DMEM/Ham's F-12 complete medium บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เจริญเต็มภาชนะเลี้ยงแล้วทำให้เกิดรอยแผลโดยใช้ sterile pipette tip ขนาด 200 ไมโครลิตรขีดบริเวณก้นหลุมให้เป็นเส้นตรงตามแนวตั้ง (รูปที่ 8) จากนั้นล้างเศษเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 และเติม DMEM/Ham's F-12 complete medium ที่มี FBS 1% และลูทีโอลินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแบบ bright field ที่กำลังขยาย 10x แบบสุ่ม 6 field ต่อจากนั้นนำไปวิเคราะห์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น Java 1.8.0_112 64 bit



รูปที่ 8 การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี Scratch wound healing
(Meng G. *et al.*, 2016)

3.2.5 การทดสอบผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ (cell invasion) ด้วยวิธี transwell invasion assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human adenocarcinoma epithelial A549 cell line เริ่มต้นที่ 5×10^4 บน transwell ที่มีโพลีคาร์บอเนตเมมเบรนขนาด 8 ไมโครเมตร coat ด้วย matrigel ที่มีอาหาร DMEM/Ham's F-12 incomplete medium เซลล์เพาะเลี้ยงจะได้รับลูทีโอลินความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูการแพร่กระจายของเซลล์ลงสู่ชั้นล่างของ chamber เมื่อครบเวลาใช้ cotton swab เอาเซลล์ที่ไม่เกิดการแพร่กระจายออก และนำเซลล์ที่ผ่านเมมเบรนมา fix ด้วยพาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4% เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้อมด้วยสี Hoechst 33342 เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่แพร่กระจายผ่านเมมเบรนเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 20x แบบสุ่ม 5 field

3.2.6 การทดสอบผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการสร้าง filopodia โดยการย้อมด้วย rhodamine phalloidin

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human adenocarcinoma epithelial A549 cell line เริ่มต้นที่ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุมในภาชนะเลี้ยง 24 well plate ที่มีอาหาร DMEM/Ham's F-12 complete medium บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเซลล์เพาะเลี้ยงจะได้รับลูทีโอลินความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 2-3 ครั้ง แล้ว fix ด้วยพาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4% เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (permeabilized) โดยเติม 0.1% Triton-X100 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาจะล้างด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 2-3 ครั้ง แล้ว blocked ด้วย bovine serum albumin (BSA) 0.2% เป็นเวลา 1 ชั่วโมงบน mini rocker-shaker ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม

rhodamine phalloidin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 40x แบบสุ่ม 5 field

โดย phalloidin จะเข้าสู่เซลล์ไปจับอย่างจำเพาะกับ actin polymerization แต่ละยูนิทและป้องกันการเกิด filament depolymerization ของ filamentous actin (F-actin) ส่วน rhodamine เป็นสีย้อมเรืองแสงในช่วงสีส้มแดงมีโครงสร้างวงนอกเป็น isothiocyanate ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ succinimidyl-ester ของโปรตีนภายในเซลล์ทำให้สามารถติดตามการทดลองได้โดยวัดปริมาณของ microfilament ที่เกิดขึ้นได้

3.2.7 การทดสอบผลของลูทีโอลินต่อการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42, RhoA, pFAK, FAK, pSrc และ Src ด้วยวิธี western blot

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human adenocarcinoma epithelial A549 cell line เริ่มต้นที่ 5×10^6 เซลล์ใน plate ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร DMEM/Ham's F-12 complete medium บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงจะได้รับลูทีโอลินความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย PBS pH 7.4 และนำไปปั่นล้างเซลล์ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม RIPA buffer (lysis reagent) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเข้า homogenizer 15 วินาทีและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 14000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำโปรตีนมาใช้ นำโปรตีนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford reagent และใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน และนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader ต่อจากนั้นนำโปรตีนที่ได้ 75 ไมโครกรัม มาไหลลง 8-10% โพลีอะคริลาไมด์เจล แยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนมา blocked ด้วย 3% BSA บน mini rocker-shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม primary antibody (1:1000) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บน mini rocker-shaker เมื่อครบเวลานำเมมเบรนมาล้างด้วย 1x tris buffer saline-1% tween (TBST) และเติม secondary antibody (1:5000) ใน 3% BSA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน mini rocker-shaker จากนั้นล้างด้วย 1x TBST จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำเมมเบรนไปประกบแผ่นฟิล์มในที่มืดโดยใช้ chemiluminescence reagents และวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีน โดยใช้โปรแกรม ImageJ รุ่น Java 1.8.0_112 64 bit

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean; S.E.M.) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มของการทดลองโดยใช้ one-way ANOVA test วิเคราะห์สถิติทดสอบคือ post-hoc test (Tukey) ซึ่งพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics รุ่น 23

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลของลูทีโอลินต่อความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด human adenocarcinoma epithelial A549 cell line และเซลล์ปกติ human MRC-5 lung fibroblast cell line

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของลูทีโอลินต่อเซลล์เพาะเลี้ยง A549 และ MRC-5 ด้วยวิธี MTT assay โดยเซลล์ทั้ง 2 ชนิด จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 5-50 ไมโครโมลาร์ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 101.05 ± 5.92 , 92.97 ± 1.50 , 91.53 ± 2.21 , 86.91 ± 4.52 และ $85.49 \pm 1.37\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยทำให้เซลล์มีชีวิตรอดร้อยละ 48.85 ± 0.18 (รูปที่ 9A) ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของลูทีโอลินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (the half maximal inhibitory concentration; IC₅₀) ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 78.86 ไมโครโมลาร์ ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษของลูทีโอลินต่อเซลล์ปกติ MRC-5 พบว่า ลูทีโอลินที่ทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยทำให้เซลล์มีชีวิตรอดร้อยละ 102.03 ± 6.86 , 99.23 ± 8.69 , 97.82 ± 6.26 , 97.48 ± 4.23 , 97.68 ± 4.29 และ 94.17 ± 2.51 ตามลำดับ (รูปที่ 9A) จากการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าลูทีโอลินมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด โดยไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ปกติ

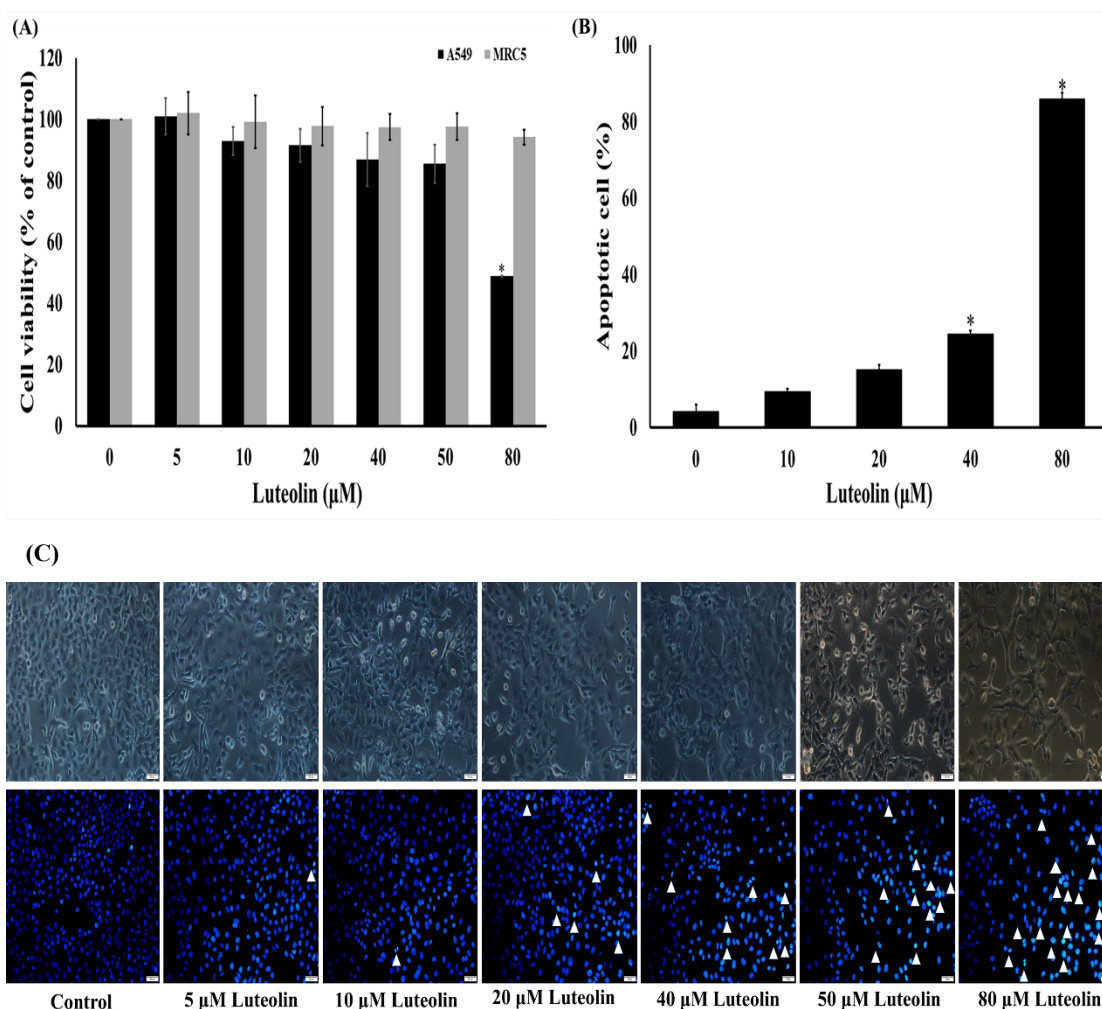
4.2 ผลของลูทีโอลินต่อรูปแบบการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 แบบ apoptosis

