รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าเร่วหอมต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา

Effect of extract and pure compound from *Etlingera pavieana* rhizome on chemoresistant cancer cell lines

โดย

ผศ. ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256108A1080016
สัญญาเลขที่ ๑๘๐/๒๕๖๑

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าเร่วหอมต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา

Effect of extract and pure compound from *Etlingera pavieana* rhizome on chemoresistant cancer cell lines

โดย

ผศ. ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ที่ปรึกษาโครงการ
ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยก่อนหน้าที่เราได้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) ต่อเนื่องมาสู่การค้นพบฤทธิ์ต้านมะเร็งดื้อยาของสารทั้งสอง และในงานวิจัยชิ้นนี้ เราได้ทำการทดสอบผลการยับยั้งร่วมกันของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมหรือสาร 4-MCA กับยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งชนิดที่ดื้อยา ผลจากการทดสอบด้วยวิธี MTT พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ดื้อต่อยา doxorubicin (MDA-MB-231/Dox^{R}) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ดื้อต่อยา cisplatin (C33A/Cis^{R}) ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมพร้อมกันกับยา doxorubicin หรือ cisplatin มีการเจริญที่สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหรือยาเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เซลล์ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสาร 4-MCA ร่วมกับยา doxorubicin เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีการเจริญที่ลดลงของอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารหรือยาเพียงอย่างเดียว ซึ่งแตกต่างจากการบ่มสาร 4-MCA ร่วมกับยา cisplatin ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A/Cis^{R} ที่พบว่าการเจริญของเซลล์ถูกยับยั้งได้มากกว่าการได้รับแค่ยา cisplatin แต่ไม่แตกต่างจากการได้รับสาร 4-MCA เพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจจะต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อไป ผลการทดลองที่ได้นี้ชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มในการทำงานร่วมกันเพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาของสาร 4-MCA กับยาเคมีบำบัดได้

<u>คำสำคัญ</u> : สารสกัดจากเร่วหอม, 4-methoxycinnamaldehyde, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, เซลล์มะเร็งดื้อยา, การยับยั้งร่วมกัน

Abstract

We previously reported the anti-cancer effect of ethanolic extract of *Etlingera pavieana* rhizome (EE) and its bioactive compound, 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) as well as their anti-proliferative effect on drug-resistant cancer cells. In this study, the synergistic inhibitory effect on growth of doxorubicin-resistant breast cancer cell (MDA-MB-231/Dox^{R}) and cisplatin-resistant cervical cancer cell (C33A/Cis^{R}) by combining EE or 4-MCA and chemotherapeutic drugs were investigated. The MTT results revealed that neither the growth of MDA-MB-231/Dox^{R} nor that of C33A/Cis^{R} cells was inhibited in the co-treatment of EE and doxorubicin or cisplatin when compared to the single treatment. On the contrary, viability of MDA-MB-231/Dox^{R} cells exposed to 4-MCA combined with doxorubicin was greater decreased than that of 4-MCA or doxorubicin alone. Although C33A/Cis^{R} cells co-treated with 4-MCA and cisplatin showed lower growth than that of cisplatin treatment, their growth was comparable to cells treated with 4-MCA. Additional treatment conditions are required to be tested. Overall results indicate the potential synergistic effect of 4-MCA and doxorubicin on inhibiting growth of doxorubicin-resistant breast cancer cells.

Keywords : *Etlingera pavieana* extract, 4-methoxycinnamaldehyde, anticancer effect, drug-resistant cancer cells, synergistic inhibition

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 180/2561

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย มา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการดำเนินการวิจัย	10
ผลการวิจัย	11
อภิปราย และสรุปการทดลอง	22
ผลผลิต	25
บรรณานุกรม	26
ประวัติของหัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยของโครงการวิจัย	29

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4-1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	12
4-2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	13
4-3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ได้รับยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	15
4-4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R} ที่ได้รับยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	16
4-5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสาร 4-MCA ความเข้มข้น 80 µM หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโม	18
4-6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสาร 4-MCA ความเข้มข้น 80 µM หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	19
4-7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และ C33A/Cis^{R} ที่ได้รับยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM หรือสาร 4-MCA ความเข้มข้น 50 µM หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	21

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีแนวโน้มของผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นทุกปีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา ซึ่งจากสถิติที่บันทึกไว้ล่าสุดในปี พ.ศ. 2557 พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งถึง 70,075 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 107.9 คนต่อประชากร 100,000 คน ในจำนวนนี้เป็นสตรี 29,914 ราย โดยพบว่าเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเต้านมมากถึง 3,455 ราย และมะเร็งปากมดลูก 2,062 ราย และในช่วงอายุ 15-59 ปีมากที่สุด (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข) ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งมีด้วยกันหลายวิธี ทั้งการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป การฉายรังสี และการรักษาด้วยเคมีบำบัด ซึ่งโดยปกติแล้วมะเร็งในระยะที่ยังไม่ลุกลามหากได้รับการรักษาด้วยสองวิธีแรกซึ่งเป็นการรักษาเฉพาะจุดก็สามารถทำให้ผู้ป่วยหายจากโรคได้ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ามารับการรักษามักจะตรวจพบว่าเป็นมะเร็งในระยะที่ลุกลามแล้วหรือมีความเสี่ยงสูงว่าจะลุกลาม ซึ่งจะต้องทำการรักษาควบคู่ไปกับการใช้ยาเคมีบำบัด แม้ว่าในปัจจุบันจะมียาเคมีบำบัดหลากหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในสถานพยาบาลต่างๆ แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จ คือการที่เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาเคมีบำบัดหลังจากได้รับการรักษาไปแล้วระยะหนึ่ง (acquired drug resistance) ซึ่งการปรับเปลี่ยนสูตรยาเคมีบำบัดก็ทำให้ผู้ป่วยต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้น มีค่าใช้จ่ายที่มากขึ้น ต้องทนทุกข์ทรมานกับผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดอย่างต่อเนื่อง รวมถึงทำให้ตัวผู้ป่วยและคนใกล้ชิดเสียกำลังใจในการที่จะต่อสู้กับโรคร้ายนี้ต่อไป

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติและพืชสมุนไพร ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพืชสมุนไพรได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย เช่น นำมาบริโภคเป็นอาหาร เป็นส่วนผสมของเครื่องปรุงอาหาร เครื่องสำอาง หรือแม้แต่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค พืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิดก็เป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักกันดี เช่น ขมิ้น ขิง ข่า กระชาย เป็นต้น ซึ่งสารสกัดจากพืชเหล่านี้พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดทั้งในหลอดทดลองและในหนูทดลอง เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7, MDA-MB231), เซลล์มะเร็งรังไข่ (CaOV3, SKOV3ip1) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เป็นต้น (Elkady AI et al., 2012; Sinha D et al., 2012; Debata PR et al., 2013; Lin YG et al., 2007; Rahman S et al., 2011; Sabli F et al., 2012; Vinothkumar R et al., 2014; Samarghandian S et al., 2014)

เร่วหอม [Etlingera pavieana (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm.] จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นกันและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคตะวันออกของไทย มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นหอม เหง้าของเร่วหอมนิยมนำมาใช้ผสมในเครื่องเทศปรุงอาหาร รวมทั้งใส่ในน้ำซุปของก๋วยเตี๋ยวหมูเลียงซึ่งเป็นอีกหนึ่งเมนูขึ้นชื่อของจังหวัดจันทบุรี เร่วหอมมีสรรพคุณใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของเหง้าเร่วหอม พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ และสารบริสุทธิ์ 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A, SiHa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เป็นต้น และมีพิษต่ำต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง

(Wanichwatanadecha P et al., 2016 และผลวิจัยรอตีพิมพ์, ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558และ 2559) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าเร่วหอม ได้แก่ Methoxycinnamyl p-coumarate 4-methoxycinnamaldehyde และ p-coumaric acid สามารถต้านการอักเสบได้โดยผ่านทางการยับยั้งวิถี NF-κB หรือการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยที่ Methoxycinnamyl p-coumarate จะเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีที่สุด รองลงมาคือ 4-methoxycinnamaldehyde (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ซึ่งวิถีของ NF-κB นี้นอกจากจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำให้เซลล์มะเร็งอยู่รอดและมีความรุนแรงของโรคมากขึ้นแล้ว ยังพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ด้วย (Weldon CB et al., 2001; Broxterman HJ et al., 2009; Godwin P et al., 2013) เซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF-κB สูง มักจะมีความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดมากกว่า ซึ่งทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของยาสูงกว่าเซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF-κB ต่ำ และตัวยาที่ใช้ในการรักษาเคมีบำบัดหลายชนิด แม้ว่าจะมีกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งแตกต่างกัน เช่น doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, vincristine, paclitaxel ฯลฯ แต่ก็มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ NF-κB เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน (Das KC และ White CW, 1997; Chuang SE et al., 2002) การให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF-κB เช่น Celecoxib, Valspodar (PSC833), Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), Salicylic acid และ Genistein แก่เซลล์พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231 และ MCF-7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (SiHa และ HeLa) ตอบสนองต่อยา doxorubicin หรือ cisplatin ได้ดีขึ้น (Venkatraman M et al., 2005; van Wijngaarden J et al., 2007; Chen C et al., 2011; Sahin K et al., 2012) นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบในหนู mice ยังพบว่าการยับยั้งการทำงานของ NF-κB ทำให้เกิดการถดถอยของมะเร็ง (cancer regression) ในหนู mice ได้ และยังทำให้เซลล์มะเร็งดื้อยา ในหนู mice เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อทำการให้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง CPT-11 เข้าไปในเซลล์ที่มีการยับยั้งการทำงานของ NF-κB (Wang CY et al., 1999)

สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิดพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาได้ รวมทั้งช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งดื้อยา เช่น สารสกัดจากพืช Aframonum polyanthum, A. arundinaceum และสารที่แยกได้ ได้แก่ galanals A and B, naringenin และ kaempferol-3,7,4'-trimethylether พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา CEM/ADR5000 เซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231-BCRP และเซลล์เนื้องอกสมองดื้อยา U87MGΔEGFR ได้ (Kuete V et al., 2014) สาร Curcumin ซึ่งแยกได้จาก Curcuma longa (Zingiberaceae) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Glioma ที่ดื้อยาและทำให้เซลล์ดื้อยานั้นตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด cisplatin, etoposide, camptothecin และ doxorubicin ได้ ซึ่งมีกลไกผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ NF-κB และ AP-1 (Dhandapani KM et al., 2007) อีกทั้งสาร Curcumin ยังสามารถเพิ่มการตอบสนองของเซลล์มะเร็งตับ HA22T/VGH ต่อยา cisplatin และ doxorubicin ได้อีกด้วย (Notarbartolo M et al., 2005) นอกจากการยับยั้งผ่านทางวิถี NF-κB แล้ว สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ permeability glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์และมีหน้าที่ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์ เช่น สารสกัดของ Curcuma aeruginosa และ Zingiber cassumunar และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/ADR ที่ดื้อต่อยา daunomycin กลับมาตอบสนองต่อยา daunomycin ได้เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนให้ยาเคมีบำบัด (Kim HR et al., 2004; Chung SY et al., 2009) นอกจากนี้ สาร tetrahydrocurcumin ซึ่งเป็นสารหลักที่ได้จากการย่อย curcumin ในร่างกายสิ่งมีชีวิต พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ตัวหลักที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้ทั้ง 3ชนิด ได้แก่ P-glycoprotein (P-gp), mitoxantrone resistance protein (MXR) และ multidrug resistance protein 1 (MRP1) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยา (Limtrakul P et al., 2007)

จากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้และจากผลการวิจัยของคณะผู้วิจัยที่พบว่าสารสกัดเร่วหอมและสารบริสุทธิ์จากเร่วหอม 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดรวมถึงชนิดที่เป็นเซลล์มะเร็งในระยะรุนแรง และสามารถยับยั้งวิถี NF-κB ได้ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้มะเร็งดื้อยา ทำให้คณะผู้วิจัยเห็นว่ามีแนวโน้มเป็นอย่างมากที่สารสกัดจากเร่วหอมหรือสารบริสุทธิ์ที่พบได้ในเหง้าเร่วหอมจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้ และ/หรือเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งที่อยู่ในระยะรุนแรงและดื้อยาได้ โดยจะเน้นมะเร็งที่พบมากที่สุดในหญิงไทย คือ มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้คำนึงถึงความรู้สึกของผู้ป่วยและญาติที่จะมีความสบายใจมากกว่าหากใช้ยาสมุนไพรซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในการรักษาร่วมกับยาเคมีบำบัด ทางผู้วิจัยจึงจะเริ่มทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอมเป็นอันดับแรก ซึ่งหากผลการทดลองสำเร็จ ก็อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สมุนไพรเร่วหอมในรูปแคปซูลหรือยาลูกกลอนที่ให้ผู้ป่วยรับประทานในระหว่างเข้ารับการรักษาเคมีบำบัดได้ อย่างไรก็ตาม สารบริสุทธิ์ที่พบได้ในเหง้าเร่วหอมก็จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ด้วย เนื่องจากมีเป้าหมายเพื่อที่จะนำมาใช้แทนยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หรือใช้ร่วมกันกับยาแผนปัจจุบันเพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งความสำเร็จของงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นการเพิ่มโอกาสให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งที่อยู่ในระยะรุนแรงสามารถรักษาให้หายจากโรคได้และมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มคุณค่าและค่านิยมให้กับการบริโภคสมุนไพรท้องถิ่น สนับสนุนภูมิปัญญาชาวบ้าน เพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับตัวยาที่มีอยู่ในสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งเป็นการกระตุ้นเศรษฐกิจของชุมชนภาคตะวันออกให้หันมาปลูกเร่วหอมเป็นเชิงพาณิชย์มากขึ้นด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและสารบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา ซึ่งการดื้อยาของเซลล์มะเร็งนี้เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากเร่วหอมเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมนำมาปรุงอาหารในภาคตะวันออก และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากเร่วหอมและสารบริสุทธิ์ 4-methoxycinnamaldehyde มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้หลายชนิด โดยยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก อีกทั้งสารสกัดทั้งสองยังมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านทางการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์หรือวิถี NF-κB ซึ่งเป็นวิถีที่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาว่าสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยาได้โดยไม่ต้องใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดหรือไม่ และศึกษาว่าสารสกัดมีความสามารถในการเพิ่มการ

ตอบสนองของเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อยาเคมีบำบัดได้หรือไม่ แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้สารสกัดหรือยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว รวมทั้งศึกษากลไกในระดับโมเลกุล

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ วางแผนโครงการต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 3 ปี (ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2560 จนถึง 2562) สำหรับในปี พ.ศ. 2561 งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาว่าการใช้สารสกัดจากเร่วหอมหรือสารบริสุทธิ์ร่วมกับยาเคมีบำบัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยาได้ดีกว่าการใช้สารสกัดหรือยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียวหรือไม่

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยปีนี้จะทำการศึกษาต่อจากปีที่ผ่านมาว่าสารสกัดเร่วหอมสามารถช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งดื้อยาได้หรือไม่ โดยจะให้สารสกัดหรือสาร 4-methoxycinnamaldehyde ในเซลล์มะเร็งดื้อยาทั้ง 2 ชนิดร่วมกับยา Doxorubicin หรือ Cisplatin แล้วทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างการใช้สารสกัดร่วมกับยาเคมีบำบัดกับการใช้สารสกัดหรือยาเพียงอย่างเดียว

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน มีทั้งการฉายรังสี (radiation therapy) การผ่าตัดเอาก้อนเนื้อมะเร็งออกไป (surgery) และการรักษาโดยใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) โดยจะเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือรักษาหลายวิธีร่วมกันขึ้นกับชนิดและระยะของมะเร็ง ซึ่งความแตกต่างของการใช้ยาเคมีบำบัดกับการรักษาแบบสองวิธีแรกคือ ตัวยาจะสามารถเคลื่อนที่ไปได้ทุกส่วนของร่างกายเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ ในขณะที่การฉายรังสีหรือการผ่าตัดจะเป็นการกำจัดมะเร็งเฉพาะส่วนที่ได้รับการรักษาเท่านั้น ในปัจจุบันมียาเคมีบำบัดที่ผลิตออกมามากกว่า 100 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภทตามกลไกการออกฤทธิ์ เช่น กลุ่ม Alkylating agents เป็นยาที่ออกฤทธิ์ทำลายสารพันธุกรรมทำให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์ได้ทุกระยะของการแบ่งเซลล์ เช่น ยากลุ่ม platinum drugs (cisplatin, carboplatin) เป็นต้น กลุ่ม Antimetabolites ตัวยาจะเข้าไปแทนที่ในสายพันธุกรรมส่งผลให้เกิดยับยั้งการสร้างสายพันธุกรรม โดยออกฤทธิ์ในระยะ S ของการแบ่งเซลล์ เช่น 5-fluorouracil (5-FU) และ methotrexate เป็นต้น กลุ่ม Anti-tumor antibiotics มีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ซึ่งออกฤทธิ์ได้ในทุกระยะของวงจรการแบ่งเซลล์ ได้แก่ Antracyclines (เช่น Doxorubicin) และ Mitoxantrone (เช่น Actinomycin-D) กลุ่ม Topoisomerase inhibitors ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Topoisomerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม เช่น Etoposide (VP-16) กลุ่ม Mitotic inhibitors ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะ Mitosis และยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับการแบ่งเซลล์ ส่งผลให้สามารถทำลายเซลล์ได้ในทุกระยะของวงจรแบ่งเซลล์ เช่น Taxanes (เช่น Paclitaxel) และ vinca alkaloids (เช่น vinblastin vincristine) เป็นต้น กลุ่ม Corticosteroids ออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งและยับยั้งการโตของก้อนมะเร็ง เช่น Dexamethasone เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มยาอื่นๆ เช่น กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้น โดยไม่ไปทำลายเซลล์ปกติของร่างกาย (targeted therapy) โดยยาในกลุ่มนี้มักออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ผิดปกติไปในเซลล์มะเร็ง เช่น ยา Imatinib (Gleevec/Glivec) และ ยา Gefitinib (Iressa) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase หรือ ยา Trastuzumab (Herceptin) ซึ่งเป็นแอนติบอดี้ต่อ HER2/neu ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม โดยจะเข้าจับกับโปรตีนผิวเซลล์ที่ผลิตขึ้นบนเซลล์มะเร็งเท่านั้น หรือยากลุ่มฮอร์โมน เช่น ยา Tamoxifen ที่มีคุณสมบัติต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Anti-estrogen) เป็นต้น (http://www.chulacancer.net)

ปัจจุบันสูตรยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมถูกพัฒนาขึ้นมามากมายหลายสูตร ซึ่งยาที่นิยมใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมระยะเริ่มแรก ได้แก่ ยากลุ่ม Antracyclines เช่น Doxorubicin (Adriamycin) และยากลุ่ม taxanes เช่น Paclitaxel (Taxol) สูตรยามีด้วยกันหลายสูตร เช่น สูตร AC (Adriamycin และ Cyclophosphamide) เป็นสูตรเคมีบำบัดที่นิยมใช้กันมาก โดยเฉพาะกลุ่มที่มะเร็งเต้า

