รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ที่ดื้อต่อยา 5-fluorouracil

Potentiating effect of oxymatrine and cyclopamine in combination with 5-fluorouracil on 5-fluorouracil-resistant human colorectal cancer cell lines

อ.สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ

สัญญาเลขที่ 18/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ที่ดื้อต่อยา 5-fluorouracil

Potentiating effect of oxymatrine and cyclopamine in combination with 5-fluorouracil on 5-fluorouracil-resistant human colorectal cancer cell lines

อ.สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน

ส่วนงาน

สาขาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยเรื่อง ผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ที่ดื้อต่อยา 5-fluorouracil (Potentiating effect of oxymatrine and cyclopamine in combination with 5-fluorouracil on 5-fluorouracil-resistant human colorectal cancer cell lines) งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 18/2559 และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุน สถานที่ทำวิจัย และเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ : 18/2559

ชื่อโครงการ : ผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ที่ดื้อต่อยา 5-fluorouracil

ชื่อนักวิจัย : อ.สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail address : suwisit@buu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นชนิดของมะเร็งที่พบได้ทั่วไปในโลก เริ่มต้นจากเซลล์ที่บุอยู่ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย โดยยา 5-ฟลูออโรยูราซิลเป็นยาเคมีบำบัดตัวแรกที่นำมาใช้สำหรับการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก อย่างไรก็ตามอัตราการตอบสนองของยานี้ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะสุดท้ายประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์และนำไปสู่การรักษาด้วยยานี้ที่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องมาจากการดื้อต่อยาเคมีบำบัด ดังนั้นการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่สำหรับเพิ่มอัตราการตอบสนองหรือลดการดื้อต่อยา 5-ฟลูออโรยูราซิล จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากสำหรับการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก สาร oxymatrine เป็นสารสำคัญที่พบได้ในพืช *Sophora flavescens* ก่อนหน้านี้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารชนิดนี้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine และผลเสริมฤทธิ์ของสาร oxymatrine และยา 5-ฟลูออโรยูราซิล ต่อการรอดชีวิต, การเจริญเป็นโคโลนี, การเคลื่อนที่, การลุกลามและตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MMP-9 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 ได้อย่างมีนัยสำคัญ หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สาร oxymatrine และยา 5-ฟลูออโรยูราซิลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 มากกว่าการทดสอบด้วยยา 5-FU เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้สาร oxymatrine ยังสามารถลดการเจริญเป็นโคโลนี, การเคลื่อนที่และการลุกลามผ่านทางการลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-9 ในเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารต้านมะเร็งที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อที่จะลดการดื้อต่อยา 5-ฟลูออโรยูราซิลในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งอาจจะมีประโยชน์สำหรับผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่รักษาด้วยยา 5-ฟลูออโรยูราซิล

คำสำคัญ : 5-ฟลูออโรยูราซิล, มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก, การเคลื่อนที่, การลุกลาม

Abstract

Project Title : Potentiating effect of oxymatrine and cyclopamine in combination with 5-fluorouracil on 5-fluorouracil-resistant human colorectal cancer cell lines

Investigator : Suwisit manmuan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University

E-mail Address : suwisit@buu.ac.th

Project period : 1 year

Colorectal cancer (CRC) is the most common cancer in the world beginning of the cell lining of the colon and rectum 5-fluorouracil (5-FU) which is a first-line therapy for colorectal cancer patients. However, the response rate of 5-FU in advanced colorectal cancer patients is 10-15% and becomes the 5-FU therapy failure due to drug resistance. Therefore, the development of the new anticancer compound for improving the response rate or reverse resistance to 5-FU is urgently needed. Oxymatrine is a major component of *Sophora flavescens*. Recently, many pharmacological effects have been exhibited. The objectives of the present study were to investigate the anticancer activity of oxymatrine as well as to potentiate the effect of oxymatrine with 5-FU on cell viability, colony-forming, cell migration, cell invasion, and determined MMP-9 protein expression in SW-620 colorectal cancer cells. The results demonstrated that oxymatrine significantly inhibited cell viability of SW-620 cells after 24, 48, and 72 hours treatment. Oxymatrine and 5-FU interaction were synergistically greater in inhibiting the cell survival of SW-620 cells than 5-FU alone. Oxymatrine also decreased colony formation, cell migration, and cell invasion through reducing the level of MMP-9 protein in SW-620 cells. These first findings elucidated efficacious anticancer agent which derived from natural sources to overcome a 5-FU resistance in colorectal cancer and may be beneficial for the patients with colorectal cancer treated with 5-FU.

Keywords : 5-fluorouracil, colorectal cancer, migration, invasion

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
บทที่ 1 บทนำ	11
- 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	11
- 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	13
- 1.3 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	13
- 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	14
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
- 2.1 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	15
- 2.2 การแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่	16
- 2.3 การวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่	17
- 2.4 การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	18
- 2.5 อาการข้างเคียงจากการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	20
- 2.6 ปัญหาของการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	21
- 2.7 Oxymatrine	23
- 2.8 Cyclopamine	24
- 2.9 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27

- 3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 และเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 27
- 3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine และ cyclopamine ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT cell viability assay 27
- 3.3 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Drug combination assay 28
- 3.4 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug toxicity testing 29
- 3.5 การศึกษาความเป็นพิษของ cyclopamine ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug toxicity testing 30
- 3.6 การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค colony formation assay 30
- 3.7 การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 31
- 3.8 การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 31
- 3.9 การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 โดยใช้เทคนิค Enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) 32

บทที่ 4 ผลการวิจัย

- 4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 35
- 4.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 ที่ทดสอบด้วย cyclopamine 36
- 4.3 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 ที่ทดสอบด้วย Oxymatrine 37
- 4.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก SW-620 cells ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay 38
- 4.5 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Drug combination assay 39
- 4.6 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของสาร oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบบลาส (fibroblast) ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug combination toxicity testing 41
- 4.7 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และยา 5-fluorouracil ต่อการเจริญเป็น colony ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Colony formation assay 42
- 4.8 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Scratch assay 43
- 4.9 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay 45
- 4.10 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค ELISA 46
- 4.11 การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร cyclopamine ต่อ 47

การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay

- 4.12 การศึกษาความเป็นพิษของ cyclopamine ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค drug toxicity testing 48
- 4.13 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ cyclopamine และยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Drug combination assay 49
- 4.14 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ cyclopamine และยา 5-fluorouracil ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค scratch assay 50
- 4.15 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells เมื่อทดสอบด้วยสาร cyclopamine และ cyclopamine+5-fluorouracil โดยใช้เทคนิค matrigel invasion assay 51

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 52

ผลการวิจัยที่ได้ 56

ผลผลิต 57

รายงานสรุปการเงิน 58

บรรณานุกรม 59

ภาคผนวก 63

ประวัตินักวิจัยและหน่วยงานสังกัด 64

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 แสดงระยะของมะเร็งและลักษณะอาการที่พบได้ 17

ตารางที่ 3.2 แสดง Dilution of Hu MMP-9 standard 32

ตารางที่ 3.3 แสดงการ Dilution of Streptavidin-HRP (100x) 33

สารบัญภาพ (List of illustrations)

รูปภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางกายวิภาคของลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum 16