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอด A549 หลังได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 5-80 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากปกติ ซึ่งปกติเซลล์จะมีลักษณะเป็นเหลี่ยมหลายเหลี่ยม (epithelium-like morphology) มีการยึดเกาะติดบนผิวภาชนะและเซลล์ข้างเคียง (control; รูปที่ 9C) โดยเมื่อได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40-80 ไมโครโมลาร์ เซลล์จะมีลักษณะที่หดสั้นลง ผิวเซลล์มีการโป่งพอง ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน เสียสภาพการยึดเกาะและลอยตัวขึ้นมาจากอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 9C) เมื่อทำการศึกษาโดยการย้อมด้วย Hoechst 33342 เพื่อศึกษารูปแบบการตายแบบ apoptosis พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม นิวเคลียสมีลักษณะกลม และไม่มีการ

แตกหักของดีเอ็นเอภายในนิวเคลียส (รูปที่ 9C) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40-80 ไมโครโมลาร์ พบลักษณะการรวมตัวกันของโครมาตินและดีดีสีฟ้าสว่างจากการย้อม Hoechst 33342 (รูปที่ 9C) และเมื่อนำผลของลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 ไมโครโมลาร์ มาวิเคราะห์ร้อยละการตายแบบ apoptosis พบว่าเซลล์มะเร็งปอด A549 ที่ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40-80 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีร้อยละการตายแบบ apoptosis เท่ากับ 24.44 ± 0.99 และ 85.96 ± 1.59 ที่ความเข้มข้น 40 และ 80 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 9C) ซึ่งจากการทดลองนี้จึงเลือกลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ไปใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

4.3 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดด้วยวิธี scratch wound healing

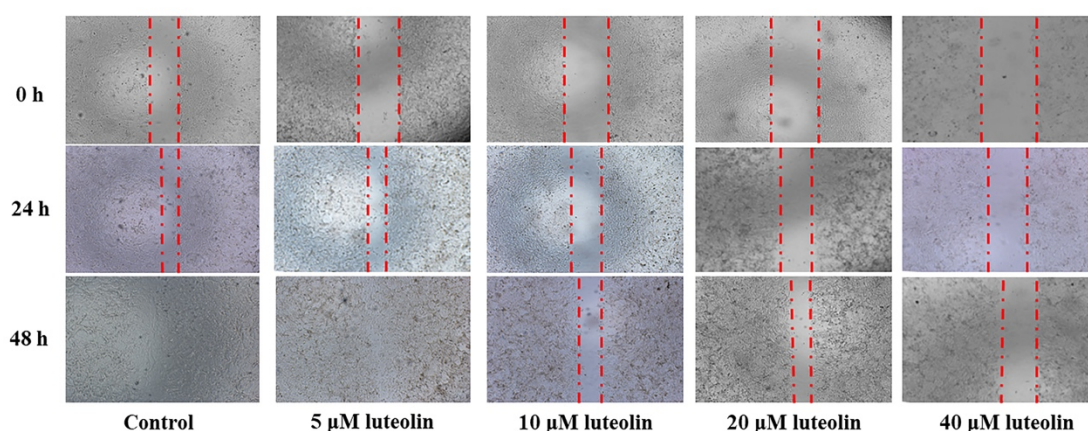
ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) มะเร็งปอด ด้วยวิธี scratch wound healing โดยเซลล์มะเร็งปอด A549 จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำเซลล์ไปถ่ายรูปที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับลูทีโอลิน นำผลที่ได้มาคำนวณพื้นที่ปิดของรอยบาดแผล (wound area) ผลการทดลองพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ปิดบริเวณที่ทำให้เกิดรอยแผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีร้อยละพื้นที่รอยแผล 63.10 ± 14.15 และ 71.69 ± 10.14 ตามลำดับ เมื่อได้รับลูทีโอลินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 10A และ 10B) จากการทดลองนี้ชี้ว่าลูทีโอลินมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549



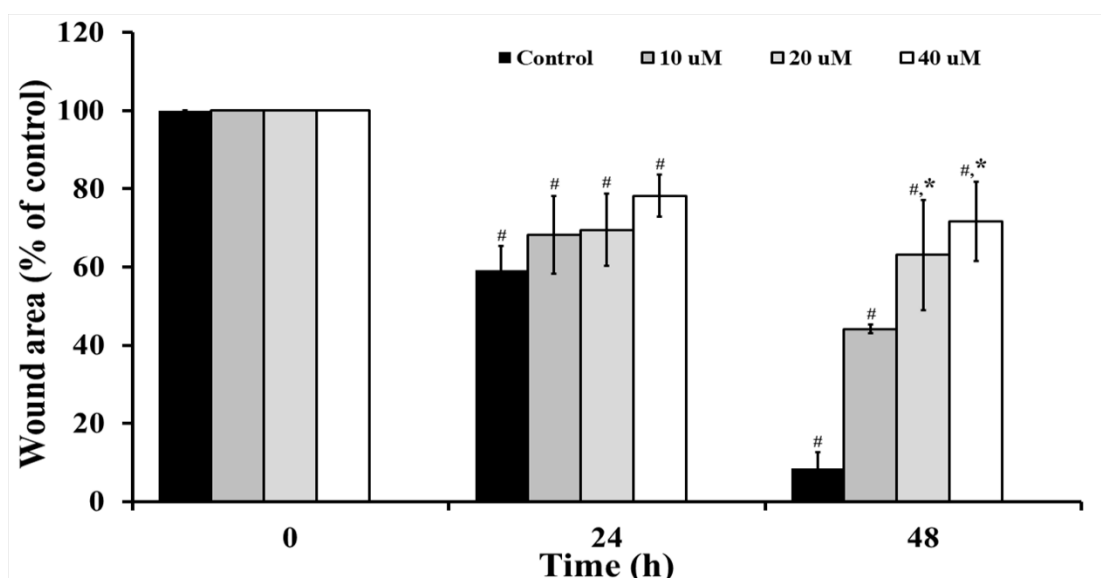
รูปที่ 9 ผลของลูทีโอลินต่อการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง A549 และ MRC-5 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT (A) ร้อยละการตายแบบ apoptosis จากการย้อมด้วย Hoechst 33342 (B) การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอด A549 และรูปแบบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งปอด A549 เมื่อย้อมด้วย Hoechst 33342 (C) โดยเซลล์จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ($n=4$), ทุกภาพถ่ายที่กึ่งกลางเลนส์วัตถุ 20 เท่า และ scale bar คือ 100 ไมโครเมตร

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

(A)



(B)



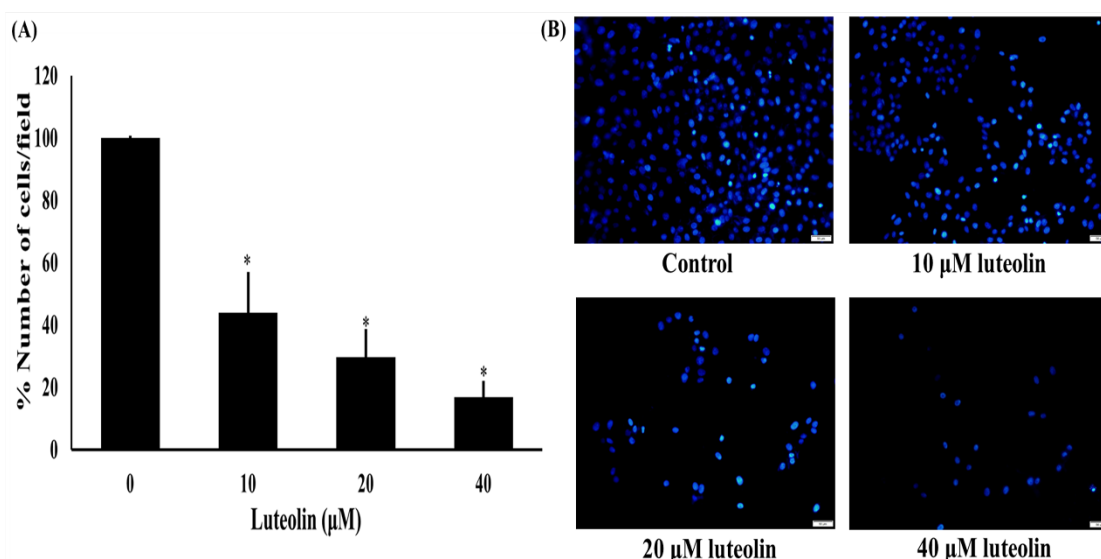
รูปที่ 10 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี scratch wound healing assay ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 10x, scale bar : 200 ไมโครเมตร (A) กราฟแสดงร้อยละพื้นที่รอยแผล (% wound area) โดยเซลล์จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง (B) ข้อมูลกราฟแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบเวลา 0 ชั่วโมง

4.4 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ (cell invasion) ด้วยวิธี transwell invasion assay