นมยังไม่แพร่ไปยังต่อมน้ำเหลือง สูตร **TAC** เป็นสูตรที่เพิ่ม Paclitaxel (Taxol) หรือ Docetaxel (Taxotere) เข้าไปในสูตร AC เพื่อไปรักษากลุ่มที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมไปยังต่อมน้ำเหลืองแล้ว หรือในรายที่มีการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังการรักษา โดย TAC จะให้หลังจากเสร็จสิ้นการรักษาด้วย AC สูตร FAC (5-Fluorouraci, Adrimycin และ Cyclophosphamide) เป็นสูตรยาที่ใช้ได้ทั้งกลุ่มที่ยังไม่แพร่ หรือแพร่ไปยังต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น (http://www.cancer.org; http://www.thaibreastcancer.com) สำหรับสูตรยารักษามะเร็งปากมดลูกนั้น จะมีตั้งแต่การใช้ยา Cisplatin เพียงชนิดเดียว หรือใช้ยา Cisplatin ควบคู่กับยาชนิดอื่น เช่น ควบคู่กับยา Paclitaxel, หรือ Gemcitabine เป็นต้น ซึ่ง Cisplatin จัดว่าเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษามะเร็งปากมดลูก (Yu S และ Garcia AA, 2015) แม้ว่าการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันจะทำให้เกิดผลการรักษาที่ดีขึ้น แต่ยาหลายชนิดมีผลข้างเคียงมากหรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงเกินไป เช่น ยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อหัวใจ ยา Cisplatin เป็นพิษต่อไต ซึ่งพบได้ 20-30% ของผู้ป่วย เป็นต้น (Wright JC, 1985; Miller RP *et al*., 2010) และปัญหาสำคัญของการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดที่ทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร นั่นคือการที่เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้หลังจากได้รับยาไปแล้วระยะหนึ่ง (acquired drug resistance) ซึ่งกลไกในการดื้อยาอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ที่มีหน้าที่ในการผลักยาออกนอกเซลล์ (drug efflux) ได้แก่ กลุ่ม ABC (ATP-binding cassette) membrane transporter ซึ่งโปรตีนตัวหลักๆ ประกอบด้วย P-glycoprotein (P-gp; หรือ MDR1 หรือ ABCB1), breast cancer resistance protein (BCRP; หรือ MXR หรือ ABCG2) และ multidrug resistance-associated protein 1(MRP1; หรือ ABCC1) ยาต้านมะเร็งหลายชนิดสามารถถูกขนส่งออกนอกเซลล์ได้ด้วย ABC transporter เหล่านี้ เช่น Doxorubicin Daunorubin และ Etoposide เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งนั่นเอง แนวทางที่สามารถจะลดปัญหาการดื้อยานี้ อาจทำได้โดยการใช้ยาต้านมะเร็งที่ไม่สามารถถูกขับออกได้ด้วยโปรตีน ABC transporter หรือการให้ยาร่วมกับสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ โปรตีน ABC transporter นี้ (Coley HM, 2008; คณินทร์ รังสาดทอง, 2014) อย่างไรก็ตามการทำงานของ ABC transporter เป็นเพียงกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อยา ซึ่งโปรตีน ABC transporter ยังมีบทบาทที่สำคัญในการปกป้องเซลล์จากสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ ABC transporter จึงควรมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของ ABC transporter ด้วย

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ค้นหายีนหรือโปรตีนภายในเซลล์เพื่อเป็นเป้าหมายใหม่ๆ สำหรับการลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง หนึ่งในนั้นคือ transcription factor NF-κB ซึ่งในแง่ของการเกิดและพัฒนาเซลล์มะเร็ง พบว่า NF-κB มีบทบาทในการป้องกันการตายแบบ apoptosis ของ transformed cell และส่งเสริมให้มะเร็งลุกลาม (invasion) และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ (metastasis) (Greten FR *et al*., 2004; Yang CR *et al*., 2005; Luo JL *et al*., 2004) นอกจากนี้ ยังพบว่า วิถีของ NF-κB สัมพันธ์กับการดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด (Weldon CB *et al*., 2001; Broxterman HJ *et al*., 2009; Godwin P *et al*., 2013) โดยพบว่า เซลล์มะเร็งที่มี

ระดับการแสดงออกของ NF-κB สูง มักจะมีความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดมากกว่า เซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF-κB ต่ำ และตัวยาที่ใช้ในการรักษาเคมีบำบัดหลายชนิด เช่น doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, vincristine, paclitaxel ฯลฯ มีผลทำให้การทำงานของ NF-κB เพิ่มขึ้นแม้ว่าจะมีกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกันก็ตาม (Das KC และ White CW, 1997; Chuang SE *et al*., 2002) การให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF-κB แก่เซลล์ เช่น Celecoxib, Valspodar (PSC833), Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), Salicylic acid และ Genistein พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231 และ MCF-7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (SiHa และ HeLa) ตอบสนองต่อยา doxorubicin หรือ cisplatin ได้ดีขึ้น (Venkatraman M *et al*., 2005; van Wijngaarden J *et al*., 2007; Chen C *et al*., 2011; Sahin K *et al*., 2012) นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบในหนู mice ยังพบว่าการยับยั้งการทำงานของ NF-κB ทำให้เกิดการถดถอยของมะเร็ง (cancer regression) ในหนู mice ได้ และยังทำให้เซลล์มะเร็งในหนู mice เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อทำการให้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง CPT-11 เข้าไปในเซลล์ที่มีการยับยั้งการทำงานของ NF-κB (Wang CY *et al*., 1999)

สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิดพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาได้ รวมทั้งช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งดื้อยา เช่น สารสกัดจากพืช *Aframonum polyanthum*, *A. arundinaceum* และสารที่แยกได้ ได้แก่ galanals A and B, naringenin และ kaempferol-3,7,4'-trimethylether พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CEM/ADR5000 เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231-BCRP และเซลล์เนื้องอกสมอง U87MGΔEGFR ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อต่อยา doxorubicin ได้ (Kuete V *et al*., 2014) สาร Curcumin ซึ่งแยกได้จาก *Curcuma longa* (Zingiberaceae) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Glioma ที่ดื้อยาและทำให้เซลล์ดื้อยานั้นตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด cisplatin, etoposide, camptothecin และ doxorubicin ได้ ซึ่งมีกลไกผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ NF-κB และ AP-1 (Dhandapani KM *et al*., 2007) อีกทั้งสาร Curcumin ยังสามารถเพิ่มการตอบสนองของเซลล์มะเร็งตับ HA22T/VGH ต่อยา cisplatin และ doxorubicin ได้อีกด้วย (Notarbartolo M *et al*., 2005) นอกจากการยับยั้งผ่านทางวิถี NF-κB แล้ว สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ permeability glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์และมีหน้าที่ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์ เช่น สารสกัดของ *Curcuma aeruginosa* และ *Zingiber cassumunar* และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/ADR ที่ดื้อต่อยา daunomycin กลับมาตอบสนองต่อยา daunomycin ได้เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนให้ยาเคมีบำบัด (Kim HR *et al*., 2004; Chung SY *et al*., 2009) นอกจากนี้ สาร tetrahydrocurcumin ซึ่งเป็นสารหลักที่ได้จากการย่อย curcumin ในร่างกายสิ่งมีชีวิต พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ตัวหลักที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้ทั้ง 3ชนิด ได้แก่ P-glycoprotein (P-gp), mitoxantrone resistance protein (MXR) และ multidrug resistance protein 1 (MRP1) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาได้ (Limtrakul P *et al*., 2007)

เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกัน พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย เช่น จันทบุรี ระยอง และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลม และแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย จะมีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียง แกงป่า และผัดเผ็ด เป็นต้น ในอดีตเร่วหอมนิยมปลูกเพื่อเป็นพืชสวนครัวและปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย แต่ในปัจจุบัน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์มากขึ้น เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (http://www.kehakaset.com) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A, SiHa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เป็นต้น และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Wanichwatanadecha P *et al*., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าเร่วหอม ได้แก่ Methoxycinnamyl p-coumarate และ p-coumaric acid สามารถต้านการอักเสบได้โดยผ่านทางการยับยั้งวิถี NF-κB โดยไปลดการจับของ NF-κB กับดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ที่ลดลง ซึ่งพบว่าสาร Methoxycinnamyl p-coumarate จะเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ดีที่สุด (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) และเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากเหง้าเร่วหอมว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก NCI-H187 ได้ และได้มีการกล่าวถึงฤทธิ์ของสาร Methoxycinnamyl p-coumarate ว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในช่องปาก KB เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก NCI-H187 ได้และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ด้วย (Tachai S และ Nuntawong N, 2016)

จากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้ ทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเร่วหอมต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา โดยจะเลือกใช้เซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบมากที่สุดในหญิงไทย และพัฒนาให้เซลล์มะเร็งเหล่านี้เกิดการดื้อยา โดยใช้ตัวยาที่อยู่ในสูตรยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยจริง นอกจากนี้จะทำการศึกษาว่าสารสกัดสามารถเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้หรือไม่ เพื่อลดผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดในผู้ป่วย แล้วจึงศึกษาลึกลงไปถึงกลไกยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเร่วหอม โดยดูผลที่เกิดขึ้นต่อการทำงานของ NF-κB ตลอดจนระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยา เช่น ยีนในวิถี NF-κB, Bcl-2 family, IAPs, BRCA, ยีนที่เกี่ยวข้องกับ

drug metabolism (เช่น CYPs) และยีนที่เกี่ยวข้องกับ drug transporter (เช่น ABCs) ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ด้วย Real-time PCR และ Western blot analysis

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A รวมทั้งเซลล์มะเร็งดื้อยาทั้งสองชนิด จะถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสม 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.2 การทดสอบผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมหรือสารบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาด้วยวิธี MTT assay (Wanichwatanadecha P *et al*., 2012)

เซลล์มะเร็งจะถูกเลี้ยงใน 96-well plate ในสภาวะที่เหมาะสมและบ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นจะใส่สารทดสอบ ได้แก่ สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมหรือ 4-methoxycinnamaldehyde ซึ่งละลายด้วย DMSO ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ หลังจากนั้นบ่มเซลล์ไว้ 24 48 หรือ 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อครบเวลาแล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงที่มีสารละลาย MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBS ลงไป นำเซลล์กลับไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายผลึกสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 200 μl DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader แสดงผลที่ได้ในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารสกัด/ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารสกัด) X 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ร่วมกับยา Doxorubicin หรือยา Cisplatin เซลล์จะถูกเตรียมเพื่อประเมินร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยวิธี MTT assay เหมือนกันกับข้างต้น แต่จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดผสมกับยา Doxorubicin หรือ Cisplatin ที่ความเข้มข้นเท่ากับ IC_{50} เปรียบเทียบกับสภาวะที่มีสารสกัดหรือยา Doxorubicin/Cisplatin เพียงอย่างเดียว

3.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ในสภาวะที่มีสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมร่วมกับยาเคมีบำบัด