ภาพที่ 2 แสดงระยะของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 17

ภาพที่ 3 แสดงกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง 25

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด 35

SW-620 cells ที่กำลังขยาย 100x

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญ โดยในแต่ละปีผู้ป่วยประมาณ 800,000 คนจะถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ในประเทศสหรัฐอเมริกาจะพบมะเร็งชนิดนี้ได้บ่อยเป็นลำดับที่ 3 ทั้งในผู้ชายและผู้หญิง **(1)** โดยมะเร็งชนิดนี้จะพบได้มากในผู้ที่อายุมากกว่า 50 ปี และบุคคลที่รับประทานอาหารที่มีไขมันสูง (high-fat diet), แคลอรี่สูงและอาหารที่มีกากใยน้อย (low fiber diet) รวมถึงปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งชนิดนี้ ประกอบด้วย สิ่งแวดล้อม, พฤติกรรมการบริโภค, การออกกำลังกายน้อย, พฤติกรรมการสูบบุหรี่, การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นมะเร็งทั้งในบุคคลและครอบครัว เช่น ประวัติการเป็นมะเร็งรังไข่, มดลูก, เต้านมและผู้ป่วยที่เคยมีประวัติการเป็นโรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) มาก่อน **(2)** โดยลักษณะอาการของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่พบในผู้ป่วย ประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงการทำงานและการเคลื่อนไหวของลำไส้ เช่น ท้องอืด, ท้องเฟ้อ, ท้องเดิน, อาการท้องผูก (constipation), อาการท้องเสีย (diarrhea), อุจจาระมีเลือดปน, น้ำหนักตัวลดลงโดยไม่ทราบสาเหตุ, อาการอ่อนเพลียและอาการอาเจียน สำหรับการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในปัจจุบัน ประกอบด้วยการผ่าตัดส่วนของลำไส้ใหญ่และทวารหนักเพื่อช่วยบรรเทาอาการของโรค, การฉายแสง และการรักษาร่วมกันระหว่างการฉายแสงและยาเคมีบำบัดในรายที่มีการกระจายตัวของก้อนมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ **(3)**

การดื้อต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการรักษามะเร็งในปัจจุบัน โดยกลไกการดื้อต่อยาต้านมะเร็งมีหลายกลไก อาทิเช่น การเพิ่มจำนวนและการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นเป้าหมายของยา, การเปลี่ยนแปลงการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา, การเพิ่มกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) หรือการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีนที่เป็นสาเหตุของการดื้อยา เนื่องจากยา 5-Fluorouracil เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยยาชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ ในขณะที่กลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของยานี้จะผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase ทำให้ยับยั้งการสร้าง deoxythymidine monophosphate (dTMP) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการ DNA replication และ DNA repair ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง DNA และ RNA **(4)** ซึ่งการแสดงออกที่เปลี่ยนไปของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา 5-fluorouracil และสามารถพัฒนา

ไปสู่การดื้อต่อยาชนิดนี้ได้ ซึ่งยา 5-fluorouracil เป็นยาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในทางคลินิก แต่อย่างไรก็ตามปัญหาการดื้อต่อยายังคงเกิดขึ้นในผู้ป่วย มีการศึกษาก่อนหน้าพบการใช้ยา 5-fluorouracil ร่วมกับยาต้านมะเร็งชนิดอื่นๆสามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองต่อยาได้เพิ่มขึ้น จาก 10-15 % เป็น 40-50% **(5)** ดังนั้นการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยา 5-fluorouracil เพื่อลดการดื้อต่อยา จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา

Oxymatrine เป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรจีนที่มีชื่อว่า *Sophora Flavescens Ait* ซึ่งเคยมีการใช้กันมากในการรักษาโรคหลายชนิด เนื่องจากสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น การรักษาการติดเชื้อ hepatitis B virus **(6)**, โรค hepatic fibrosis **(7)**, ฤทธิ์ต้านการอักเสบและควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน **(8)** เคยมีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของ oxymatrine ในมะเร็งหลายชนิด เช่น human gastric cancer cells **(9)**, human breast cancer cells **(10)** นอกจากนี้ oxymatrine ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis ใน human hepatoma cells ผ่านทางการยับยั้ง cell cycle ในระยะ G2/M และ S phase โดยยับยั้งการแสดงออกของ anti-apoptotic BCL-2 gene และเพิ่มการแสดงออกของ p53 ซึ่งมีความสำคัญในการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis **(11)** เช่นเดียวกับการศึกษาในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่า oxymatrine สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ชนิด DU145 และ PC-3 ผ่านทางการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดย oxymatrine สามารถเพิ่มการแสดงออกของ p53 และ bax ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis และ oxymatrine สามารถยับยั้งการแสดงออกของ anti-apoptotic BCL-2 gene **(12)**

Cyclopamine เป็นสาร steroidal alkaloid ที่แยกมาจากพืชที่มีชื่อว่า California corn lily (Veratrum californicum) ที่มีฤทธิ์ teratogenic และ anti-tumor activity **(13, 14)** เนื่องจากสารชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งการตอบสนองของเซลล์ต่อ Vertebrate hedgehog signaling ซึ่ง Hedgehog signaling pathway มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการพัฒนาตัวอ่อนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ความสามารถในการเป็น stem cell, การเจริญและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ **(15)**, ส่งเสริมการดำเนินของเซลล์มะเร็งและความสามารถในการลุกลาม **(16)** จากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง Hedgehog signaling pathway โดย cyclopamine สามารถฆ่า cancer stem cells ทั้งใน *in vitro* และ xenograft mice นอกจากนี้ cyclopamine ยังมีความสามารถในการยับยั้ง gastric cancer **(17)**, hepatoma cancer **(18)** และ prostate cancer stem cells **(19)** ใน *in vitro* และ

สามารถยับยั้งความสามารถในการเจริญเติบโตของ human breast cancer stem cells ในหนู mice **(20)**

ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการทดสอบผลการเสริมฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิด เมื่อทดสอบร่วมกับยามาตรฐาน 5-fluorouracil ในการยับยั้งการรอดชีวิต, การเจริญเป็นโคโลนี, การเคลื่อนที่, การลุกลามของเซลล์มะเร็ง อีกทั้งยังทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ผ่านทางการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลที่ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ oxymatrine และ cyclopamine มากขึ้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ในการนำไปใช้พัฒนายาต้านมะเร็งเพื่อใช้ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่ต่อไป

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เพื่อพัฒนาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อใช้สำหรับการรักษาโรค

- เพื่อพัฒนายาต้านมะเร็งจากสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ในการนำมาใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งในปัจจุบันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา

2. วัตถุประสงค์เฉพาะของแผนงานวิจัย

- เพื่อศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการรอดชีวิต, การเคลื่อนที่, การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- เพื่อศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์

วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ โดยศึกษาผลของ

สารทั้ง 2 ชนิดต่อ การรอดชีวิตของเซลล์, การเคลื่อนที่, การลุกลาม, การเจริญเป็นโคโลนี และผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นจากผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาที่ใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ใช้ในปัจจุบันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ที่มีประสิทธิภาพและผลข้างเคียงน้อย

2. เป็นการศึกษาและการพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ oxymatrine และ cyclopamine ในการนำไปศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่

3. เพื่อเป็นการลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันจากต่างประเทศ สามารถนำงานวิจัยไปศึกษาต่อยอดในสัตว์ทดลองและการวิจัยทางคลินิก

4. เป็นการนำสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งที่ดื้อยา ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่า, มีประสิทธิภาพมากกว่าและผลข้างเคียงน้อย