การวิเคราะห์ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแพร่กระจาย (cell invasion) ของเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยวิธี transwell invasion assay โดยเซลล์มะเร็งปอด A549 จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด A549 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 11A และ 11B) โดยผลที่เกิดขึ้นขึ้นกับขนาดของลูทีโอลินที่ได้รับ โดยร้อยละจำนวนเซลล์ที่เกิดการแพร่กระจาย เท่ากับ 43.86 ± 12.50 , 29.66 ± 8.40 และ 16.91 ± 4.39 เมื่อได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

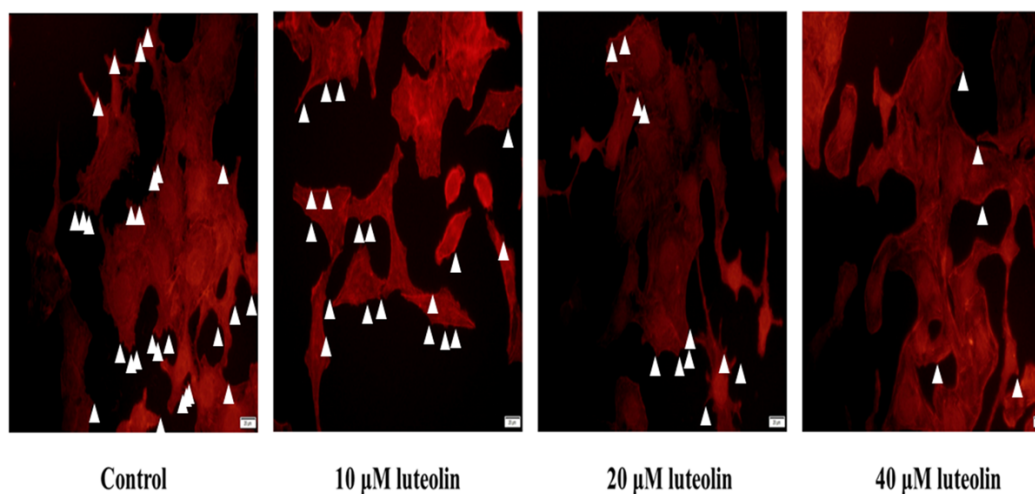


รูปที่ 11 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ (cell invasion) ด้วยวิธี transwell invasion assay ร้อยละจำนวนเซลล์ที่เกิดการแพร่กระจาย (A) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 20x เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342, scale bar : 100 ไมโครเมตร โดยเซลล์ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) ข้อมูลกราฟแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

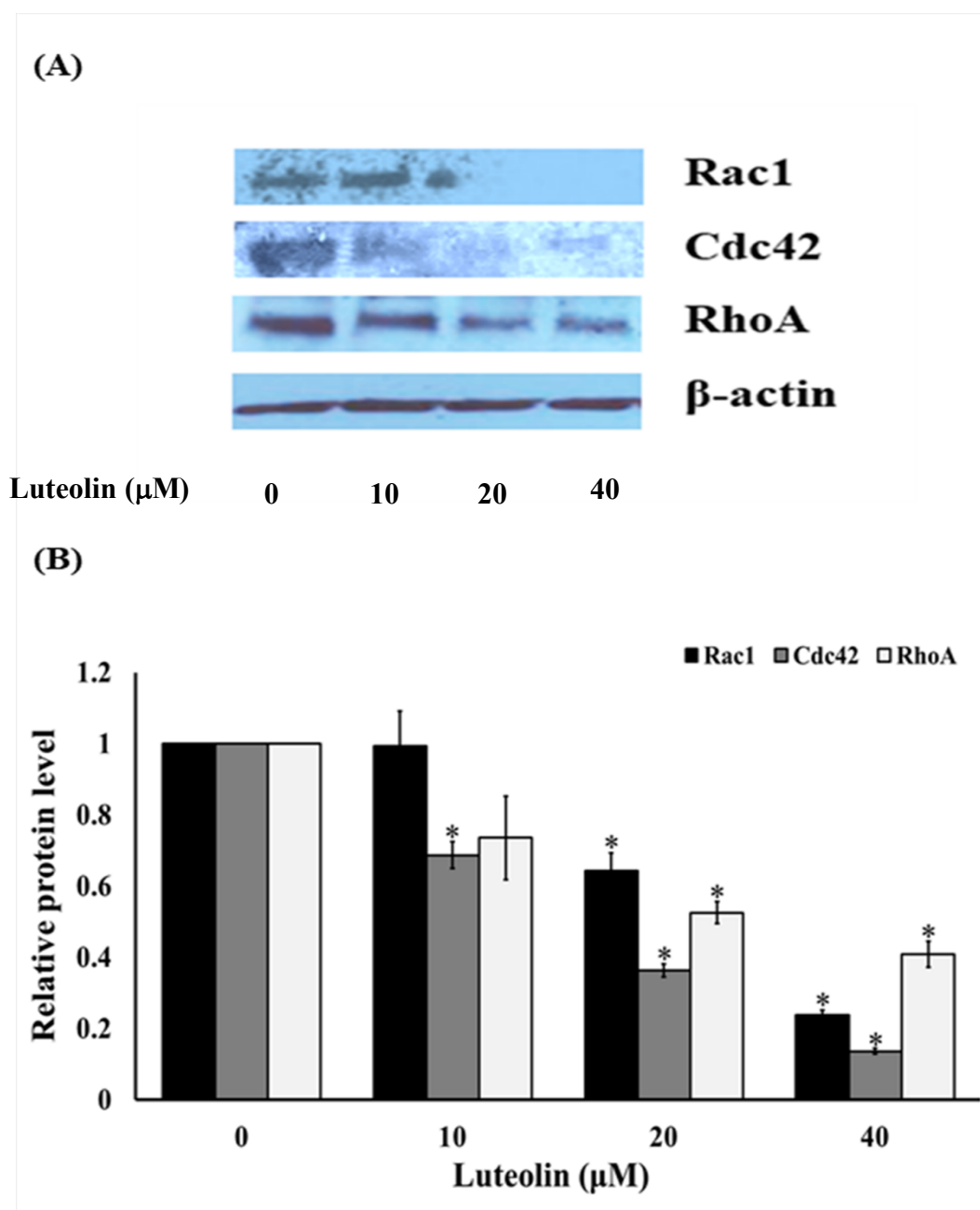
* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.5 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการสร้าง filopodia และการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการสร้าง filopodia ของเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ phalloidin rhodamine ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าจำนวนของ filopodia ลดลงเมื่อความเข้มข้นของลูทีโอลินเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 12) เนื่องจากการสร้าง filopodia และกระบวนการ protrusions รวมทั้งการเกิด actin polymerization และ cytoskeletal rearrangement เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุลภายในเซลล์ผ่านการกระตุ้นของ Rac1, Cdc42 และ RhoA ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA ผลการทดลองพบว่า ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ส่งผลลดการแสดงออกของโปรตีน Rac1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน Rac1 เป็น 0.64 ± 0.04 และ 0.24 ± 0.01 ตามลำดับ (รูปที่ 13A และ 13B) นอกจากนี้ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Cdc42 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน Cdc42 เป็น 0.68 ± 0.03 , 0.36 ± 0.02 และ 0.14 ± 0.01 ตามลำดับ (รูปที่ 13A และ 13B) นอกจากนี้ลูทีโอลินยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Rac1 และ Cdc42 แล้ว ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ยังมีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน RhoA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีผลลดการแสดงออกของโปรตีนเป็น 0.52 ± 0.03 และ 0.41 ± 0.03 ตามลำดับ (รูปที่ 13A และ 13B)



รูปที่ 12 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการสร้าง filopodia ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 โดยการย้อมด้วย rhodamine phalloidin หลังจากที่เซลล์ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 40x, scale bar : 50 ไมโครเมตร