4.1.1 ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^R

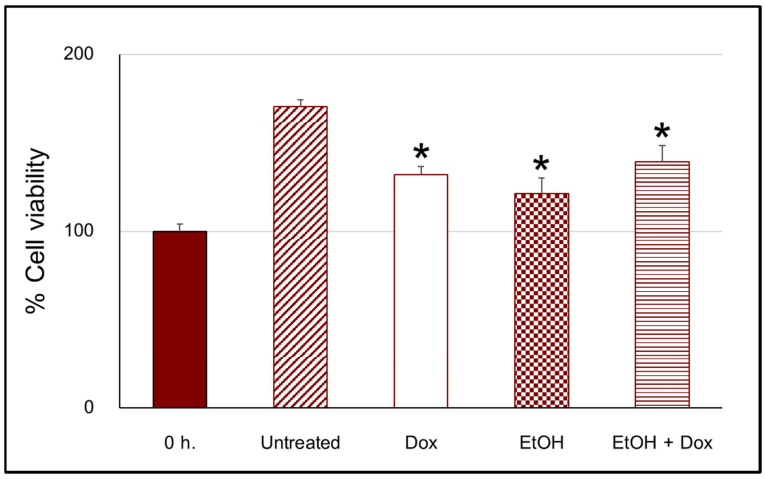
เมื่อทำการติดตามการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมตั้งต้นและเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาที่เลี้ยงในอาหารปกติเปรียบเทียบกับอาหารที่ผสมสารสกัดและ/หรือยา Doxorubicin บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง และทดสอบด้วยวิธี MTT (ภาพที่ 4-1 และ 4-2) โดยกำหนดให้สภาวะเลี้ยงในอาหารไม่ผสมสารทดสอบของเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ 0 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100% ผลการทดสอบพบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร DMEM ผสมยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} (ค่า IC_{50} ที่ 72 ชั่วโมง ประมาณ 0.3 μM) (ผาณตา เอี้ยวซิโป และเอกรัฐ ศรีสุข, 2560) มีการเจริญที่ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ที่ไม่ผสมสารทดสอบ (Untreated) โดยจะยิ่งลดลงมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม (ภาพที่ 4-1) สามารถวัดค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 132.02±4.44 181.12±9.29 และ 219.19±7.45 ตามลำดับ

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเจริญระหว่างเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาและเซลล์มะเร็งตั้งต้น โดยให้เซลล์ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงในอาหารผสมยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้นเดียวกันและบ่มด้วยเวลาที่เท่ากัน พบว่าเซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^R จะมีชีวิตเหลือรอดมากกว่าเซลล์ MDA-MB-231 ตั้งต้น (ภาพที่ 4-2) โดยที่ช่วงเวลาบ่ม 24 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ MDA-MB-231/Dox^R มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงกว่าเซลล์ MDA-MB-231 เท่ากับ 31.10% 97.32% และ 150.26% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความทนทานต่อยา Doxorubicin ของเซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^R มากกว่าเซลล์ตั้งต้นนั่นเอง

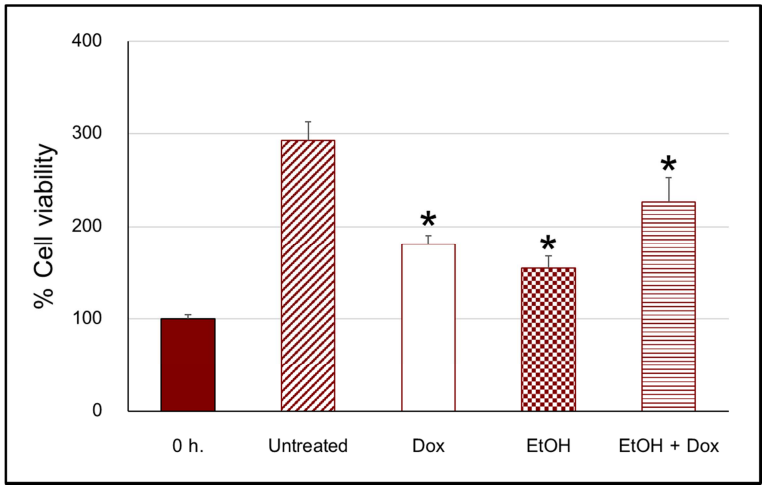
นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอม จะเห็นได้ว่า เซลล์มะเร็งเต้านมทั้งชนิดที่ดื้อยาและเซลล์มะเร็งตั้งต้น ที่ได้รับสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมความเข้มข้น 200 μg/ml เพียงอย่างเดียว มีการเจริญที่ลดลงเช่นเดียวกันกับเซลล์ที่ได้รับยา Doxorubicin เพียงอย่างเดียว และการยับยั้งจะแปรผันตามระยะเวลาในการบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^R ได้มากที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดจะได้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 322.42% และ 311.09% ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการทดสอบผลการทำงานร่วมกันของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและยา Doxorubicin พบว่า เซลล์มะเร็งที่ได้รับสารทั้งสองพร้อมกัน มีเปอร์เซ็นต์การเจริญที่สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหรือยาเพียงชนิดเดียว และพบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่มากขึ้นเมื่อทำการบ่มนานขึ้น ซึ่งพบแนวโน้มเช่นเดียวกันนี้ทั้งในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^R ซึ่งอาจสรุปได้ในเบื้องต้นว่า สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและยา Doxorubicin อาจจะไม่มีการทำงานร่วมกันในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ใช้ทดสอบ

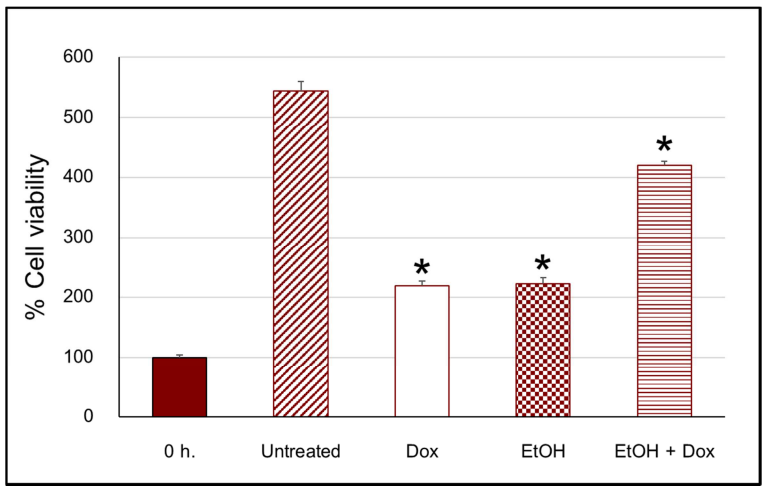
24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง

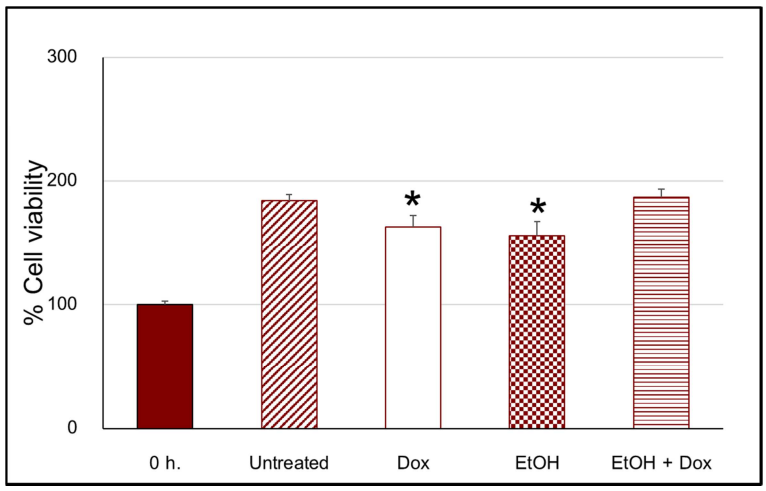


72 ชั่วโมง

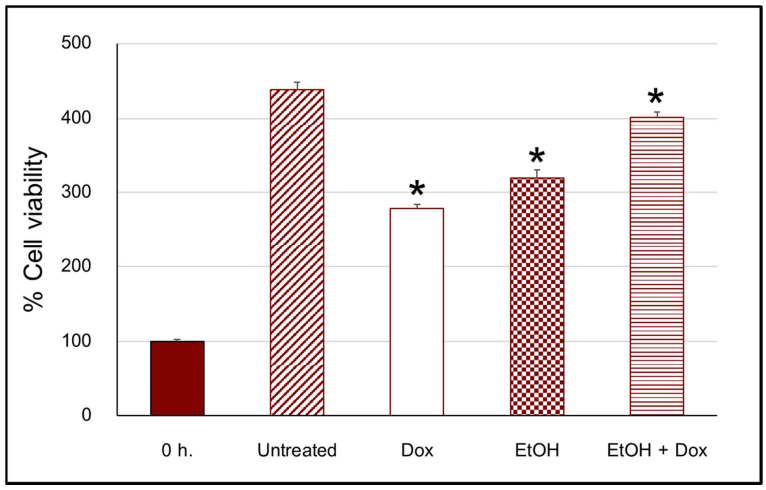


ภาพที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (p<0.05))

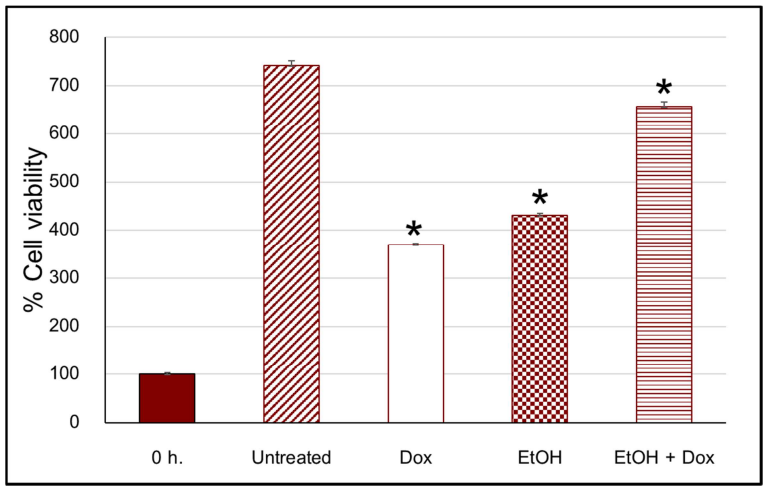
24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง



72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (p<0.05))

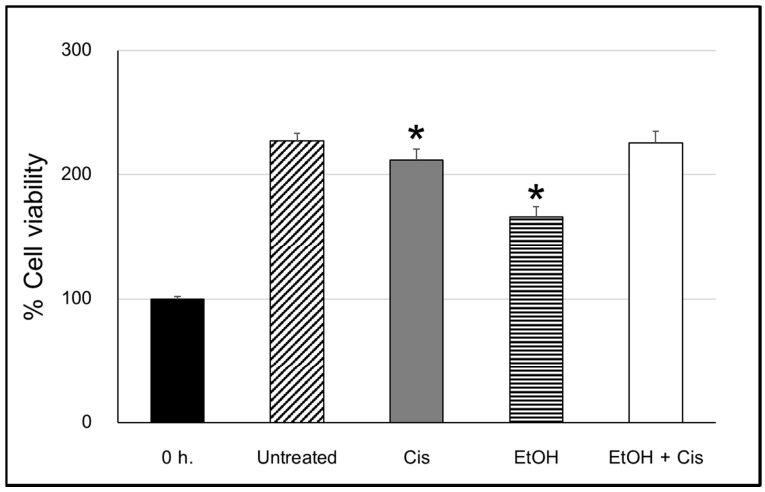
4.1.2 ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และ C33A/Cis^{R}