บทที่ 2

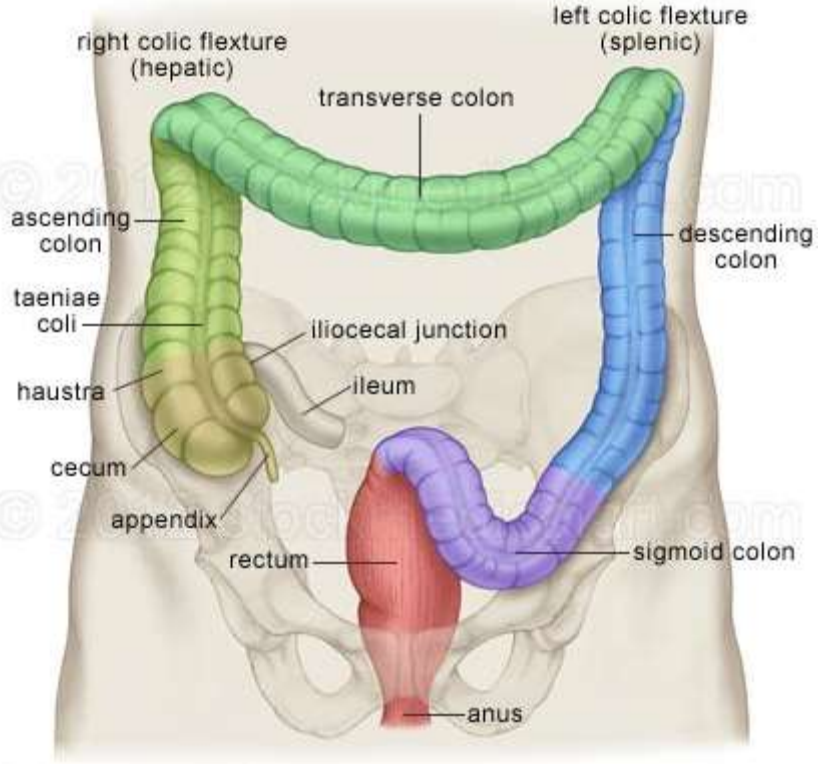
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นปัญหาที่สำคัญทางสุขภาพที่พบได้บ่อยทั่วโลก สำหรับประเทศไทย จากการรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี 2554 พบว่ามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นชนิดของมะเร็งที่พบในประเทศไทยเป็นอันดับที่ 1 ในผู้ชาย และ อันดับที่ 3 ในผู้หญิง **(21)** จากการคาดการณ์ของ American Cancer Society คาดว่าประชาชนประมาณ 136,830 คนจะถูกวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและประชาชนอีกประมาณ 50,310 คน จะเสียชีวิตจากโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในปี 2014 สาเหตุหลักของโรคนี้และการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะขาดความรู้ในการป้องกันการเกิดมะเร็ง, การคัดกรองมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและวิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐาน ดังนั้นการตรวจคัดกรองมะเร็งจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเพื่อที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เนื่องจากการตรวจพบเนื้องอกที่ผิดปกติ (precancerous tissue) หรือที่เรียกว่า polyps ในลำไส้ใหญ่และทวารหนักเบื้องต้น โดยส่วนมาก polyps จะไม่มีการพัฒนากลายเป็นมะเร็งหากมีการกำจัดเนื้องอกนี้ออก ซึ่งจะมีส่วนสำคัญในการป้องกันมะเร็งที่อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งชนิดนี้ มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย อาทิเช่น ประวัติทางพันธุกรรม, ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมการบริโภค **(2)** โดยลักษณะอาการของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่สามารถพบได้คือ พบเลือดในอุจจาระ, อุจจาระมีสีดำคล้ำ, ลักษณะของก้อนอุจจาระเปลี่ยนแปลงไป, มีอาการปวดหรือไม่สบายท้องบริเวณท้องส่วนล่าง, มีอาการท้องผูกหรือท้องเสีย, ความอยากอาหารลดลง, น้ำหนักตัวลดลง หรือในบางกรณี อาจเกิดภาวะสูญเสียเลือดจากมะเร็งนำไปสู่การเกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) หรือจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพัฒนาขึ้นในลำไส้ใหญ่ (large intestine) ส่วน colon และ rectum โดยลำไส้ส่วน colon และ rectum เป็นส่วนหนึ่งของระบบย่อยอาหาร (digestive system) หรือ gastrointestinal (GI) system ระบบย่อยอาหารทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอาหารเป็นแหล่งพลังงานแก่ร่างกายและทำหน้าที่ขับของเสียที่เป็นของแข็งออกจากร่างกาย หลังจากการเคี้ยวและกลืนอาหาร อาหารจะเคลื่อนที่จากหลอดอาหารลงสู่กระเพาะอาหาร โดยกระเพาะอาหารจะทำการย่อยและส่งอาหารต่อไปยังส่วนของลำไส้เล็ก เพื่อทำการย่อยอาหารต่อและดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกาย โดยส่วนใหญ่มะเร็งจะพัฒนาขึ้นในส่วนของลำไส้เล็กน้อยกว่าลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum ลำไส้เล็กจะต่อกับลำไส้ใหญ่

บริเวณช่องท้องด้านซ้าย โดยส่วนแรกที่ต่อจากลำไส้เล็กและเป็นส่วนที่ยาวที่สุดของลำไส้ใหญ่ คือ ลำไส้ใหญ่ส่วน colon มีลักษณะเป็นท่อที่บุด้วยกล้ามเนื้อ มีความยาวประมาณ 5 ฟุต ซึ่งน้ำและสารอาหารจะถูกดูดซึมกลับจากลำไส้ใหญ่ส่วน colon ในขณะที่ส่วนที่ไม่ถูกดูดซึมหรืออุจจาระจะเคลื่อนที่ผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ส่วน rectum ที่มีความยาว 6 นิ้ว ซึ่งเป็นลำไส้ใหญ่ส่วนสุดท้ายที่จะต่อกับทวารหนัก (anus)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางกายวิภาคของลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum

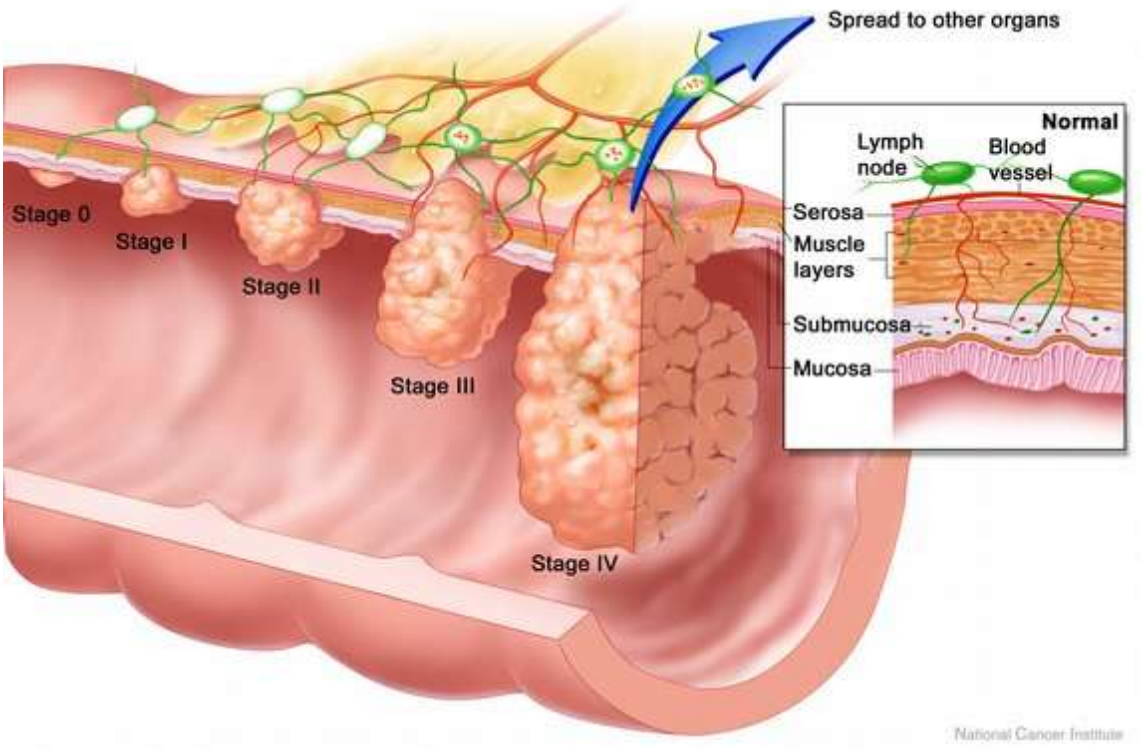
(ที่มา : © 2012 stockmedicalart.com)

การแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

มะเร็งที่เกิดขึ้นภายในผนังด้านในของลำไส้ใหญ่ สามารถเจริญเข้าสู่ผนังด้านในของลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum มะเร็งที่เจริญเข้าสู่ผนังสามารถเข้าสู่หลอดเลือดและหลอดน้ำเหลือง โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งจะแพร่กระจายไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) ที่ใกล้ที่สุด และเซลล์มะเร็งยังสามารถอาศัยหลอดเลือด เพื่อที่จะเคลื่อนที่ไปยังตับ, ปอดและสามารถแพร่กระจายไปยังเชิงกราน (pelvis) และช่องว่างภายในช่องท้อง (abdominal cavity) หรืออวัยวะส่วนอื่นๆของร่างกาย โดยความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย จะเรียกว่า metastasis

ตารางที่ 2.1 แสดงระยะของมะเร็งและลักษณะอาการที่พบได้

ระยะของมะเร็ง	ลักษณะอาการที่พบได้
Stage A	มีการเจริญของเซลล์มะเร็งจำกัดอยู่บริเวณผนังลำไส้ใหญ่
Stage B	มีการเจริญของเซลล์มะเร็งจากลำไส้ใหญ่และทวารหนัก แต่ยังไม่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังน้ำเหลือง
Stage C Stage C1 Stage C2	มีการเจริญของเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองและหลอดเลือด



ภาพที่ 2 แสดงระยะของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

(ที่มา : Besthesda, MD: National Institute of Health, c.2010 Colon cancer ; Available from: http://www.nih.gov/science/colorectalcancer)

การวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตช้าจาก precancerous polyp ไปเป็น invasive cancer ดังนั้นวิธีการตรวจหา (screening) จะสามารถป้องกันการพัฒนาของมะเร็งหรือการตรวจพบมะเร็งในระยะแรก **(22)** อาจทำให้ประสบความสำเร็จในการรักษาและลดอัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วย โดยลดทั้งอัตราการเกิดและเพิ่มโอกาสรอดชีวิตในผู้ป่วย ในผู้ป่วยบางรายอาจไม่มีอาการแสดงในระยะแรก

ของมะเร็ง โดยวิธีการวินิจฉัยด้วยการส่องกล้องตรวจลำไส้ใหญ่ (colonoscopy) เป็นวิธีที่ตรวจดูลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum โดยตรง โดยใช้เครื่องมือเพื่อตรวจดูลำไส้ใหญ่ทั้งหมดและนำส่วนของชิ้นเนื้อ polyps ออก ซึ่งก่อนที่จะใช้กล้องเพื่อตรวจดูลำไส้ใหญ่ ผู้ป่วยต้องรับประทานยาระบาย (laxative agents) เพื่อทำความสะอาดลำไส้ใหญ่ก่อน และวิธีการส่องกล้องเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) ในการวินิจฉัยและคัดกรองผู้ป่วยมะเร็ง และวิธีสวนแป้งตรวจลำไส้ใหญ่ (air contrast barium enema) เป็นวิธีที่นำมาใช้ทั่วไป เนื่องจากเพิ่มความสามารถในการส่องกล้องเพื่อตรวจดูลำไส้ใหญ่ แต่เทคนิคนี้เป็นวิธีที่มีความไวน้อยกว่าการใช้กล้องเพื่อส่องดูลำไส้ใหญ่ในการตรวจหา polyps ที่มีขนาดเล็กและมะเร็ง ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่มีปัจจัยเสี่ยงในการเป็นมะเร็งทั้งของตนเองและครอบครัว แนะนำให้ตรวจเลือดที่อยู่ในอุจจาระ (fecal occult blood test) ทุกปี และการส่องกล้องตรวจลำไส้ใหญ่ส่วนขด (sigmoidoscopy) ทุก 3-5 ปี ในผู้ป่วยอายุตั้งแต่อายุ 50 ขึ้นไป

การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

การรักษามะเร็งในปัจจุบัน จะขึ้นอยู่กับดุลยพินิจจากการตัดสินใจของแพทย์ เพื่อที่จะเลือกทางเลือกที่ดีที่สุดในการรักษาผู้ป่วย โดยจะพิจารณาจากระยะของมะเร็ง, ตำแหน่งที่เกิดมะเร็ง, ความเสี่ยงและประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการรักษา

Colon cancer

- **Carcinoma in situ** : วิธีการรักษามะเร็งในระยะนี้ จะใช้วิธีการผ่าตัด (surgery) เพื่อกำจัดเอาเซลล์ที่มีการเจริญผิดปกติออก เนื่องจากมะเร็งในระยะนี้จะไม่มีการแพร่กระจายไปยังด้านบนของชั้นที่เกิดมะเร็ง หรือการผ่าตัดเอาบางส่วนของลำไส้ส่วน colon ออก อาจจะจำเป็น ถ้ามะเร็งมีขนาดใหญ่มากเกินไป
- **Localized stage** : วิธีการรักษามะเร็งในระยะนี้ จะใช้วิธีการผ่าตัดตลอดความยาวของลำไส้ใหญ่ทั้งด้านข้างที่ติดกับมะเร็งและบริเวณที่ใกล้กับต่อมน้ำเหลือง เนื่องจากมะเร็งในระยะนี้จะมีการลุกลามไปยังผนังของลำไส้ใหญ่ส่วน colon
- **Regional stage** : ในระยะนี้มะเร็งจะมีการเจริญทะลุผนังของลำไส้ใหญ่ส่วน colon และมะเร็งจะมีการแพร่กระจายไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง ดังนั้นการผ่าตัดเอาส่วนของลำไส้ใหญ่ที่มีก้อนมะเร็งออก อาจจะเป็นวิธีเดียวในการรักษา แต่ถ้าผู้ป่วยกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำ วิธีการฉายรังสีหรือการให้ยาเคมีบำบัดจะมีการแนะนำให้ใช้กับผู้ป่วย และถ้ามะเร็งมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง การผ่าตัดลำไส้ใหญ่ส่วน colon ที่มีก้อนมะเร็งจะเป็นวิธีแรก (first treatment) ในการรักษาตามด้วยการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งยาเคมีบำบัด 5-

fluorouracil จะมีการนำมาใช้ในผู้ป่วยมะเร็งในระยะที่ III หรือระยะที่ II **(23)** ที่มีความเสี่ยงสูง เพื่อที่จะลดการเกิดมะเร็งซ้ำ และการฉายรังสีอาจมีการแนะนำให้ใช้ ถ้ามะเร็งมีการเจริญไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง

- **Distant stage :** มะเร็งในระยะนี้จะมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะที่อยู่ห่างไกลออกไปและเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ตับ, ปอด, ช่องท้องหรือรังไข่ เมื่อมีการผ่าตัดจะมีเป้าหมายเพื่อป้องกันการอุดตันของลำไส้ใหญ่ส่วน colon และป้องกันอาการแทรกซ้อนอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการผ่าตัดจะไม่แนะนำในผู้ป่วยมะเร็งในระยะนี้ โดยจะมีการให้ยาเคมีบำบัด, การฉายรังสี หรือการให้ยาในกลุ่ม targeted therapy โดยอาจจะให้เป็นยาเดี่ยวหรือให้ร่วมกันเพื่อบรรเทาอาการและทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตยาวนานขึ้น **(24)**

Rectal cancer

การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วน rectum จะใช้วิธีการผ่าตัดเป็นหลัก ยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นมะเร็งลำไส้ในระยะแพร่กระจาย ซึ่งต้องมีการเพิ่มการรักษา ได้แก่ การใช้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) หรือการฉายรังสี (radiation) โดยอาจจะให้วิธีการรักษาต่างๆเหล่านี้ก่อนที่จะทำการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออก (neoadjuvant therapy) หรือให้ภายหลังการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออก (adjuvant therapy) เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งซ้ำและการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วน rectum จะเหมือนกับที่ใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วน colon

- **Carcinoma in situ** : เป็นวิธีการเอาเซลล์ที่มีการเจริญผิดปกติออก ซึ่งวิธีการรักษา ได้แก่ polyp removal, local excision และ full-thickness rectal resection
- **Localized stage** : วิธีการรักษามะเร็งในระยะนี้ เนื่องจากมะเร็งมีการเจริญเติบโตผ่านชั้นแรก (first layer) ของลำไส้ใหญ่ส่วน rectum ไปยังชั้นที่ลึก (deeper layers) แต่ไม่ได้แพร่กระจายออกไปด้านนอกของผนังลำไส้ใหญ่ส่วน rectum หากมะเร็งมีขนาดเล็ก อาจทำการรักษาโดยการผ่าตัดเอามะเร็งออกทางทวารหนัก (anus) โดยไม่ต้องทำการผ่าตัดช่องท้อง (abdominal incision) สำหรับวิธีการรักษามะเร็งอื่นๆนั้น จะขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกิดมะเร็ง โดยวิธีการผ่าตัดอาจจะใช้ในการนำเอาก้อนมะเร็งออกโดยผ่าตัดช่องท้อง แต่ถ้าหากผู้ป่วยไม่สมัครใจที่จะผ่าตัด อาจทำการรักษาด้วยวิธีการฉายรังสี ได้แก่ วิธี endocavitary radiation therapy หรือ brachytherapy แต่อย่างไรก็ตามวิธีการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว อาจจะไม่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าการผ่าตัดในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วน rectum

- **Regional stage** : ถ้าหากมะเร็งมีการแพร่กระจายผ่านผนังของลำไส้ใหญ่ส่วน rectum ไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง และ/หรือ ต่อมน้ำเหลือง ซึ่งการฉายรังสีและการให้ยาเคมีบำบัด นิยมให้ร่วมกันก่อนที่จะทำการผ่าตัด ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดหลังจากการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกแล้ว
- **Distant stage** : มะเร็งในระยะนี้จะมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆและเนื้อเยื่อ เช่น ตับ หรือปอด ในบางกรณีมะเร็งในระยะนี้สามารถทำการรักษาด้วยการผ่าตัด แต่อย่างไรก็ตามการผ่าตัด, การให้ยาเคมีบำบัด และ/หรือการฉายรังสีอาจใช้ในการบรรเทาหรือชะลอ เพื่อป้องกันอาการที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย และทำให้มีชีวิตยาวนานขึ้น

อาการข้างเคียงจากการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- **การผ่าตัด** : ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่ผ่าตัดก้อนมะเร็ง ในบางรายจะมีอาการปวด ซึ่งปกติสามารถควบคุมอาการปวดที่เกิดขึ้นโดยใช้ยา และอาจต้องมีการตรวจติดตามอาการอื่นๆ เช่น ภาวะเลือดออก (bleeding), การติดเชื้อ (infection) และปัญหาอื่นๆที่ต้องทำการรักษาอย่างทันท่วงที โดยผลข้างเคียงอื่นๆที่เกิดขึ้นจากการผ่าตัด ได้แก่ อาการเมื่อยล้า, อาการท้องผูกหรือท้องเสีย, อาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ
- **การฉายรังสี** : ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้การฉายรังสีในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ได้แก่ การระคายเคืองผิวหนัง, การคลื่นไส้และท้องเสีย, การระคายเคืองกระเพาะปัสสาวะและลำไส้ใหญ่ส่วน rectum, อาการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ นอกจากนี้การฉายรังสีอาจนำไปสู่การเกิดภาวะเลือดออกในลำไส้ใหญ่ส่วน rectum และอาการปวดที่กระเพาะปัสสาวะ
- **การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด** : ยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ได้แก่ 5-fluorouracil (5-FU), capecitabine, oxalipatin และ irinotecan ซึ่งยาเคมีบำบัดจะออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง แต่ยังมีผลต่อเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเร็ว โดยผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของยา และระยะเวลาที่ใช้ในการรักษา โดยทั่วไปผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมีบำบัด ได้แก่ อาการคลื่นไส้และอาเจียน, ท้องเสีย, สูญเสียความอยากอาหาร, ผมร่วง และอาการบวมและมีผื่น แต่ในผู้ป่วยบางรายอาจมีจำนวนเม็ดเลือดลดลง เนื่องจากยาเคมีบำบัดสามารถทำลายเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อได้ง่ายและเกิดการสูญเสียเลือดมากหลังจากการบาดเจ็บเพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการใช้ยาต้านอาเจียน (anti-emetic drugs) เพื่อลดอาการคลื่นไส้และ

อาเจียน และยาในกลุ่มที่ช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ต่างๆในระบบเลือด (growth factors) ที่สามารถเพิ่มระดับเม็ดเลือดขาวในร่างกายได้

- **การรักษามะเร็งด้วยยา targeted therapy** : ยาในกลุ่ม targeted therapy เป็นยากลุ่มใหม่ที่ถูกพัฒนา ซึ่งเป็นผลมาจากการเข้าใจกลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับมะเร็ง โดยยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์จำเพาะกับเป้าหมายที่อยู่บนเซลล์มะเร็ง (target specific molecules) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญและการดำเนินโรคมะเร็งและยังมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาเคมีบำบัด ยาที่จัดอยู่ในกลุ่ม targeted therapy ได้แก่ Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors จะออกฤทธิ์โดยทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตช้าลงหรือหยุดการเจริญเติบโต แต่ยาจะมีผลข้างเคียงที่เกี่ยวข้องกับผิวหนัง ได้แก่ ผื่นที่มีลักษณะคล้ายสิว (acne-like rash) และผิวแห้ง (dry skin), Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors จะออกฤทธิ์ป้องกันการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของมะเร็ง ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น ได้แก่ ภาวะเลือดออก (bleeding), ความดันเลือดสูง (high blood pressure), ลิ่มเลือดในหลอดเลือด artery และ vein และไตถูกทำลาย (kidney damage)

ปัญหาของการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

เนื่องจากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาอย่างมากเกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง นำไปสู่การเข้าใจกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งมากขึ้น จึงทำให้มีการพัฒนายาเพื่อนำมาใช้ในการรักษามะเร็งมากขึ้น การรักษามะเร็งในปัจจุบันมี 4 แนวทางหลัก ประกอบด้วย การผ่าตัด, การฉายรังสี, การให้ยาเคมีบำบัด และการรักษาโรคโดยการเพิ่มภูมิต้านทานของผู้ป่วย การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการรักษา โดยในปัจจุบันได้มีการนำยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม (conventional chemotherapy) เช่น 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin, และยาเคมีบำบัดที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น หรือที่เรียกว่ายากลุ่ม targeted therapy ได้แก่ bevacizumab, cetuximab, panitumumab และ capecitabine ซึ่งยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์จับกับ receptor ที่อยู่บริเวณผิวเซลล์หรือภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนหรือเจริญเติบโตได้ อีกทั้งยังเป็นการยับยั้งการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะส่วนอื่นของร่างกาย **(25)** โดยยากลุ่มดังกล่าวนิยมนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา แต่อย่างไรก็ตามยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิมยังคงนำมาใช้เป็นยาตัวแรก (first line treatment) ร่วมกับยากลุ่มอื่นๆหรือวิธีการรักษาอื่นๆ เช่น การฉายรังสี ซึ่ง 5-fluorouracil เป็นยาเคมีบำบัดตัวแรกที่นิยมนำมาใช้ในการ

รักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และยังมีประโยชน์ในการนำมาใช้รักษามะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดอื่นๆ โดย 5-fluorouracil จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase ที่ถูกควบคุมโดย cell cycle proteins นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ 5-fluorouracil ยังเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำกระบวนการ apoptosis จากการควบคุมยีนต่างๆที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เช่น Bax, Bcl-2 และ Bcl-xL ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการใช้ยา 5-fluorouracil ร่วมกับยาต้านมะเร็งตัวอื่นๆ และใช้ร่วมกับการฉายรังสีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดสูตร FOLFOX เป็นการรักษาด้วยยา 3 รายการ คือ 5-fluorouracil, leucovorin และ oxalipatin โดยการรักษาด้วยยาสูตร FOLFOX นั้นจะใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยยาจะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและลดขนาดของก้อนมะเร็ง ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพของยา 5-fluorouracil จะเพิ่มขึ้นจากการนำไปใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่นๆ แต่ปัญหาการดื้อต่อยา 5-fluorouracil ยังคงเกิดขึ้นและเป็นสาเหตุของการรักษาที่ไม่ประสบความสำเร็จ โดยปัญหาที่พบในทางคลินิกนั้นมีสาเหตุมากจากการดื้อต่อยา 5-fluorouracil และผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา เนื่องจากยามีผลต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเร็ว โดยอัตราการตอบสนองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักขั้นสุดท้ายต่อการรักษาด้วยยา 5-fluorouracil อยู่ที่ 10-15 % ในขณะที่การใช้ยา 5-fluorouracil ร่วมกับยารักษามะเร็งชนิดอื่นๆ สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองต่อยาได้ประมาณ 40-50 % ซึ่งการดื้อต่อยารักษามะเร็งเป็นผลมาจากหลายสาเหตุ ประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงการขนส่งยาเข้าและออกจากเซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา, การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ thymidylate synthase, การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ deoxyuridine triphosphate ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ catabolism ของ 5-fluorouracil, การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2, Bcl-XL และ Mcl-1 และการแสดงออกของ proteins ในวัฏจักรของเซลล์ที่เปลี่ยนไป ที่นำไปสู่การดื้อต่อยา 5-fluorouracil **(4)**

ดังนั้นการพัฒนายาเคมีบำบัดชนิดใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งการรักษามะเร็งแบบผสมผสาน (combination therapy) โดยการใช้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืชสมุนไพรเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาต้านมะเร็ง เนื่องจากในปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรในการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา สำหรับในประเทศไทยสมุนไพรจัดเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาและดูแลสุขภาพของผู้ป่วยและได้มีการนำเอาสมุนไพรไปใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันมากขึ้น ดังนั้นการพัฒนายาใหม่จากสมุนไพร จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พิษวิทยาและความปลอดภัยในการนำสมุนไพรมาใช้ อีกทั้งสารสกัดธรรมชาติ

จากสมุนไพรจะประกอบไปด้วยสารสำคัญต่างๆ เช่น flavonoids, phenolic compounds และสารพฤกษเคมีอื่นๆ ที่ซึ่งมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม และมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง **(26)** มีการศึกษามากมายแสดงให้เห็นถึงสมุนไพรสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา โดยมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติน้อยมาก จากการศึกษาของ Se-Lim Kim และ คณะ รายงานถึง parthenolide ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสามารถเพิ่มฤทธิ์ของยา 5-fluorouracil ในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทางการกระตุ้น mitochondrial pathway โดยพบการแสดงออกของ anti-apoptotic proteins : Bcl-2 และ Bcl-xL ลดลง ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ pro-apoptotic protein : Bax เพิ่มสูงขึ้น และยังพบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase 3 และ caspase 9 เพิ่มสูงขึ้น สำหรับการศึกษาใน in vivo พบว่าการฉีด parthenolide ร่วมกับ 5-fluorouracil เข้าทาง intra-peritoneal ใน xenograft mice สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ **(27)**

Oxymatrine

Oxymatrine เป็นสาร quinolizidine alkaloids ที่แยกมาจากส่วนรากของสมุนไพรจีนที่มีชื่อว่า *Sophora flavescens* Ait. ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ hepatitis, ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด fibrosis ในตับ, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านการเกิดภูมิแพ้, ฤทธิ์ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน และมีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของ oxymatrine มากมาย จากการศึกษาของ Jun Liu และคณะในปี 2014 พบว่า oxymatrine สามารถลดการเพิ่มจำนวนของ human leukemia HL-60 cells ผ่านทางการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis และยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ให้หยุดอยู่ในระยะ G2/M และ S phase ซึ่งกลไกในระดับโมเลกุลของ oxymatrine ในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ใน human leukemia HL-60 cells นั้นเกิดขึ้นผ่านทางการลดการแสดงออกของ anti-apoptotic Bcl-2 และเพิ่มการแสดงออกของ pro-apoptotic Bax นอกจากนี้ยังพบว่า oxymatrine สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น caspase-3 และ caspase-9 ซึ่งมีบทบาทสำคัญใน intrinsic pathway ของกระบวนการ apoptosis **(28)** นอกจากนี้ยังมีการรายงานฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของ oxymatrine ใน human osteosarcoma MNNG/HOS cells โดย oxymatrine สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิดนี้ได้ผ่านทางการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis และยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์มะเร็ง สำหรับกลไกในระดับโมเลกุลพบว่า oxymatrine สามารถชักนำให้เกิดการไหลออกของ cytochrome C จาก mitochondria สู่ cytoplasm และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase3 และ caspase 9 และยังพบว่า oxymatrine สามารถยับยั้ง PI3K/Akt pathway ซึ่งเป็น pathway ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการ apoptosis ส่วนการศึกษาใน in vivo พบว่า

oxymatrine สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งใน BALB/C nude mice ตามความเข้มข้นของ oxymatrine ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control **(29)**