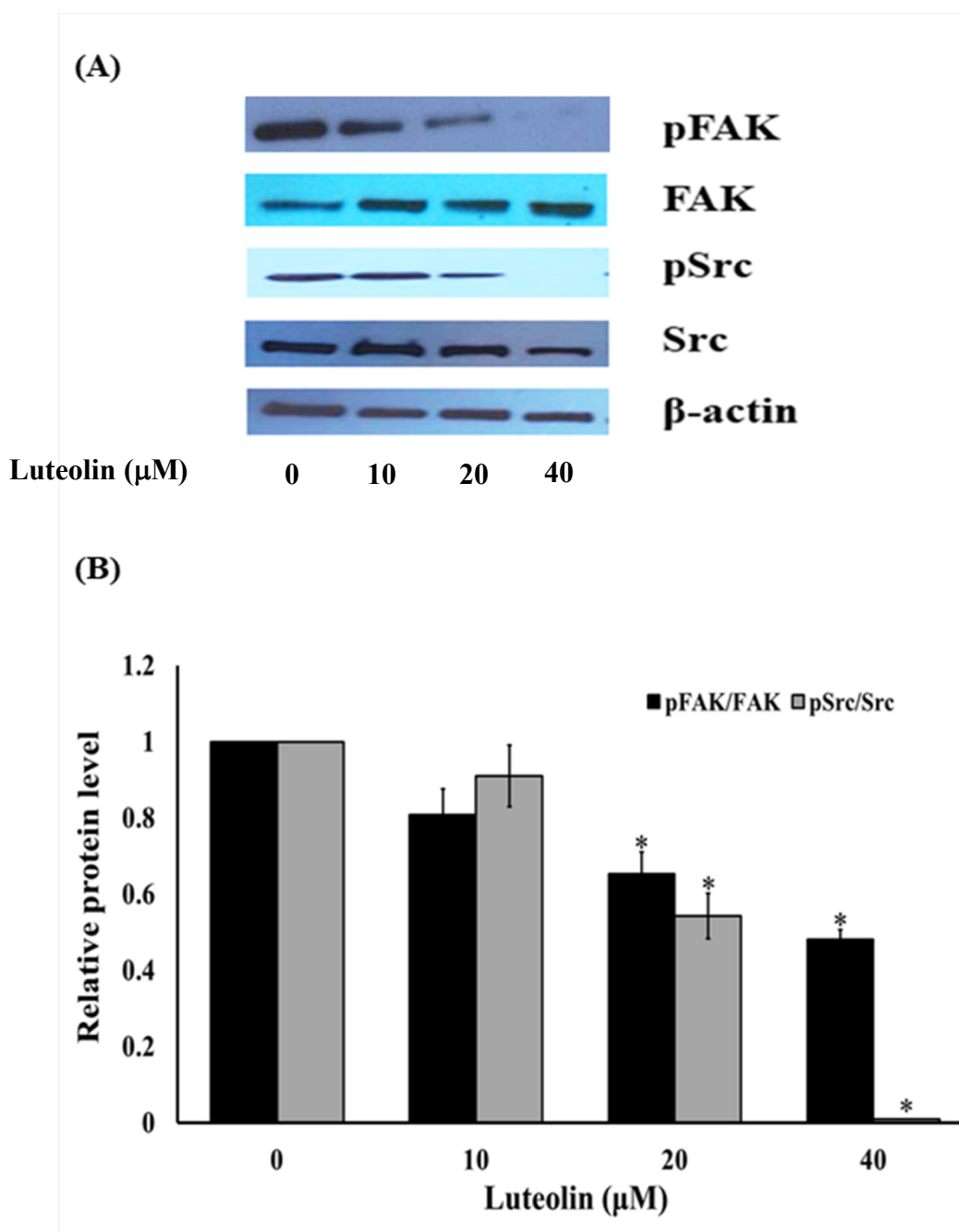
รูปที่ 13 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแสดงออกของของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA การแสดงออกเชิงคุณภาพของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA โดยวิธี Western blot (A) กราฟแสดงออกเชิงปริมาณของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 ซึ่งเซลล์จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ($n=4$)

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.6 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน FAK และ Src

FAK และ Src มีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดและมีบทบาทต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดย FAK และ Src เป็นตัวควบคุมตัวแรกที่มีผลต่อการทำงานของการทำงานของเซลล์ถ่ายหมู่ฟอสเฟตไอออนในการกระตุ้นสัญญาณอื่น ๆ ภายในเซลล์ เช่น actin cytoskeleton remodeling และ cell motility ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน FAK และ Src ผลการทดลองพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน pFAK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดการแสดงออกของโปรตีน pFAK เป็น 0.66 ± 0.06 และ 0.52 ± 0.03 ตามลำดับ โดยที่ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน FAK (รูปที่ 14A และ 14B)

นอกจากนี้พบว่าลูทีโอลินมีผลยับยั้งการแสดงออกของ pSrc ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดการแสดงออกของโปรตีน pSrc เป็น 0.57 ± 0.06 และ 0.01 ± 0.00 ตามลำดับ โดยที่ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Src (รูปที่ 14A และ 14B)



รูปที่ 14 ผลของลูทีโอลินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน FAK และ Src การแสดงออกเชิงคุณภาพของโปรตีน FAK และ Src ด้วยวิธี Western blot (A) กราฟแสดงออกเชิงปริมาณของ pFAK/FAK และ pSrc/Src ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 ซึ่งเซลล์จะได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

มะเร็งปอดถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งจากสาเหตุการตายในโรคมะเร็งทั่วโลก (Li-Na Z. *et al.*, 2017) เช่นเดียวกับในประเทศไทยที่มะเร็งปอดเป็นโรคมะเร็งที่พบมากและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ทั้งในเพศชายและเพศหญิง มะเร็งปอดเกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งจะตรวจพบได้เมื่อมีขนาดใหญ่ มีจำนวนมาก และแพร่ไปตามบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย มะเร็งปอดจะทำลายชีวิตของผู้ป่วยได้รวดเร็วขึ้นอยู่กับชนิดของมะเร็ง มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (non-small cell lung cancer) พบได้ประมาณ 85-90% โดยพบได้บ่อยกว่ามะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก แต่จะแพร่กระจายได้ช้ากว่าและสามารถรักษาให้หายได้โดยการผ่าตัด ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด ในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนายาที่ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสหรือการศึกษาทางภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) และการรักษาด้วยการให้ยาเคมีบำบัดถือเป็นการรักษาที่นิยมในผู้ป่วยมะเร็งปอดในขั้นแรกของการรักษา ทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอดได้นานขึ้นถึง 6 เดือนหรืออาจจะมากกว่าทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะของโรค ซึ่งการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดให้ผลตอบสนองในการรักษาแค่ 30% เท่านั้น โดยถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อใช้ร่วมกับวิธีผ่าตัด แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยยังคงมีชีวิตที่ทุกข์ทรมานจากผลข้างเคียงของวิธีรักษาและอาการที่กำเริบบ่อย ๆ ดังนั้นความก้าวหน้าทางการแพทย์สมัยใหม่ต้องการพัฒนายาใหม่ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ รวมทั้งมีผลข้างเคียงที่ต่ำลงและประสิทธิภาพที่ดีขึ้น เพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นตามมา

การศึกษาที่ผ่านมาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ เช่น flavones, flavanones, anthocyanidins, flavonols, isoflavones และ catechins เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติประกอบไปด้วยสารโพลีฟีนอลเป็นส่วนใหญ่พบได้ในพืชผักและผลไม้หลายชนิด และสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์เหล่านี้มีการศึกษาว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองและหลอดทดลอง (Kocic B. *et al.*, 2013 and Athira K.V. *et al.*, 2016) โดยเฉพาะลูทีโอลินซึ่งเป็นสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ที่พบในธรรมชาติทั้งในผักและผลไม้ พบว่าลูทีโอลินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kim H.J. *et al.*, 2014) ต้านอนุมูลอิสระ (Zhang T. *et al.*, 2014) ป้องกันระบบหัวใจและหลอดเลือด (Nai C. *et al.*, 2015) นอกจากนี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในโมเดลการทดลองที่หลากหลาย เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งสมอง และมะเร็งต่อมลูกหมาก (Meng G. *et al.*, 2016) นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านแสดงให้เห็นถึง

ประสิทธิภาพของลูทีโอลินในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Pandurangan A.K. *et al.*, 2013; Lin P. *et al.*, 2015 and Attoub S. *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดยังไม่ชัดเจน การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลินในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

จากการทดลองความเป็นพิษของลูทีโอลินต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 และเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ MRC-5 โดยเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 50 และ 80 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้นที่ 5-50 ไมโครโมลาร์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 ในขณะที่ลูทีโอลินที่ทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ MRC-5 เกิดความเป็นพิษ จึงสรุปได้ว่าลูทีโอลินมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่าความเข้มข้นของ ลูทีโอลินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง 50% อยู่ประมาณ 80 ไมโครโมลาร์ เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Ping C. *et al.*, 2017 and Pu Y. *et al.*, 2018)

Apoptosis เป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่มีแบบแผน (programmed cell death) เป็นกระบวนการตายของเซลล์ที่เหมาะสมกับการรักษาโรคมะเร็ง (Fuchs Y. and Steller H., 2011) apoptosis เป็นลักษณะการตายของเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (cell morphology) และสารชีวเคมีที่สำคัญแตกต่างกัน ประกอบด้วยลักษณะเซลล์ที่กลมมากขึ้น โครมาตินรวมตัวกันแน่นขึ้น การแตกหักของสาย DNA ปริมาณเซลล์ลดลง เซลล์แตกออกเป็น apoptotic body และเยื่อหุ้มเซลล์พองเป็นถุง และถูกควบคุมโดยสารชีวเคมีที่มีผลให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด (Arya R. *et al.*, 2007 and Peng W. *et al.*, 2015) จากผลการศึกษาภายใต้ phase-contrast แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอด A549 ในกลุ่มที่ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40-80 ไมโครโมลาร์ พบว่าเซลล์มีลักษณะกลมขอบเซลล์ไม่เรียบ เซลล์มีลักษณะหดสั้นลง ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน ทั้งนี้ลักษณะดังกล่าวไม่ปรากฏในเซลล์มะเร็งปอดกลุ่มที่ไม่ได้รับลูทีโอลิน นอกจากนี้การย้อมด้วย Hoechst 33342 เพื่อวิเคราะห์การตายแบบ apoptosis ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์มะเร็งปอด A549 ที่ได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40-80 ไมโครโมลาร์ มีนิวเคลียสติดสีฟ้าสว่างและพบการแตกหักของดีเอ็นเอภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pu Y. และคณะ พบว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร MKN45 และ BGC823 ที่ได้รับลูทีโอลินพบลักษณะโครมาตินรวมตัวกันแน่นและการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (Pu Y. *et al.*, 2018) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Meng G. และคณะ พบว่าลูทีโอลินชักนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็ง A549 และ BEAS-2B โดย