สำหรับผลการทดสอบการเจริญด้วยวิธี MTT ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ตั้งต้นและเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R} ที่เลี้ยงในอาหารปกติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและ/หรือยา Cisplatin บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-3 และ 4-4 โดยกำหนดให้สภาวะเลี้ยงในอาหารไม่ผสมสารทดสอบของเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ 0 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100% จากผลการทดลองพบว่า เซลล์มะเร็ง C33A ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร DMEM ผสมยา Cisplatin ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} (ค่า IC_{50} ที่ 72 ชั่วโมง ประมาณ 2 μM) (ผาณตา เอี้ยวชิโป และเอกรัฐ ศรีสุข, 2560) มีการเจริญที่ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ที่ไม่ผสมสารทดสอบ (Untreated) โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะยิ่งเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยที่ 24 ชั่วโมง ยับยั้งได้ 15.47% ที่ 48 ชั่วโมง ยับยั้งได้ 94.51% และที่ 72 ชั่วโมง ยับยั้งได้ 211.63% และเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยาที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ผสมยาที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ พบว่า Cisplatin ความเข้มข้น 2 μM ไม่สามารถลดความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งดื้อยา C33A/Cis^{R} ได้เลย (ภาพที่ 4-4) เนื่องจากเราพัฒนาให้เซลล์ดื้อยานี้สามารถทนทานยา Cisplatin ได้สูงถึง 10 μM นั่นเอง ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันให้เห็นถึงความสามารถในการทนทานต่อยา Cisplatin ของเซลล์ C33A/Cis^{R} ได้มากกว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A

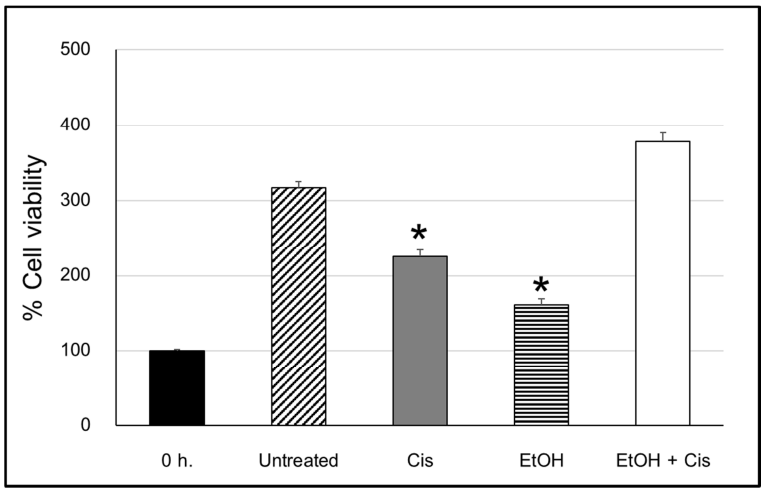
นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated) จะพบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งชนิดที่ดื้อยาและตัวตั้งต้นเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมความเข้มข้นเท่ากับ 200 μg/ml เพียงอย่างเดียว จะมีการเจริญที่ลดลงเช่นเดียวกันกับเซลล์ที่ได้รับยา Cisplatin เพียงอย่างเดียว และฤทธิ์จะแปรผันตามระยะเวลาในการบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A และ C33A/Cis^{R} ได้มากที่สุด ยับยั้งได้ 211.43% และ 201.28% ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการทดสอบการทำงานร่วมกันของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและยา Cisplatin ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดพบว่ามีแนวโน้มเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับผลที่ได้จากเซลล์มะเร็งเต้านมข้างต้น กล่าวคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้รับสารสกัดพร้อมกับยา Cisplatin จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญที่สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหรือยาเพียงชนิดเดียว และยังพบแนวโน้มว่าเซลล์จะมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มไว้นานขึ้น ซึ่งผลเช่นนี้แสดงให้เห็นทั้งในเซลล์มะเร็ง C33A และ C33A/Cis^{R} จึงอาจสรุปได้ในเบื้องต้นว่า สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและยา Cisplatin ไม่น่าจะมีการทำงานร่วมกันในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ใช้ทดสอบ

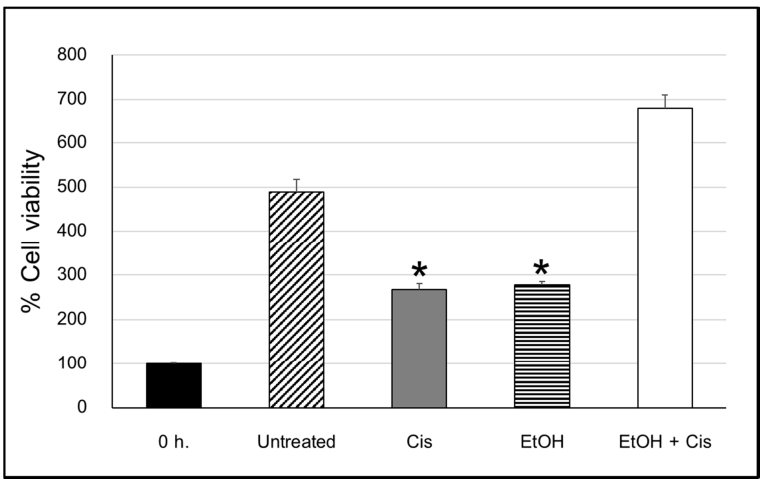
24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง

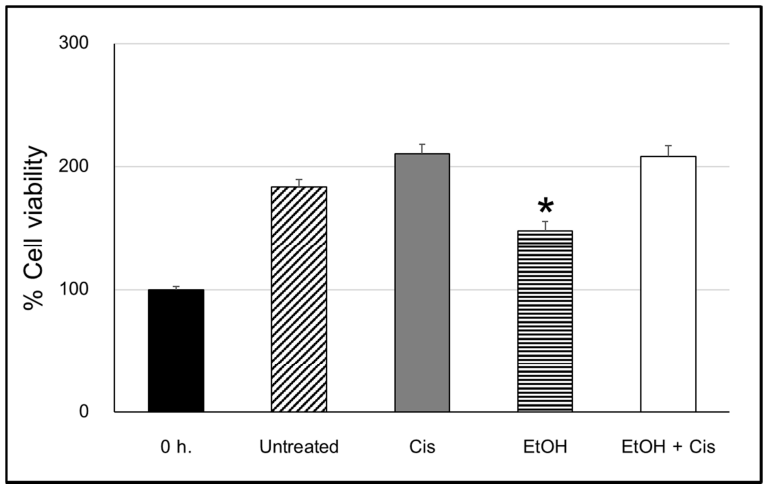


72 ชั่วโมง

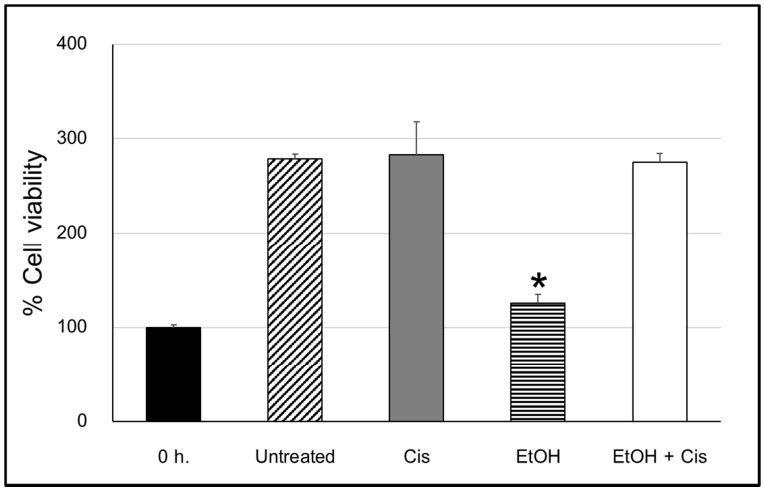


ภาพที่ 4-3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ได้รับยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 µg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ($p<0.05$))

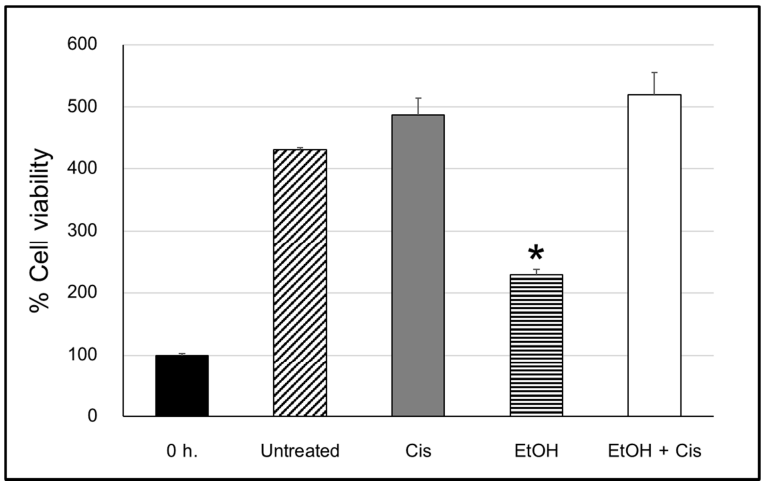
24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง



72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R} ที่ได้รับยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 μM หรือสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 200 μg/ml หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (p<0.05))

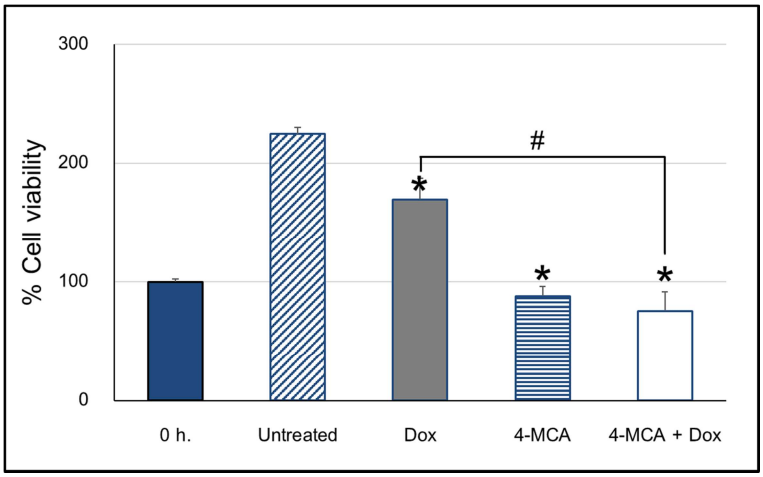
4.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ในสภาวะที่มีสาร 4-methoxycinnamaldehyde ร่วมกับยาเคมีบำบัด

4.2.1 ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R}

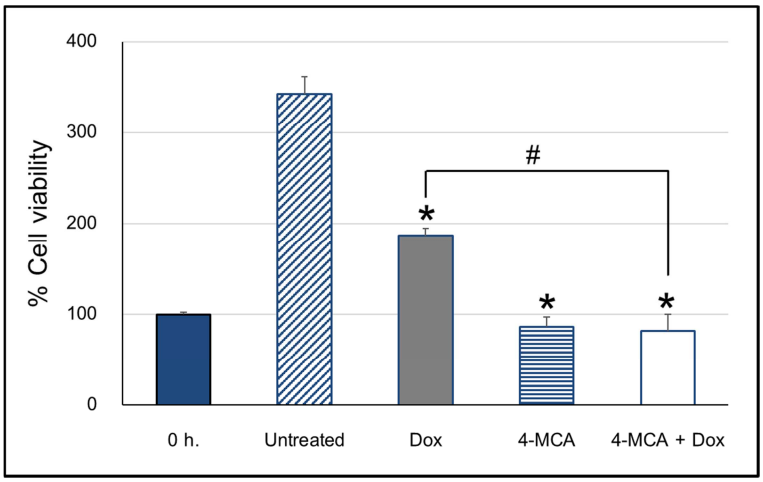
สำหรับการทดสอบผลของสาร 4-MCA ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมตั้งต้นและเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาที่เลี้ยงในอาหารปกติเปรียบเทียบกับอาหารที่ผสมสาร 4-MCA และ/หรือยา Doxorubicin บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ได้ผลดังภาพที่ 4-5 และ 4-6 โดยกำหนดให้สภาวะเลี้ยงในอาหารไม่ผสมสารทดสอบของเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ 0 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100% ผลการทดสอบด้วยวิธี MTT พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 80 μM เพียงอย่างเดียว มีการเจริญที่ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated) และเจริญได้น้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับยา Doxorubicin 0.3 μM เพียงอย่างเดียว อีกทั้งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจะแปรผันตามระยะเวลาในการบ่ม โดยที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสาร 4-MCA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 ได้เท่ากับ 136.28% 255.82% และ 473.48% และยับยั้งเซลล์ MDA-MB-231/Dox^{R} ได้เท่ากับ 137.09% 357.33% และ 747.87% ตามลำดับ

และเมื่อทำการทดสอบผลการทำงานร่วมกันของสาร 4-MCA และยา Doxorubicin พบว่าเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารทั้งสองพร้อมกันมีเปอร์เซ็นต์การเจริญที่ต่ำกว่าเซลล์ที่ได้รับยา Doxorubicin เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง การให้สารทั้งสองชนิดพร้อมกันยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยาได้มากกว่าการให้สาร 4-MCA เพียงอย่างเดียว โดยในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ได้รับสารทั้งสองชนิดพร้อมกันเป็นเวลา72 ชั่วโมง พบการเจริญได้เพียง 75.27±25.49% เทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยา Doxorubin หรือสาร 4-MCA เพียงอย่างเดียวที่เจริญได้ 304.20±28.03% และ 161.15±24.26% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสารเพียงชนิดเดียวมีการเจริญได้ 495.11±18.36% และ 131.21±7.48% ตามลำดับ และเมื่อได้รับสารทั้งสองร่วมกันพบการเจริญเพียง 85.30±11.54% จากผลการทดลองที่ได้นี้จึงอาจสรุปได้ในเบื้องต้นว่า สาร 4-MCA และยา Doxorubicin อาจจะมีการทำงานร่วมกันในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาที่ใช้ทดสอบ

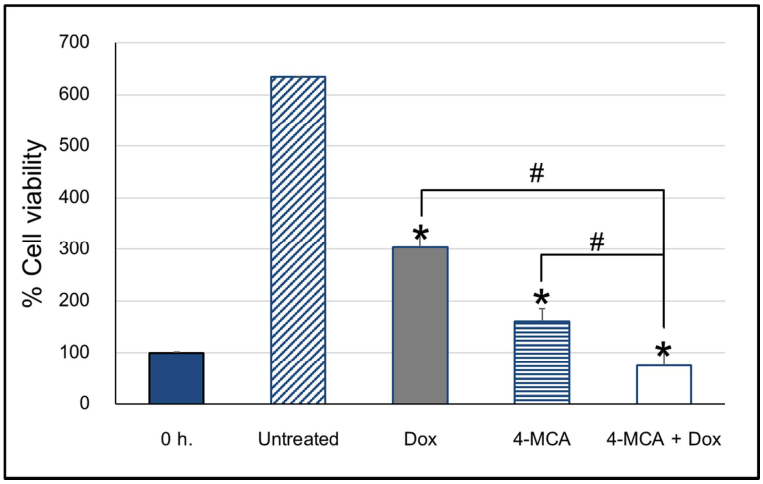
24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง

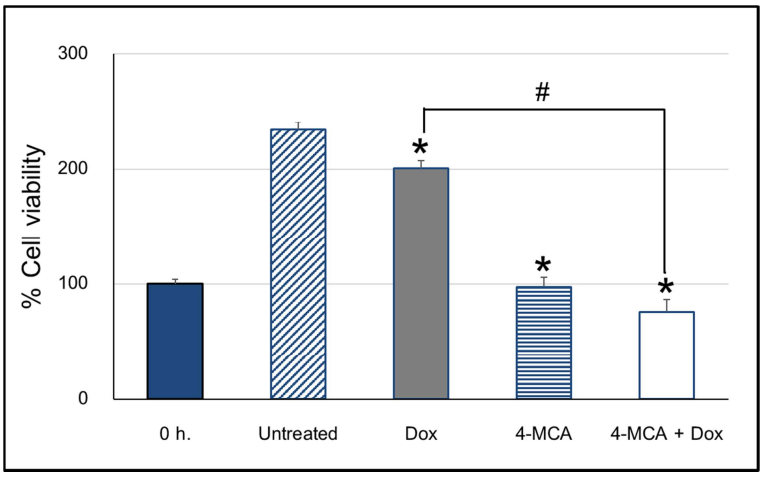


72 ชั่วโมง

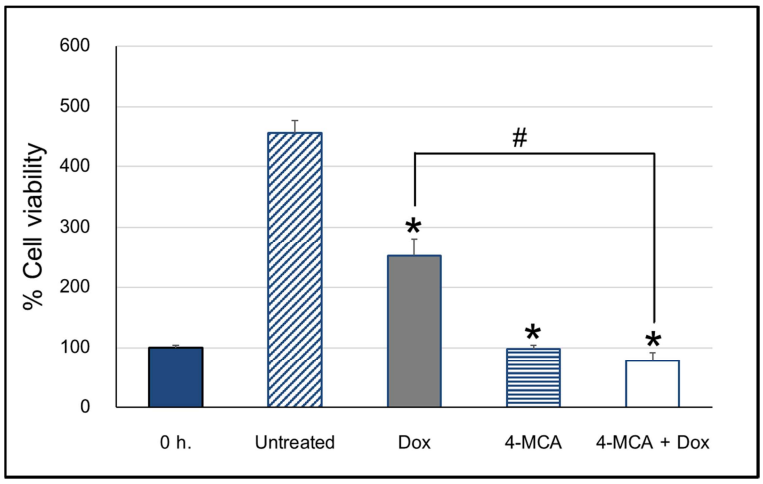


ภาพที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสาร 4-MCA ความเข้มข้น 80 µM หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสองชนิดพร้อมกัน ($p<0.05$))