ตรวจพบลักษณะการแตกหักของสายดีเอ็นเอและโครมาตินรวมตัวกันแน่น (Meng G. *et al.*, 2016)

การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งไปยังเซลล์ข้างเคียงรอบ ๆ (Yamaguchi H. *et al.*, 2005) ในเซลล์ปกติการเคลื่อนที่ของเซลล์มีความสำคัญต่อการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อและการพัฒนาในระบบต่าง ๆ ของร่างกายในการพัฒนาของทารกและยังเกี่ยวข้องต่อการเกิดเซลล์ใหม่ที่เพิ่มจำนวนอย่างมากผิดปกติของเซลล์มะเร็ง (Thiery J.P. *et al.*, 2009) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลูทีโอลินมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (Park S.H. *et al.*, 2013 and Sui J. Q. *et al.*, 2016) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Tsai P.H. *et al.*, 2016) มะเร็งช่องปาก (Chian S. *et al.*, 2014) มะเร็งปากมดลูก (Lin T.H. *et al.*, 2017) มะเร็งรังไข่ (Dia V.P. and Pangloli P., 2017) มะเร็งตับ (Lee W.J. *et al.*, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในครั้งใหม่ที่พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Actin และ microtubule cytoskeleton มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่น ๆ เช่น cell adhesion, cell cycle progression, angiogenesis และ cell motility (Voura E.B. *et al.*, 1998 and Hall A., 2009) เซลล์มะเร็งจะเพิ่มการเกิด cytoskeleton remodeling เพื่อส่งเสริมให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งในปัจจุบันมียาเคมีบำบัดกลุ่ม taxanes ที่มีใช้ในทางคลินิกเพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยออกฤทธิ์รบกวน microtubule dynamics (Kuppens I.E., 2006) การพัฒนายาที่สามารถรบกวนหรือเปลี่ยนแปลง F-actin cytoskeleton โดยไปมีผลรบกวนการทำหน้าที่ทั้งในระดับ upstream และ/หรือ downstream effectors น่าจะมีบทบาทสำคัญในการเป็นเป้าหมายที่สำคัญของการรักษามะเร็ง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของ cell morphology ยังเกี่ยวข้องกับ F-actin cytoskeleton ซึ่งในกระบวนการ F-actin organization ระหว่างการเกิด cell motility จะเกี่ยวข้องกับการสร้าง filopodia และ lamellipodia (Hall A., 1998; Le C.C.; Carlier M.F., 2008 and Hall A., 2009) การศึกษาในครั้งนี้อีกพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการสร้าง filopodia และ lamellipodia ซึ่งการยับยั้งการสร้าง filopodia และ lamellipodia จะสัมพันธ์กับการลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Arjonen A. *et al.*, 2011 and Ntantie E. *et al.*, 2017) การสร้าง filopodia และ lamellipodia ถูกควบคุมโดยการทำงานของโปรตีนหลายตัว

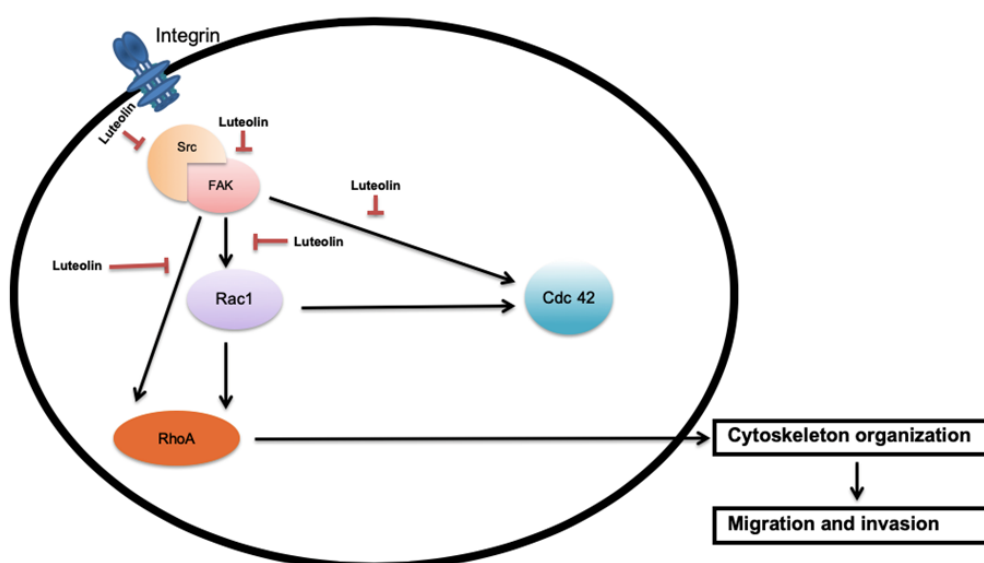
เช่น โปรตีนในกลุ่ม Rho GTPases เช่น Rac1 Cdc42 และ RhoA (Sadok A. and Marshall C.J., 2014) การศึกษาครั้งนี้พบว่าลูทีโอลินยับยั้งกระบวนการ F-actin organization อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการลดระดับของ Rho GTPases การศึกษาครั้งนี้พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42 และ RhoA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับลูทีโอลิน ซึ่ง Rho GTPases มีบทบาทที่สำคัญในการสร้าง actin cytoskeleton และเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยกระตุ้นการเกิด polymerization ของ actin ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Small J.V. *et al.*, 2002) การทำงานร่วมกันของ Rac1 Cdc42, และ RhoA จะมีผลกับ mesenchymal transition, cell-cycle progression, migration/invasion, tumor growth, angiogenesis และ oncogenic transformation (Mari'a del and Suranganie D., 2018) นอกจากนี้มีการศึกษายืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน Rac1 และ Cdc42 สูงในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งปอดด้วย จึงทำให้พบการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในระดับ mRNA เรียกปรากฏการณ์แบบนี้ว่า hyperactivated Rac1 และ Cdc42 ทำให้เพิ่มกระบวนการส่งสัญญาณผ่าน oncogenic cell surface receptors มากขึ้น เช่น epidermal growth factor receptor (EGFR), integrin receptor, Syndecan4 receptor และ steroid receptor coactivator (Src) โดย Rac1 ควบคุมกระบวนการ protrusion ของเยื่อหุ้มเซลล์ การสร้าง lamellipodia และ membrane ruffling (Ridley A.J., 2015) Cdc42 ควบคุมการสร้าง filopodia (microspike) formation (Sonja K. *et al.*, 2001) และ RhoA ควบคุมการสร้าง stress fibers ร่วมกับ focal adhesion ทำหน้าที่ในการยึดเกาะของเซลล์ (Ridley A.J., 2006) การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าลูทีโอลินมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวเป็นการยืนยันว่าลูทีโอลินยับยั้งการเกิด actin polymerization จึงยับยั้งการสร้าง lamellipodia, filopodia และ fibers actomyosin contractility ตามลำดับสอดคล้องกับการศึกษายับยั้ง downregulation ในการแสดงออกของโปรตีน Cdc42 ผ่าน PI3K/Akt pathway ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U-87MG และ T98G เมื่อได้รับลูทีโอลินที่ความเข้มข้นเท่ากับ 30 ไมโครโมลาร์ (Wen Y.C. *et al.*, 2013)

Src/FAK signaling เป็นกลไกที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการของ cellular และ cytoskeleton reorganization (Hamaguchi M. *et al.*, 1995) การกระตุ้น FAK ผ่านการแสดงออกของ Rho family GTPases พบว่ามีผลไปกระตุ้น Src มีบทบาทในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การเกาะติด การอยู่รอด และการสร้างหลอดเลือดใหม่ หากเพิ่มการทำงานของ FAK ทำให้เซลล์มะเร็งเพิ่มกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้น มีการรายงานที่ FAK สามารถกระตุ้นให้เกิดการส่งผ่านสัญญาณจากการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนหลายตัว (Sulzmaier F.J. *et al.*, 2014)

เช่นการกระตุ้นการทำงานของกลุ่ม Src-family protein tyrosine kinase เมื่อมีการจับกับโปรตีนกลุ่มนี้ ส่งผลเพิ่มการทำงานของ Src kinase และ FAK kinase เกิดการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งตำแหน่งต่าง ๆ (Ruest P.J. *et al.*, 2000) นอกจากนี้โปรตีน Src ที่อยู่ในโครงสร้างเชิงซ้อนร่วมกับโปรตีน FAK ช่วยให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตในโปรตีนที่เป็น adaptor proteins เช่น Shc, paxillin และ p130Cas โครงสร้างเชิงซ้อนของ FAK-Src complex สามารถนำไปสู่การกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์อย่างต่อเนื่อง (intracellular signaling cascades) (Carretero J. *et al.*, 2010) จากผลการศึกษาที่พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน FAK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน FAK ทั้งหมด นอกจากนี้ลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Src อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Src ทั้งหมดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม human MDA-MB231 breast cancer cells โดยยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน FAK ที่ตำแหน่งไทโรซีน 397 (Hong J. *et al.*, 2018) นอกจากนี้การศึกษาของ Ruan J.S. และคณะก็พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง melanoma B16F10 โดยผ่านการยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน FAK (Ruan J.S. *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ที่ทำการศึกษาในเซลล์ MiaPaCa-2 cells ที่พบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน FAK เมื่อได้รับลูทีโอลินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lee L.T. *et al.*, 2004) นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Byun S. และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของลูทีโอลินในการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง โดยพบว่าลูทีโอลินที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Src อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Byun S. *et al.*, 2010 and Lin Y.C. *et al.*, 2013) จากข้อมูลในการทดลองนี้เป็นไปได้ว่าลูทีโอลินยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยผ่านการลดการกระตุ้น FAK และ Src ส่งผลยับยั้งการกระตุ้นที่ตำแหน่ง downstream effectors อื่น ๆ ต่อไป จึงยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดได้