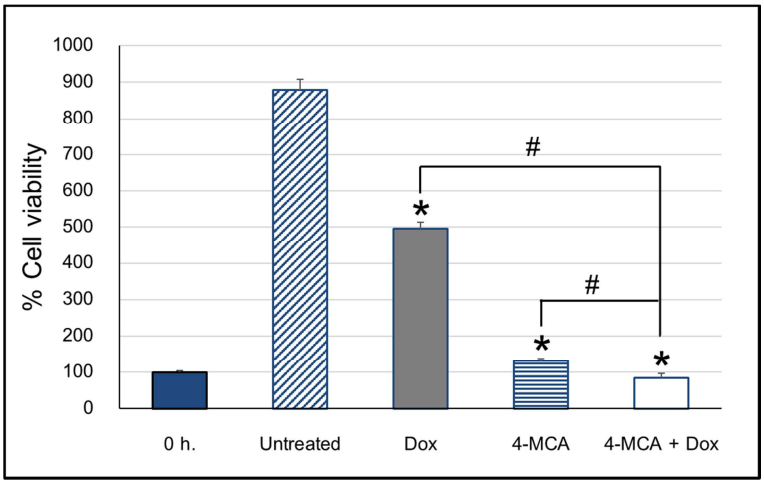
24 ชั่วโมง



48 ชั่วโมง



72 ชั่วโมง

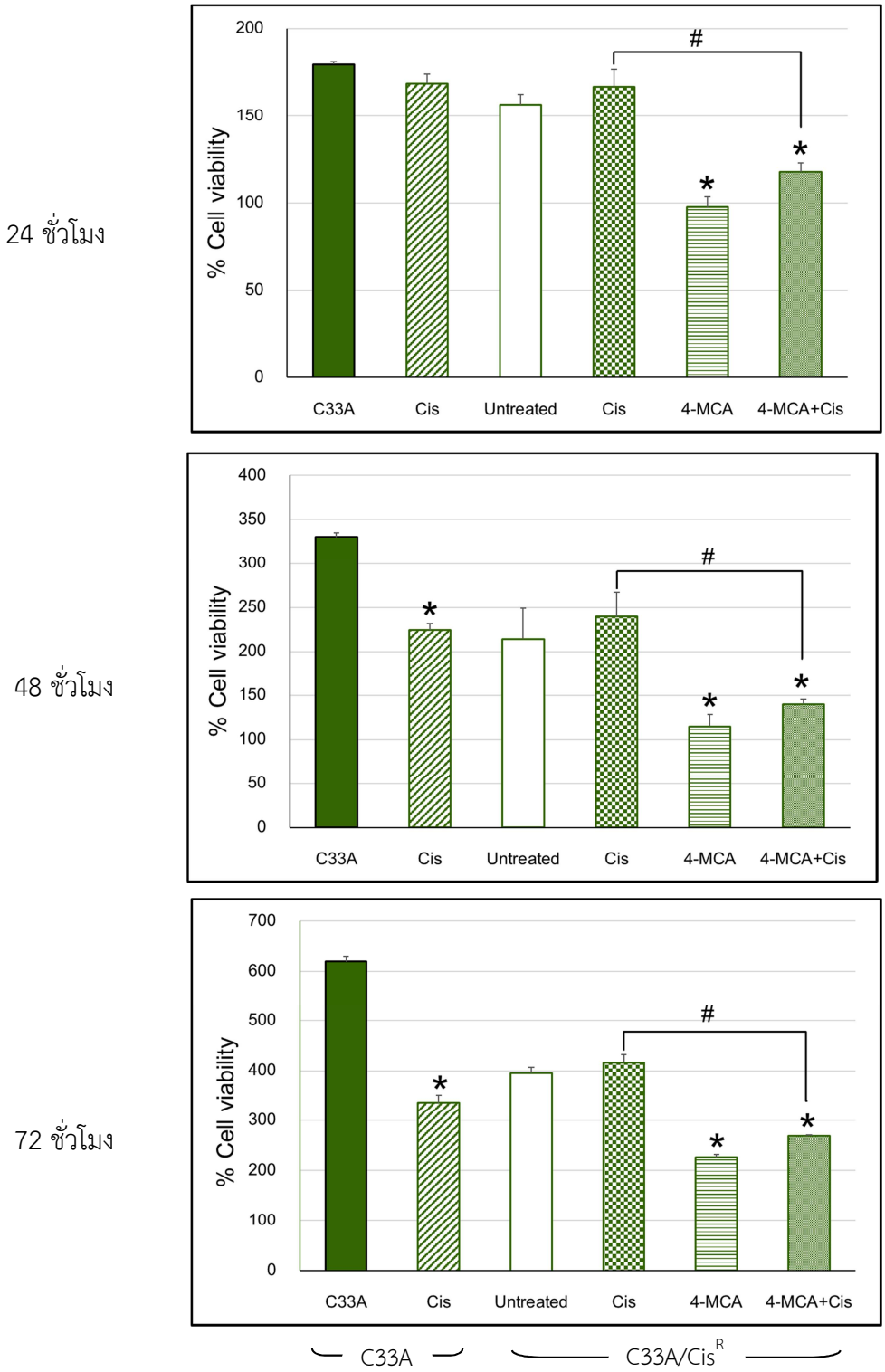


ภาพที่ 4-6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือสาร 4-MCA ความเข้มข้น 80 µM หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสองชนิดพร้อมกัน (p<0.05))

4.2.2 ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และ C33A/Cis^{R}

ผลจากการทดสอบ MTT เพื่อศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ตั้งต้นและเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R} ที่เลี้ยงในอาหารปกติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสาร 4-MCA และ/หรือยา Cisplatin บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-7 โดยกำหนดให้สภาวะเลี้ยงในอาหารไม่ผสมสารทดสอบของเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ 0 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100% จากผลการทดลองพบว่า เซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R} เมื่อได้รับสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 μM เพียงอย่างเดียว จะมีการเจริญที่ลดลงเช่นเดียวกันกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยา Cisplatin เพียงอย่างเดียว และฤทธิ์จะแปรผันตามระยะเวลาในการบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated) ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A/Cis^{R} ได้ 58.81% 99.36% และ 169.33% ตามลำดับ

นอกจากนี้ จากภาพที่ 4-7 จะเห็นได้ว่าการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A/Cis^{R} ในสภาวะที่มี Cisplatin 2 μM เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดการเจริญของเซลล์ได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ (untreated) ซึ่งต่างจากเซลล์มะเร็งตั้งต้น C33A ที่ไวต่อยา Cisplatin มากกว่า แต่เมื่อทำการผสม 4-MCA กับยา Cisplatin ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วบ่มเซลล์พร้อมกัน ผลพบว่า เซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยาที่ได้รับสารทั้งสองพร้อมกันมีการเจริญที่น้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับยา Cisplatin เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและแปรผันตรงกับเวลาที่บ่ม โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง การบ่มสาร 4-MCA ลงไปพร้อมกันกับยา Cisplatin สามารถเพิ่มการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A/Cis^{R} ได้มากกว่ายา Cisplatin เพียงอย่างเดียวถึง 49.03% และการยับยั้งจะเพิ่มเป็น 99.46% และ 146.98% เมื่อเราเพิ่มเวลาบ่มเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาผลของการทดสอบด้วย 4-MCA เพียงอย่างเดียวกับการใส่สารร่วมกันสองชนิด กลับพบว่า สาร 4-MCA เพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A/Cis^{R} ได้มากที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สภาวะที่ใช้ในการทดสอบอาจจะยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะต้องทำการปรับความเข้มข้นของสารหรือลำดับการใส่สารให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ดังนั้น จากผลการทดสอบที่ได้จากสภาวะทดสอบเช่นนี้จึงอาจสรุปได้ในเบื้องต้นว่า สาร 4-MCA และยา Cisplatin ยังไม่พบการทำงานร่วมกันแบบเด่นชัดในเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยาที่ใช้ทดสอบ



ภาพที่ 4-7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และ C33A/Cis^{R} ที่ได้รับยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM หรือสาร 4-MCA ความเข้มข้น 50 µM หรือได้รับทั้งสองสารร่วมกัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสองชนิดพร้อมกัน ($p<0.05$))

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาที่ผ่านมาที่ทางทีมวิจัยของเราได้พยายามค้นหาสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกันกับขมิ้น และได้เคยรายงานถึงสารที่น่าจะมีส่วนในการแสดงฤทธิ์นี้คือ สาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) (Wanichwatanadecha et al, 2016; ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา และคณะ, 2558; ผาณตา เอี้ยวซิโปและคณะ, 2559; lawsipo et al, 2018) อีกทั้งเมื่อเร็วๆ นี้เราได้พบว่า นอกจากสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-MCA จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาเคมีบำบัด Doxorubicin หรือ Cisplatin ซึ่งเราพัฒนาขึ้นมาจากเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้ได้อีกด้วย (ผาณตา เอี้ยวซิโป และเอกรัฐ ศรีสุข, 2560; ผาณตา เอี้ยวซิโป และรสสุคนธ์ พูลบุตร, 2562) และในงานวิจัยครั้งนี้ ผลการทำงานร่วมกันในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-MCA กับยาเคมีบำบัดได้ถูกทดสอบ

จากผลการทดสอบ (ภาพที่ 4-1 ถึง 4-4) จะเห็นได้ว่า การใช้สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมเพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ได้ทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา แต่เมื่อทำการบ่มสารสกัดพร้อมกันกับยาเคมีบำบัด Doxorubicin หรือ Cisplatin กลับพบว่าไม่สามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} และ C33A/Cis^{R} ได้มากกว่าการใช้ยาเคมีบำบัดหรือสารสกัดเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและยาเคมีบำบัด Doxorubicin และ Cisplatin นั้นมีกลไกการทำงานในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน ดังที่เคยมีรายงานว่า ยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่รวมถึงยาเคมีบำบัดทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทดสอบ มีกลไกการฆ่าเซลล์มะเร็งผ่านทางการเพิ่มระดับ reactive oxygen species (ROS) ให้สูงขึ้น เพื่อกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ (Yang et al., 2018) ในขณะที่สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมเคยมีการรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Srisook et al., 2018) ซึ่งอนุมูลอิสระพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งและการรักษาลักษณะความเป็นเซลล์มะเร็งไว้ (Wang and Yi, 2008) อีกทั้งยังพบว่า การมีอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่มากเกินไปจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ caspase ถูกยับยั้ง ซึ่งส่งผลให้การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ด้วยยาเคมีบำบัดถูกขัดขวางไปด้วย และเกิดการดื้อต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งในที่สุด (Singh K et al., 2018; Kim et al., 2001; Chen, (2014).) ซึ่งสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมอาจใช้กระบวนการลดความเครียดออกซิเดชั่นนี้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกันกับที่พบในสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น วิตามินซี วิตามินอี หรือเบต้า-แคโรทีน (Wang and Yi, 2008)

สำหรับสาร 4-MCA ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A รวมทั้งเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ถูกพัฒนาขึ้นจากเซลล์มะเร็งตั้งต้นทั้งสองชนิดข้างต้น แต่สำหรับการทดสอบร่วมกับยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยานั้นให้ผลที่แตกต่างกันกับที่พบในเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา กล่าวคือ ในเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสาร 4-MCA พร้อมกันกับยา Doxorubicin มีการเจริญได้เพียง 85.30±11.54% (72 ชั่วโมง) ซึ่งน้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับสารอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ (หากได้รับยา Doxorubicin เจริญได้ 495.11±18.36% ในขณะที่หากได้รับสาร 4-MCA เจริญได้ 131.21±7.48%) และแปรผันตามระยะเวลาในการบ่มที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-6) แต่สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A/Cis^{R} กลับไม่พบผลการยับยั้งร่วมที่เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้สาร 4- MCA เพียงอย่างเดียว พบเพียงการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นจากระดับที่ใช้ยา Cisplatin เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-7) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยามีค่าความสามารถในการดื้อต่อยา หรือ Resistance Index (RI) ที่ต่ำกว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยาเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น กล่าวคือ เซลล์ MDA-MB-231/Dox^{R} มีค่า RI ต่อยา Doxorubicin เท่ากับ 1.36 ในขณะที่เซลล์ C33A/Cis^{R} มีค่า RI ต่อยา Cisplatin เท่ากับ 2.37 (ผาณตา เอี้ยวซิโป และเอกรัฐ ศรีสุข, 2560) จึงเป็นไปได้ว่า สภาวะที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารหรือระยะเวลาในการบ่ม รวมทั้งลำดับการบ่มสาร อาจจะยังไม่เหมาะสมกับการยับยั้งเซลล์ C33A/Cis^{R} หรือสาร 4-MCA อาจจะไม่สามารถทำงานร่วมกันกับยา Cisplatin ได้เหมือนกับยา Doxorubicin ซึ่งต้องทำการทดสอบต่อไป