5.2 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลูทีโอลินทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และสามารถชักนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 เกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ยังส่งผลยับยั้งการสร้าง filopodia และ lamellipodia ยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ Rac1, Cdc42, RhoA, FAK และ Src (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 สรุปกลไกการออกฤทธิ์ของลูทีโอลินในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

รายการเอกสารอ้างอิง

- ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากรู และ สหพัฒน์ บรรตวีรักษ์. 2550. อะพอฟโทซิด: วิธีและการตรวจวัด. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 21(3): 227-238.
- รจนา ศิริศรีโร. 2556. การประยุกต์ใช้เพทสแกนทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งปอด. 285 หน้า. กรุงเทพฯ: บริษัท สยามทองกิจ จำกัด.
- สุพัตรา รักเอียด, ศุกล ภักดีนิตติ, วิษณุ ปานจันทร์, อาคม ชัยวีระวัฒน์ และ วีระวุฒิ อิ่มสำราญ. 2558. แนวทางการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งปอด. 129 หน้า. กรุงเทพฯ: บริษัท โฆสิตการพิมพ์ จำกัด.
- สุรเกียรติ อาชานานุกาพ. 2553. หนังสือตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2. 916 หน้า. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก แพบลิชชิง.
- Alberg A.J., and Samet J.M. 2003. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 123: 21S-49S.
- Anso' E., Zuazo A., Irigoyen M., Urdaci M.C., Rouzaut A. and Martínez-Irujo J.J. 2010. Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 79: 1600-1609.
- Arjonen A., Kaukonen R. and Ivaska J. 2011. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adhesion & Migration*. 5: 421-430.
- Arya R., Mallik M. and Lakhotia S.C. 2007. Heat shock genes-integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*. 32: 595-610.
- Athira K.V., Madhana R.M. and Lahkar M. 2016. Flavonoids, the emerging dietary supplement against cisplatin-induced nephrotoxicity, *Chemico Biological Interactions*. 248: 18-20.

- Attoub S., Hassan A.H., Vanhoecke B., Iratni R., Takahashi T., Gaben A.M., Bracke M., Awad S., John A., Kamalboor H.A., Al M.A., Sultan Arafat K., Gespach C. and Petroianu G. 2011. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 651: 18-25.
- Aviel-Ronen S., Blackhall F.H. and Shepherd F.A. 2006. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clinical Lung Cancer*. 8: 30-38.
- Bai L., Chen W., Wang X., Ju W., Xu S. and Lin Y. 2009. Attenuating Smac mimetic compound 3-induced NF-kappaB activation by luteolin leads to synergistic cytotoxicity in cancer cells. *Cell Biochemistry*. 108: 1125-1131.
- Baolin L., Weiwei W. and Ning T. 2005. Topical application of luteolin inhibits scratching behavior associated with allergic cutaneous reaction in mice. *Planta Medica*. 71: 424-428.
- Byun S., Lee K.W., Jung S.K., Lee E.J., Hwang M.K., Lim S.H., Bode A.M., Lee H.J. and Dong Z. 2010. Luteolin inhibits protein kinase C(epsilon) and c-Src activities and UVB-induced skin cancer. *Cancer Research*. 70: 2415-2423.
- Carretero J., Shimamura T. and Rikova K. 2010. Integrative genomic and proteomic analyses identify targets for Lkb1-deficient metastatic lung tumors. *Cancer Cell*. 17: 547-559.
- Chang J., Hsu Y., Kuo P., Kuo Y., Chiang L. and Lin C. 2005. Increase of Bax/Bcl XL ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. *Life Sciences*. 76: 1883-1893.
- Chen K.C., Chen C.Y., Lin C.R., Yang T.Y., Chen T.H., Wu L.C. and Wu C.C. 2013. Luteolin attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of lung

- cancer cells by interfering in the PI3K/Akt-NF-KB-Snail pathway. *Life Sciences*. 93: 924-933.
- Chian S., Thapa R., Chi Z., Wang X.J. and Tang X. 2014. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 447: 602-608.
- Choi S.M., Kim B.C., Cho Y.H., Choi K.H., Chang J., Park M.S., Kim M.K., Cho K.H. and Kim J.K. 2014. Effects of flavonoid compounds on beta-amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam Medical*. 50: 45-51.
- Dia V.P. and Pangloli P. 2017. Epithelial-to-mesenchymal transition in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells is downregulated by luteolin. *Journal of Cellular Physiology*. 232: 391-401.
- Doll R. and Peto R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. 66: 1191-1308.
- Dy G.K., Ylagan L., Pokharel S., Miller A., Brese E., Bshara W., Morrison C., Cance W.G. and Golubovskaya V.M. 2014. The prognostic significance of focal adhesion kinase (FAK) expression in stage I non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 9: 1278-1284.
- Frank V., Fossella Joe B. and Ritsuko K. 2003. Lung cancer. Vol 1. New York: Springer.
- Fuchs Y. and Steller H. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 147: 742-58.
- Galvez J., de la Cruz J.P., Zarzuelo A. and Sanchez de la Cuesta F. 1995. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology*. 51: 27-33.

Gately K. 2013. Lung cancer a comprehensive overview. Nova Science. 309 p.

Goldstraw P., Crowley J., Chansky K., Giroux D.J., Groome P.A. and Rami-Porta R. 2007. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Thoracic Oncology*. 11: 39-51.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279: 509-514.

Hall A. 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 28: 5-14.

Hamaguchi M., Yamagata S., Thant A.A., Xiao H., Iwata H., Mazaki T. and Hanafusa H. 1995. Augmentation of metalloproteinase (gelatinase) activity secreted from Rous sarcoma virus-infected cells correlates with transforming activity of Src. *Oncogene*. 10: 1037-1043.

Hanahan D. and Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674.

Herbst R.S., Heymach J.V. and Lippman S.M. 2008. Lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 359: 1367-1380.

Hong H., Kohli K., Trivedi A., Johnson D.L. and Stallcup M.R. 1996. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 93: 4948-4952.

Hong J., Fristiohady A., Nguyen C.H., Milovanovic D., Huttary N., Krieger S., Hong J., Geleff S., Birner P., Jäger W., Özmen A., Krenn L. and Krupitza G. 2018. Apigenin and luteolin attenuate the breaching of MDA-MB231 breast cancer spheroids

through the lymph endothelial barrier in vitro. *Frontiers in Pharmacology*. 220: 1-10.

Horva'thova' K., Novotny' L. and Vacháalkova' A. 2003. The free radical scavenging activity of four flavonoids determined by the comet assay. *Neoplasma*. 50: 291-295.

Horva'thova' K., Novotny' L., To'thova' D. and Vacháalkova' A. 2004. Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H₂O₂-treated human ML cells K562. *Neoplasma*. 51: 395-399.

Hu L.W., Yen J.H., Shen Y.T., Wu K.Y. and Wu M.J. 2014. Luteolin modulates 6-hydroxydopamine-induced transcriptional changes of stress response pathways in PC12 cells. *Public Library of Science*. 9: e97880.

Jakopovic M., Thomas A., Balasubramaniam S., Schrupp D., Giaccone G. and Bates SE. 2013. Targeting the epigenome in lung cancer: expanding approaches to epigenetic therapy. *Frontiers in Oncology*. 261: 1-12.

Jiemin M., Zhaohui Z.M. and Ahmedin J.D. 2014. Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. 64: 9-29.

Ju W., Wang X., Shi H., Chen W., Belinsky S.A. and Lin Y. 2007. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 71: 1381-1388.

Kim H.J., Lee W. and Yun J.M. 2014. Luteolin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production and its epigenetic mechanism in human monocytes. *Phytotherapy Research*. 28: 1383-1391.

- Kocic B., Kitic D. and Brankovic S. 2013. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer risk: evidence from human population studies. *Journal of BUON*. 18: 34-43.
- Kotanidou A., Xagorari A., Bagli E., Kitsanta P., Fotsis T. and Papapetropoulos A. 2002. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 165: 818-823.
- Kuppens I.E. 2006. Current state of the art of new tubulin inhibitors in the clinic. *Current Clinical Pharmacology*. 1: 57-70.
- Kushner P.J., Agard D.A., Greene G.L., Scanlan T.S., Shiau A.K., Uht R.M. and Webb P. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 74: 311-317.
- Le C.C. and Carlier M.F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews*. 88: 489-513.
- Lee H.J., Wang C.J., Kuo H.C., Chou F.P., Jean L.F. and Tseng T.H. 2005. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 124-131.
- Lee L.T., Huang Y.T., Hwang J.J., Lee A.Y., Ke F.C., Huang C.J., Kandaswami C., Lee P.P. and Lee M.T. 2004. Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 67: 2103-2014.
- Lee W.J., Wu L.F., Chen W.K., Wang C.J. and Tseng T.H. 2006. Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion

involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 123-133.

Leung H.W., Kuo C.L., Yang W.H., Lin C.H. and Lee H.Z. 2006. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 534: 12-18.

Leung H.W., Wu C.H., Lin C.H. and Lee H.Z. 2005. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 508: 77-83.

Lim D.Y., Jeong Y., Tyner A.L. and Park J.H. 2007. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 292: 66-75.

Lin P., Tian X.H., Yi Y.S., Jiang W.S., Zhou Y.J. and Cheng W.J. 2015. Luteolin-induced protection of H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway. *Molecular Medicine Reports*. 12: 7699-7704.

Lin T.H., Hsu W.H., Tsai P.H., Huang Y.T., Lin C.W., Chen K.C., Tsai I.H. Kandaswami C.C., Huang C.J., Chang G.D., Lee M.T., Cheng C.H. 2017. Dietary flavonoids, luteolin and quercetin, inhibit invasion of cervical cancer by reduction of UBE2S through epithelial-mesenchymal transition signaling. *Food & Function*. 8: 1558-1568.

Lin Y.C., Tsai P.H., Lin C.Y., Cheng C.H., Lin T.H., Lee K.P., Huang K.Y., Chen S.H., Hwang J.J., Kandaswami C.C. and Lee M.T. 2013. Impact of flavonoids on matrix metalloproteinase secretion and invadopodia formation in highly invasive A431-III cancer cells. *PLoS One*. 8: e71903.

- Lin Y., Shi R., Wang X. and Shen H.-M. 2009. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*. 8: 34-46.
- Li-Na Z., Shi-Cheng L., Xue-Ying L., Hong G. and Hong-Mei L. 2017. Identification of differential protein-coding gene expressions in early phase lung adenocarcinoma. *Thoracic Cancer*. 9: 234-240.
- Lo'pez-La'zaro M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 9: 31-59.
- Ma Q., Cavallin L.E., Yan B., Zhu S., Duran E.M., Wang H., Hale L.P., Dong C., Cesarman E. and Mesri E.A. 2009. Antitumorigenesis of antioxidants in a transgenic Rac1 model of Kaposi's sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106: 8683-8688.
- Mari'a del M.M. and Suranganie D. 2018. Targeting Rac and Cdc42 GTPases in Cancer. *Cancer Research*. 78: 1-11.
- Martelli M., Sozzi G. and Hernandez L. 2009. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *American Journal of Pathology*. 174: 661-670.
- Meng G., Chai K., Li X., Zhu Y. and Huang W. 2016. Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the activation of MEK/ERK signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 257: 26e34.
- Mountain C.F. 1997. Revisions in the International system for staging lung cancer. *American College of Chest Physicians*. 111: 1710-1717.
- Nai C., Xuan H., Zhang Y., Shen M., Xu T., Pan D., Zhang C. and Li D. 2015. Luteolin exerts cardioprotective effects through improving sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-

ATPase activity in rats during ischemia/reperfusion in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 365854.

Nordeen S.K., Bona B.J., Jones D.N., Lambert J.R. and Jackson T.A. 2013. Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercetin. *Hormones and Cancer*. 4: 293-300.

Ntantie E., Fletcher J., Amissah F., Salako O.O., Nkembo A.T., Poku R.A., Ikpatt F.O. and Lamango N.S. 2017. Polyisoprenylated cysteinyl amide inhibitors disrupt actin cytoskeleton organization, induce cell rounding and block migration of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 8: 31726-31744.

Pandurangan A.K., Dharmalingam P., Sadagopan, S.K. Ramar M., Munusamy A. and Ganapasam S. 2013. Luteolin induces growth arrest in colon cancer cells through involvement of Wnt/b-catenin/GSK-3 β signaling. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 32: 131-139.

Park S.H., Kim J.H., Lee D.H., Kang J.W., Song H.H., Oh S.R. and Yoon D.Y. 2013. Luteolin 8- C- β -fucopyranoside inhibits invasion and suppresses TPA-induced MMP-9 and IL-8 via ERK/AP-1 and ERK/NF- κ B signaling in MCF-7 breast cancer cells. *Biochimie*. 95: 2082-2090.

Parri M. and Chiarugi P. 2010. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication Signaling*. 8: 2-14.

Patil S.P., Jain P.D., Sancheti J.S., Ghumatkar P.J., Tambe R. and Sathaye S. 2014. Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced Parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*. 86: 192-202.

Peng W., Wu J.G., Jiang Y.B., Liu Y.J., Sun T., Wu N. and Wu C.J. 2015. Antitumor activity of 4-O-(2"-O-acetyl-6"-O-p-coumaroyl-beta-D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid

against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. *Chemico-Biological Interaction*. 233: 8-13.

Ping C., Jing Y.Z., Bei B.S., Yan E.M., Tao H., Yang C.M., Hao S., Jian X.S., Zi M.D., and Pei L. 2017. Luteolin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis via down-regulation of mitochondrial membrane potential in esophageal carcinoma cells EC1 and KYSE450. *Oncotarget*. 8: 27471-27480.

Pu Y., Zhang T., Wang J., Mao Z., Duan B., Long Y., Xue F., Liu D., Liu S. and Gao Z. 2018. Luteolin exerts an anticancer effect on gastric cancer cells through multiple signaling pathways and regulating miRNAs. *Journal of Cancer*. 9: 3669-3675.

Qadir M.I., Parveen A. and Ali M. 2015. Cdc42: Role in cancer management. *Chemical Biology & Drug Design*. 86: 432-439.

Qiusheng Z., Yuntao Z., Rongliang Z., Dean G. and Changling L. 2005. Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. *Pharmazie*. 60: 539-543.

Ridley A.J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*. 16: 522-529.

Ridley A.J. 2015. Rho GTPases signaling in cell migration. *Current Opinion in cell Biology*. 36: 103-112.

Romanova' D., Vachálková A., Cipák L., Ovesná Z. and Rauko P. 2001. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma*. 48: 104-107.

Ruan J.S., Liu Y.P., Zhang L., Yan L.G., Fan F.T., Shen C.S., Wang A.Y., Zheng S.Z., Wang S.M. and Lu Y. 2012. Luteolin reduces the invasive potential of malignant

melanoma cells by targeting $\beta 3$ integrin and the epithelial-mesenchymal transition. *Acta Pharmacologica Sinica*. 33: 1325-1331.

Ruest P.J., Roy S., Shi E., Mernaugh R.L. and Hanks S.K. 2000. Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth & Differentiation*. 11: 41-48.

Ruiz P. A. and Haller D. 2006. Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. *Nutrition*. 136: 664-671.

Sadok A. and Marshall C.J. 2014. Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases*. 5: e29710.

Sanz-Moreno V., Gadea G., Ahn J., Paterson H., Marra P., Pinner S., Sahai E. and Marshall C.J. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*. 135: 510-523.

Schaller M.D., Borgman C.A. and Cobb B.S. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 5192-5196.

Scippo M.L., Argiris C., Van de Weerd C., Muller M., Willemsen P., Martial J. and Maghuin-Rogister G. 2004. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378: 664-669.

Shimoi K., Masuda S., Shen B., Furugori M. and Kinae N. 1994. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis*. 15: 2669-2672.

- Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H. and Kinae N. 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS letters*. 438: 220-224.
- Siegel R.L., Miller K.D. and Jemal A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*. 66: 7-30.
- Small J.V., Stradal T., Vignal E. and Rottner K. 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends in Cell Biology*. 12: 112-120.
- Sonja K., Ingrid J., Kris G., Mari ette D., Joel V. and Alan H. 2001. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53: Mena complex. *Current Biology*. 11: 1645-1655.
- Stallings-Mann M.L., Waldmann J., Zhang Y., Miller E., Gauthier M.L., Visscher D.W., Downey G.P., Radisky E.S., Fields A.P. and Radisky D.C. 2012. Matrix metalloproteinase Induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression. *Science Translational Medicine*. 4:142ra195.
- Stengel K. and Zheng Y. 2011. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion and tumorigenesis. *Cell Signaling*. 23: 1415-1423.
- Sukhramani P.S., Tirthani S.R., Desai S.A. and Suthar M.P. 2011. Biological cytotoxicity evaluation of spiro[azetidine-2, 3'-indole]-2', 4(1'H)- dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre*. 3: 236-243.
- Sui J.Q., Xie K.P. and Xie M.J. 2016. Inhibitory effect of luteolin on the proliferation of human breast cancer cell lines induced by epidermal growth factor. *Sheng Li Xue Bao*. 68: 27-34.