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปในเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-MCA มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยาได้ แต่อาจมีกลไกในการยับยั้งที่แตกต่างจากยา Doxorubicin หรือ Cisplatin ซึ่งส่งผลต่อการทำงานร่วมกันกับยาเคมีบำบัด อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบได้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของการใช้สาร 4-MCA ร่วมกันกับยา Doxorubicin ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด Triple negative ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีอื่นนอกจากการใช้ยาเคมีบำบัดเท่านั้น ทำให้พบการดื้อต่อยาเคมีบำบัดและอัตราการกลับมาเป็นซ้ำที่สูง (Chalakur-Ramireddy and Pakala, 2018) ดังนั้น สาร 4-MCA จึงมีศักยภาพที่จะถูกนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมชนิดนี้ต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้บ่มเช่นเดียวกันกับการใช้ยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM เพียงอย่างเดียว ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33 ที่ไม่ดื้อยา ตามลำดับ

2. สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้มากกว่าการใช้ยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM หรือยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM เพียงอย่างเดียว ในเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} และเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33/Cis^{R} ตามลำดับ

3. สาร 4-MCA ที่ความเข้มข้น 80 µM สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้บ่มเช่นเดียวกันกับการใช้ยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.3 µM เพียงอย่างเดียว และยับยั้งเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231/Dox^{R} ได้ดีกว่าการใช้ยา Doxorubicin เพียงอย่างเดียว

4. สาร 4-MCA ที่ความเข้มข้น 50 µM สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้บ่มเช่นเดียวกันกับการใช้ยา Cisplatin ความเข้มข้น 2 µM เพียงอย่างเดียว และยับยั้งเซลล์มะเร็ง C33/Cis^{R} ได้ดีกว่าการใช้ยา Cisplatin เพียงอย่างเดียว

5. การบ่มสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมพร้อมกับยาเคมีบำบัด Doxorubicin หรือ Cisplatin ทำให้เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบมีการเจริญมากกว่าการใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงชนิดเดียว

6. สาร 4-MCA เมื่อบ่มพร้อมกันกับยาเคมีบำบัด Doxorubicin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ได้ดีกว่าการใช้สาร 4-MCA หรือยา Doxorubicin เพียงอย่างเดียว

7. สาร 4-MCA เมื่อบ่มพร้อมกันกับยาเคมีบำบัด Cisplatin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33/Cis^{R} ได้ดีกว่าการใช้ยา Cisplatin เพียงอย่างเดียว แต่ด้อยกว่าการใช้สาร 4-MCA เพียงอย่างเดียว

ผลผลิต (Output)

Manuscript เรื่อง Synergistic inhibition of 4-methoxycinnamaldehyde and doxorubicin in chemo-resistant cancer cells. โดย Iawsipo, P*, Srisook, E, Poonbud, R, and Panprasert, J. อยู่ในระหว่างเตรียมเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติ Oncology letters

บรรณานุกรม

คณินทร์ รังสาดทอง. (2014). โปรตีน ABC transporter และการดื้อยาในโรคมะเร็ง. *Thammasat Medical Journal*. 14(3):431-42.

พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.

พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.

สถิติสาธารณสุข. (2556). สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา เอกรัฐ ศรีสุข และ มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. (2558). การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ผาณตา เอี้ยวซิโป เอกรัฐ ศรีสุข มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล และ อนันต์ อธิพรชัย (2559). การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ผาณตา เอี้ยวซิโป และ เอกรัฐ ศรีสุข (2560). ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าเร่วหอมต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. 2554. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. 2555. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

Broxterman HJ, Gotink KJ, Verheul HM. (2009). Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. *Drug Resist Updat.* 12(4-5):114-26.

Chalakur-Ramireddy, N. K. R., & Pakala, S. B. (2018). Combined drug therapeutic strategies for the effective treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Biosci Rep*, *38*(1), pii: BSR20171357.

Chen C, Shen HL, Yang J, Chen QY, Xu WL. (2011). Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137(1):9-17.

Chen J. (2014). Reactive Oxygen Species and Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Austin J Clin Pathol.;*1(4): 1017.

Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M, et al. (2002). Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 63(9):1709-16.

Chung SY, Han AR, Sung MK, Jung HJ, Nam JW, Seo EK, et al. (2009). Potent modulation of P-glycoprotein activity by naturally occurring phenylbutenoids from Zingiber cassumunar. *Phytother Res.* 23(4):472-6.

Coley HM. (2008). Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 34(4):378-90.

Das KC, White CW. (1997). Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*. 272(23):14914-20.

Debata PR, Castellanos MR, Fata JE, Baggett S, Rajupet S, Szerszen A, et al. (2013). A novel curcumin-based vaginal cream Vacurin selectively eliminates apposed human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*. 129(1):145-53.

Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. (2007). Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *J Neurochem.* 102(2):522-38.

Elkady AI, Abuzinadah OA, Baeshen NA, Rahmy TR. (2012). Differential control of growth, apoptotic activity, and gene expression in human breast cancer cells by extracts derived from medicinal herbs Zingiber officinale. *J Biomed Biotechnol*. 2012:614356.

Godwin P, Baird AM, Heavey S, Barr MP, O'Byrne KJ, Gately K. (2013). Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol.* 3:120.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 118(3):285-96.

http://www.cancer.org

http://www.chulacancer.net

http://www.kehakaset.com

http://www.thaibreastcancer.com

Iawsipo P, Srisook E, Ponglikitmongkol P, Somwang T, Singaed O. (2018). Cytotoxic effects of *Etlingera pavieana* rhizome on various cancer cells and identification of a potential anti-tumor component. *J. Food Biochem*. *42*(4); e12540. doi: 10.1111/jfbc.12540

Kim HR, Nam JW, Lee HJ, Seo EK, Chung SY. Jeong YH, et al. (2004). P-glycoprotein inhibitory activity of Indonesian medicinal plants in human breast cancer cells. *Natural Product Sciences.* 10(6):268-71.

Kim PK, Mahidhara R, Seol DW**.** (2001). The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 4(5):293-6.

Kuete V, Ango PY, Yeboah SO, Mbaveng AT, Mapitse R, Kapche GD, et al. (2014). Cytotoxicity of four *Aframomum* species (*A. arundinaceum, A. alboviolaceum, A. kayserianum and A. polyanthum*) towards multi-factorial drug resistant cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med.* 14:340.

Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, et al. (2007). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. *Clin Cancer Res.* 13(11):3423-30.

Limtrakul P, Chearwae W, Shukla S, Phisalphong C, Ambudkar SV. (2007). Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol Cell Biochem.* 296(1-2):85-95.

Liu CM, Kao CL, Tseng YT, Lo YC, Chen CY. (2017). Ginger Phytochemicals Inhibit Cell Growth and Modulate Drug Resistance Factors in Docetaxel Resistant Prostate Cancer Cell. *Molecules.* 22(9). pii: E1477. doi: 10.3390/molecules22091477.

Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. (2004). Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell.* 6(3):297-305.

Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins.* 2(11):2490-518.

Notarbartolo M, Poma P, Perri D, Dusonchet L, Cervello M, D'Alessandro N. (2005). Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Lett.* 224(1):53-65.

Palachot M. (2012). Investigation of anti-inflammatory activity and molecular mechanism of the action of selected zingiberaceae plant extract. Master thesis. Biological science Faculty of Science, Burapha University.

Rahman S, Salehin F, Iqbal A. (2011). In vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. *BMC Complement Altern Med.* 11:76.

Sabli F, Mohamed M, Rahmat A, Abu Bakar MF. (2012). Cytotoxic Properties of Selected *Etlingera* spp. and *Zingiber* spp. (Zingiberaceae) Endemic to Borneo. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 35(3): 663-71.

Sahin K, Tuzcu M, Basak N, Caglayan B, Kilic U, Sahin F, et al. (2012). Sensitization of Cervical Cancer Cells to Cisplatin by Genistein: The Role of NFκB and Akt/mTOR Signaling Pathways. *J Oncol.* 2012:461562.

Samarghandian S, Hadjzadeh MA, Afshari JT, Hosseini M. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptotic by ethanolic extract of Alpinia galanga rhizhome in human breast carcinoma cell line. *BMC Complement Altern Med*. 14: 192.

Singh K, Bhori M, Kasu YA, Bhat G, Marar T. (2018). Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity - Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm J.*; 26(2):177-190.

Sinha D, Biswas J, Sung B, Aggarwal BB, Bishayee A. (2012). Chemopreventive and chemotherapeutic potential of curcumin in breast cancer. *Curr Drug Targets*. 13(14):1799-819.

Smith L, Watson MB, O'Kane SL, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L. (2006). The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther.* 5(8):2115-20.

Srisook K, Udompong S, Sawai P, Thongyen T**.** (2018). *Etlingera pavieana* rhizome extract decreases oxidative stress and activates eNOS activity via stimulation of Akt phosphorylation in human endothelial cells. *Naresuan Phayao J.* 11(1):23-28.

van Wijngaarden J, van Beek E, van Rossum G, van der Bent C, Hoekman K, van der Pluijm G, et al. (2007). Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF-kappaB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. *Eur J Cancer*. 43(2):433-42.

Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, Varghese M, Karunagaran D. (2005). Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol Carcinog.* 44(1):51-9.

Vinothkumar R, Vinothkumar R, Sudha M, Nalini N. (2014). Chemopreventive effect of zingerone against colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Eur J Cancer Prev*. 23(5):361-71.

Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*. 5(4):412-7.

Wang J, and Yi J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*. 7(12):1875-84.

Wanichwatanadecha P, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J, Ponglikitmongkol M. (2012). Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*I on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J Gen Virol*. 93(Pt 5):1081-92.

Wanichwatanadecha P, Srisook E, Ponglikitmongkol M, Somwang T, Singaed O. (2016). Anti-cancer effect of *Etlingera pavieana* rhizome extracts. Proceedings of The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21st – 23rd January 2016. Khon Kaen, Thailand.

Weldon CB, Burow ME, Rolfe KW, Clayton JL, Jaffe BM, Beckman BS. (2001). NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery.* 130(2):143-50.

Wright JC. (1985). Update on cancer chemotherapy: general considerations and breast cancer. Part II. *J Natl Med Assoc.* 77(9):691-703.

Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW. (2005). Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. *J Immunol*. 174(3):1647-56.

Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 37(1):266.

Yu S, and Garcia AA. (2015). Advancements in recurrent and metastatic cervical cancer. *Am J Hematol Oncol.* 11(1):26-31.