- Sulzmaier F.J., Jean C. and Schlaepfer D.D. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer*. 14: 598-610.
- Tang X., Wang H., Fan L., Wu X., Xin A., Ren H. and Wang X.J. 2011. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radical Biology and Medicine*. 50: 1599-1609.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y. and Nieto M.A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139: 871-890.
- Tobias J. and Hochhauser D. 2014. *Cancer and Its management*. 7th Edition. p30. USA. Wiley-Blackwell.
- Torchia J., Rose D.W., Inostroza J., Kamei Y., Westin S., Glass C.K. and Rosenfeld M.G. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*. 387: 677-684.
- Tsai P.H., Cheng C.H., Lin C.Y., Huang Y.T., Lee L.T., Kandaswami C.C., Lin Y.C., Lee K.P., Hung C.C., Hwang J.J., Ke F.C., Chang G.D. and Lee M.T. 2016. Dietary flavonoids luteolin and quercetin suppressed cancer stem cell properties and metastatic potential of isolated prostate cancer cells. *Anticancer Research*. 36: 6367-6380.
- Ueda S., Kitazawa S., Ishida K., Nishikawa Y., Matsui M., Matsumoto H., Aoki T., Nozaki S., Takeda T. and Tamori Y. 2010. Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma. *FASEB Journal*. 24: 2254-2261.
- Vansteenkiste J.F. and Stroobants S.S. 2006. PET scan in lung cancer: current recommendations and innovation. *Thoracic Oncology* 1:71-73.

- Voura E.B., Sandig M., Kalnins V.I. and Siu C. 1998. Cell shape changes and cytoskeleton reorganization during transendothelial migration of human melanoma cells. *Cell and Tissue Research*. 293: 375-387.
- Wen Y.C., Ming T.C., Yea J.L. Yi-Chin L.Y. and Chiung C.S. 2013. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. *Molecular Biology Reports*. 40: 5315-5326.
- Wieser F., Schneeberger C., Hudelist G., Singer C., Kurz C., Nagele F., Gruber C., Huber J.C. and Tschugguel W. 2002. Endometrial nuclear receptor co-factors SRC-1 and N-CoR are increased in human endometrium during menstruation. *Molecular Human Reproduction*. 8: 644-650.
- Yamaguchi H., Wyckoff J. and Condeelis J. 2005. Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*. 17: 559-564.
- Yang W.H., Lan H.Y., Huang C.H., Tai S.K., Tzeng C.H., Kao S.Y., Wu K.J., Hung, M.C. and Yang M.H. 2012. RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nature Cell Biology*. 14: 366-374.
- York E.M. 2005. Pathogenesis of lung cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 33: 216-223.
- Zhang D., Zhang J.Y., Dai S.D., Liu S.L., Liu Y., Tang N. and Wang E.H. 2014. Co-expression of delta-catenin and RhoA is significantly associated with a malignant lung cancer phenotype. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 7: 3724-3732.

Zhang S., Schafer-Hales K., Khuri F.R., Zhou W., Vertino P.M. and Marcus A.I. 2008. The tumor suppressor LKB1 regulates lung cancer cell polarity by mediating Cdc42 recruitment and activity. *Cancer Research*. 68: 740-748.

Zhang T., Wu W., Li D., Xu T., Zhu H., Pan D., Zhu S. and Liu Y. 2014. Anti-oxidant and anti-apoptotic effects of luteolin on mice peritoneal macrophages stimulated by angiotensin II. *International Immunopharmacology*. 20: 346-351.

Zhao Y.X., Yang G.T., Ren D.M., Zhang X.M., Yin Q.W. and Sun X.F. 2011. Luteolin suppresses growth and migration of human lung cancer cells. *Molecular Biology Reports*. 38: 1115-1119.

A549 American type culture collection ® ccl-185tm homo sapiens lung carcinoma [internet]. [Cited 2018 October 10]. available from: <https://www.atcc.org/products/all/ccl-185.aspx>

Everolimus [internet]. [Cited 2018 February 25]. available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/db01590>

MRC-5 American type culture collection ® ccl-171tm homo sapiens lung carcinoma [internet]. [Cited 2018 December 6]. available from: <https://www.atcc.org/products/all/ccl-171.aspx>

Tivantinib [Internet]. [Cited 2018 February 25]. available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/db12200>

Vandetanib [Internet]. [Cited 2018 February 25]. available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/db05294>

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

KH_2PO_4	0.24	กรัม
NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
Na_2HPO_4	1.44	กรัม

นำสารที่ซึ่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 7.4 ด้วย 1 M hydrochloric acid (HCl) หรือ 1 M sodium hydroxide (NaOH) เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง autoclave

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/Ham's F-12 medium ปริมาตร 1 ลิตร

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

NaHCO_3	2.00	กรัม
DMEM/Ham's F-12 medium	12.12	กรัม

นำสารที่ซึ่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 7.4 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองด้วย filter paper ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเซลล์

3. การเตรียมสารละลาย 10X Tris buffer saline (TBS) ปริมาตร 1 ลิตร

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

Tris-HCl	63.57	กรัม
NaCl	87.66	กรัม

นำสารที่ซึ่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 7.9 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลาย 1X Tris buffer saline + 0.1% Tween 20 ปริมาตร 1 ลิตร

เทสารละลาย 10X Tris buffered saline (TBS) pH 7.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายรวมกันใน deionized water ปริมาตร 900 มิลลิลิตรและเติม 0.1% Tween 20 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

5. การเตรียมสารละลาย 10X electrode buffer ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่งสารดังต่อไปนี้

Tris-HCl	30.30	กรัม
Glycine	144.00	กรัม
SDS	10.00	กรัม

นำสารที่ชั่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 8.3 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลาย 2X sample buffer ปริมาตร 45 มิลลิลิตร

Tris-HCl	0.76	กรัม
SDS	2.00	กรัม
Glycine	10.00	กรัม

นำสารที่ชั่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 6.3 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 45 มิลลิลิตร และเมื่อจะใช้ให้มีการเติม 2-mercaptoethanal ในอัตราส่วน 9:1

7. การเตรียมสารละลาย 1X electrophoresis buffer ปริมาตร 2 ลิตร

ชั่งสารดังต่อไปนี้

Tris-Base	6.04	กรัม
Glycine	28.52	กรัม

นำสารที่ชั่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เติม methanol 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 2,000 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสารละลาย 5X separating buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

Tris-HCl	22.70	กรัม
SDS	0.50	กรัม

นำสารที่ซึ่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 8.8 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

9. การเตรียมสารละลาย 5X stacking buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

Tris-HCl	7.57	กรัม
SDS	0.50	กรัม

นำสารที่ซึ่งได้ทั้งหมดละลายด้วย deionized water ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH 6.8 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เมื่อปรับ pH เรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข1 ผลของลูทีโอลินต่อความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด human adenocarcinoma epithelial A549 cell line และเซลล์ปกติ human MRC5 lung fibroblast cell line

Cell culture	Luteolin (μM)					
	0	5	10	20	40	80
A549	100.00 \pm 0.00	101.05 \pm 5.92	92.97 \pm 1.50	91.53 \pm 2.21	86.91 \pm 4.52	85.49 \pm 1.37
MRC5	100.00 \pm 0.00	102.03 \pm 6.86	99.23 \pm 8.69	97.82 \pm 6.26	97.48 \pm 4.23	97.68 \pm 4.29

ตารางที่ ข2 ผลของลูทีโอลินต่อรูปแบบการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด A549 แบบ apoptosis

Time (h)	Luteolin (μM)			
	0	10	20	80
24	4.23 \pm 1.83	9.47 \pm 0.75	15.19 \pm 1.28	24.44 \pm 0.99
				85.96 \pm 1.59

ตารางที่ ๓3 ผลของลูทีโอลีนต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดด้วยวิธี scratch wound healing

Time (h)	Luteolin (μM)		
	0	10	20
0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
24	59.14 \pm 6.21	68.27 \pm 10.00	69.52 \pm 9.19
48	8.39 \pm 4.26	44.13 \pm 1.08	63.10 \pm 14.15
			71.69 \pm 10.14

ตารางที่ ๓4 ผลของลูทีโอลีนต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ ด้วยวิธี transwell invasion assay

Time (h)	Luteolin (μM)		
	0	10	20
24	100.00 \pm 0.00	43.86 \pm 12.50	29.66 \pm 8.40
			16.91 \pm 4.39

ตารางที่ ๖5 ผลของลูทีโอลลินต่อการแสดงออกของโปรตีน Rac1, Cdc42, RhoA, pFAK, FAK, pSrc และ Src

Relative protein level	Luteolin (μ M)			
	0	10	20	40
Rac1	1.00 \pm 0.00	0.99 \pm 0.09	0.64 \pm 0.04	0.24 \pm 0.01
Cdc42	1.00 \pm 0.00	0.68 \pm 0.04	0.36 \pm 0.02	0.14 \pm 0.00
RhoA	1.00 \pm 0.00	0.74 \pm 0.11	0.52 \pm 0.03	0.41 \pm 0.03
pFAK	1.00 \pm 0.00	0.80 \pm 0.06	0.66 \pm 0.06	0.52 \pm 0.03
FAK	1.00 \pm 0.00	0.99 \pm 0.13	1.01 \pm 0.14	1.08 \pm 0.2
pSrc	1.00 \pm 0.00	0.82 \pm 0.08	0.57 \pm 0.06	0.01 \pm 0.00
Src	1.00 \pm 0.00	0.90 \pm 0.17	1.05 \pm 0.12	0.97 \pm 0.27

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายวุฒิพงษ์ มาสรักษา
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 6010220055
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2560

ทุนการศึกษา

ทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เป็นผู้ช่วยวิจัย ปีการศึกษา 2560
 ทุนโครงการวิจัยประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2561

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Masraksa W., Tanasawet S. and Sukketsiri W. 2019. Luteolin induces apoptosis in non-small cell lung cancer A549 cells. Proceeding of the 41th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. Chianmai Granview Hotel & Covention Center, Chianmai, Thailand, February 14-15, 2019.