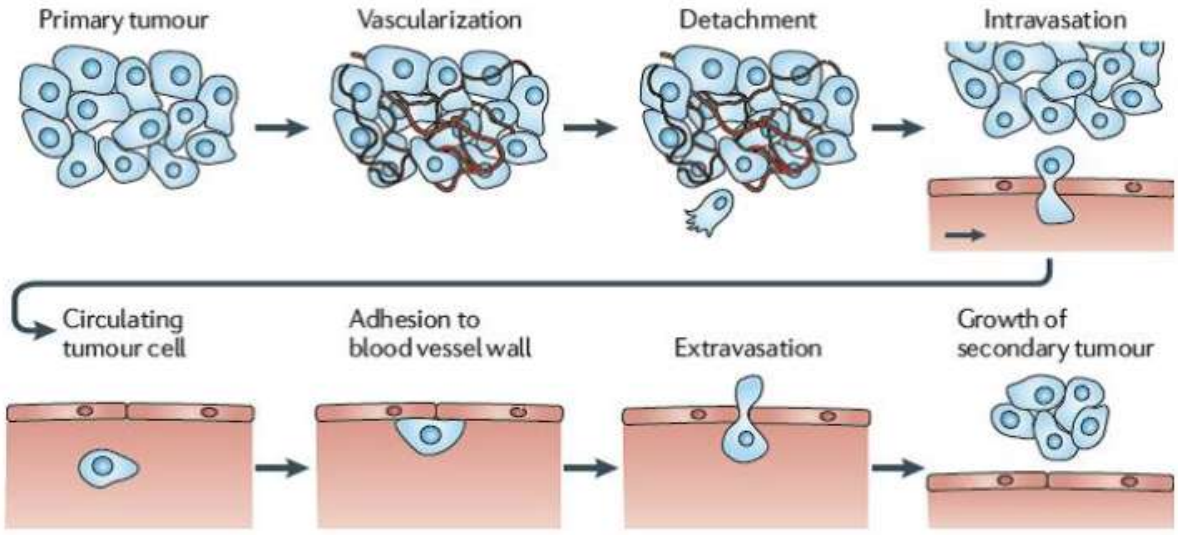
Cyclopamine

Cyclopamine เป็นสาร steroidal alkaloid ที่แยกมาจากพืชที่มีชื่อว่า California corn lily (*Veratrum californicum*) โดยพืชชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้ง hedgehog signaling pathway (Hh) ซึ่งเป็น pathway ที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาของตัวอ่อน (embryogenesis) และยังมีความสำคัญในการพัฒนาของเนื้อเยื่อปกติในระบบต่างๆ เช่น integument, musculoskeletal, gastrointestinal และ urogenital systems **(30)** โดยมีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า cyclopamine สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ murine medulloblastoma cells ใน *in vitro* และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเปลี่ยนไป ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของ neuronal cell และทำให้ neuronal cell สูญเสียลักษณะในการเป็น stem cell **(31)** และจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า cyclopamine สามารถยับยั้ง gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines ผ่านทางการลดการแสดงออกของ cancer stem cell marker และ Hedgehog signalling pathway molecules ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน เช่น Shh, SMO, Gli-1 **(32)** มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ cyclopamine ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 cells พบว่าสาร cyclopamine สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ตามความเข้มข้นของสาร cyclopamine และระยะเวลาหลังการทดสอบที่นานขึ้น เมื่อศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์พบว่าสาร cyclopamine เพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะ G0/G1 และลดจำนวนของเซลล์ในระยะ S ของวัฏจักรเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยลดระดับการแสดงออกของโปรตีน cyclin D และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p21 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 cells ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ hedgehog signaling pathway กับ cyclins **(33)** เช่นเดียวกับการศึกษาผลของสาร cyclopamine ต่อการเพิ่มจำนวนและการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด LNCaP cells และตรวจสอบการแสดงออกของยีน PCA3 gene ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ผลการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า สาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 ไมโครโมล/ลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีค่า inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) เท่ากับ 10 ไมโครโมล/ลิตร อัตราการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 37.21%, 57.38% และ 57.98% หลังการทดสอบที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล/ลิตร และอัตราการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งที่

24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 21.16% , 71.31% และ 72.90% หลังการทดสอบที่ความเข้มข้น 15 ไมโครโมล/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ แสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์แบบ apoptosis เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสาร cyclopamine เพิ่มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของ PCA3 gene ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสาร cyclopamine เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 **(34)**

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Cancer metastasis)

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งส่วนใหญ่ กระบวนการนี้เริ่มเกิดขึ้นจากการหลุดออกของเซลล์มะเร็งจากบริเวณก้อนมะเร็งปฐมภูมิ (primary tumor) จากนั้นเซลล์มะเร็งจะเกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือดและระบบน้ำเหลือง เพื่อเคลื่อนที่ไปยังบริเวณอวัยวะส่วนอื่นของร่างกาย จากนั้นจะเคลื่อนที่ออกจากหลอดเลือดและเจริญเป็นก้อนมะเร็งทุติยภูมิ (secondary tumor) ซึ่งกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการหลัก **(35)**



ภาพที่ 3 แสดงกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

(ที่มา : Wirtz, D., K. Konstantopoulos, et al. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. Nature Reviews Cancer 11(7): 512-522, 2011)

1. Metastasis initiation เป็นกระบวนการที่เซลล์มะเร็งจะสลายส่วนของ extracellular matrix (ECM) และ basement membranes ซึ่งเป็นชั้นที่ประกอบด้วย collagen IV, laminin,

entactin, และ heparan sulfate proteoglycans โดยเกิดผ่านสองกระบวนการ คือ adhesion และ matrix dissolution ส่วนของ extracellular matrix (ECM) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีส่วนประกอบหลักเป็นไกลโคโปรตีน มีบทบาทสำคัญในการควบคุมพฤติกรรมเซลล์และทำหน้าที่ควบคุมการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ และยังเป็นส่วนสำคัญสำหรับให้เซลล์ยึดเกาะและส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยเซลล์มะเร็งจะจับกับส่วนของ ECM และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ECM เพื่อใช้สำหรับการเคลื่อนที่จากบริเวณที่เกิดมะเร็ง (primary tumor) โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำลาย ECM จะต้องอาศัย proteolytic enzymes ที่มีชื่อว่า matrix metalloproteinases (MMPs)

2. Metastatic dissemination กระบวนการนี้เกิดจากเซลล์มะเร็งเคลื่อนที่เข้าระบบเลือดและน้ำเหลือง มีการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีการยึดเกาะกับโมเลกุลที่ผิวเซลล์ของผนังของหลอดเลือด และไปเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองน้อยลง
3. Metastatic colonization กระบวนการนี้เกิดจากเซลล์มะเร็งออกจากระบบเลือดโดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังหลอดเลือดและบุกรุกเนื้อเยื่อบริเวณนั้น หรือในบางกรณีเซลล์มะเร็งอาจเพิ่มจำนวนก่อน และบุกรุกเซลล์ผนังหลอดเลือดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพื่อแทรกตัวเข้าไปยังอวัยวะใหม่ ทำให้มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งอย่างต่อเนื่อง

Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ proteolytic ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยส่วนของ extracellular matrix (ECM) ซึ่งส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนที่, การลุกลาม, การแพร่กระจายและกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ การแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในมะเร็งหลายชนิด มีความสัมพันธ์กับมะเร็งในระยะขั้นสุดท้าย และมีส่วนเพิ่มการเคลื่อนที่และการลุกลามของมะเร็ง ทำให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งลดลง **(36, 37)** เอนไซม์นี้สามารถแบ่งตามโครงสร้าง ได้แก่ gelatinases, collagenases, membrane-type, stromelysins และ matrilysins โครงสร้างของ MMPs ประกอบด้วยส่วนของ pro-peptide, catalytic domain, hemopexin-like C terminal domain และ hinge region ที่เชื่อม catalytic site ด้วย hemopexin domain **(38)** การศึกษาในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ MMP-2 และ MMP-9 กับอาการแสดงในผู้ป่วยที่แย่ลง เนื่องจากเอนไซม์ MMPs เปรียบเสมือน marker สำหรับการลุกลามของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มีการศึกษาพบระดับของโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน serum ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม **(39)**

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย (Material & Method)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 และเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5

- เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 ใน flask T25 ใน RPMI-1640 medium ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator โดยเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ ต้องเป็นเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 95% จากการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี 0.4% trypan blue

- เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสต์ชนิด MRC-5 ใน flask T25 ใน DMEM medium ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator โดยเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ ต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 95% จากการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี 0.4% trypan blue

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine และ cyclopamine ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT cell viability assay

2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW-620 ใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator

2.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม oxymatrine ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50,100 µg/ml และ cyclopamine ที่ความเข้มข้นต่าง 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5, 10, 25 และ 50 µg/ml โดยมีเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบด้วยสาร oxymatrine และ cyclopamine เป็น negative control และ 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 µg/ml เป็น positive control

2.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.4 เติมสารละลาย MTT ใน PBS solution ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในแต่ละ well จากนั้น incubate plate เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

2.5 ดูด supernatant ในแต่ละ well ทิ้ง

2.6 เติม DMSO เพื่อละลาย formazan crystal

2.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.8 คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}}\right) \times 100\%$$

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย RPMI media

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย oxymatrine และ cyclopamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Drug combination assay

3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW-620 ใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator

3.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30, 40, 50 µg/ml และ cyclopamine ที่ความเข้มข้นต่าง ได้แก่ 10 และ 20 µg/ml ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 และ 50 µg/ml

3.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

3.4 เติมสารละลาย MTT ใน PBS solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2, 95% humidity ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

3.5 ปิเปต supernatant ทิ้ง และเติม absolute DMSO ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate

3.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

3.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}}\right) \times 100\%$$

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย RPMI media

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย oxymatrine และ cyclopamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับยา 5-fluorouracil

4. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug toxicity testing

4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 ใน 96-well plate ที่ density 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator

4.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30, 40, 50 µg/ml และ ทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 และ 50 µg/ml

4.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

4.4 เติมสารละลาย MTT ใน PBS solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

4.5 ปิเปต supernatant ทิ้ง และเติม absolute DMSO ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate

4.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

4.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}}\right) \times 100\%$$

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย RPMI media

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย oxymatrine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับยา 5-fluorouracil

5. การศึกษาความเป็นพิษของ cyclopamine ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug toxicity testing

5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 ใน 96-well plate ที่ density 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator

5.2 ปิเปต media ทิ้งและเติม cyclopamine ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10, 25 µg/ml

5.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 เติมสารละลาย MTT ใน PBS solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

5.5 ปิเปต supernatant ทิ้งและเติม absolute DMSO ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate

5.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

5.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}}\right) \times 100\%$$

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย RPMI media

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย cyclopamine

6.การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค colony formation assay

6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 500 cells/well ใน 24-well plate ใน complete RPMI media

6.2 บ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6.3 เติม oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml และ oxymatrine 50 µg/ml + 5-fluorouracil 25 µg/ml

6.4 บ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6.5 ปิเปต media ที่มีสารทดสอบทิ้ง

6.6 เลี้ยงเซลล์ต่อใน complete RPMI 1640 เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อสังเกตการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์เป็นโคโลนี

6.7 ดูด media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทิ้งและทำการ fix เซลล์ด้วย acetic acid : methanol ในอัตราส่วน 1 : 3 เป็นระยะเวลา 15 นาที

6.8 ทำการย้อมเซลล์ด้วย 0.5% crystal violet เป็นระยะเวลา 30 นาที

6.9 นับเซลล์โดยใช้กล้อง light microscope ที่กำลังขยาย 5x

7.การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620

7.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24-well plate จนกระทั่งเซลล์เจริญเป็น monolayer และได้ 100% confluent

7.2 ใช้ plastic pipette tip ขนาด 20 µl ในการ scratch เพื่อทำให้เกิด wound

7.3 ล้างเซลล์ด้วย serum free media จำนวน 2 ครั้ง

7.4 เลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักใน RPMI 1640 media และในสภาวะที่มี oxymatrine 50 µg/ml และ oxymatrine 50 µg/ml + 5-fluorouracil 25 µg/ml และ cyclopamine 20 µg/ml และ cyclopamine 20 µg/ml + 5-fluorouracil 20 µg/ml โดยเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบจะใช้เป็น negative control

7.5 วัดความกว้างของ wound ด้วยกล้อง invert microscope ที่กำลังขยาย 5x โดยวัดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการเติมสารทดสอบ

7.6 คำนวณ % number of cells migrated

8. การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และ cyclopamine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620

8.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24-well plate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม oxymatrine 50 µg/ml และ oxymatrine 50 µg/ml + 5-fluorouracil 25 µg/ml และ cyclopamine 20 µg/ml และ cyclopamine 20 µg/ml + 5-fluorouracil 20 µg/ml โดยมีเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบ เป็น negative control

8.3 ทำการ coat invasion chamber ด้วย matrigel เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง

8.4 Trypsinize เซลล์และปิเปตเซลล์ปริมาตร 500 µl ที่ความหนาแน่น 1.0 x 10^5 cell/ml ลงบน upper chamber ที่วางบน 24-well plate ในขณะที่ด้านล่างของ chamber จะประกอบด้วย RPMI 1640 media ที่มี 10 % FBS ปริมาตร 500 µl

8.6 บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

8.7 นำเซลล์ที่อยู่ด้านบนของ chamber ออกโดยใช้ cotton swab

8.8 Fix cell ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel ด้วย ice cold methanol

8.9 ย้อมเซลล์ด้วยสี crystal violet เป็นเวลา 30 นาที

8.10 ล้างด้วย 1x PBS จนกระทั่งไม่เห็นสีของ crystal violet

8.10 นับเซลล์ 5 random fields โดยใช้กล้อง invert microscope

8.11 คำนวณ % proportional invasiveness

9. การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 โดยใช้เทคนิค Enzyme-link immunosorbent assay (ELISA)

9.1 การเตรียม sample

- Dilute tissue culture samples อัตราส่วน 40 เท่าใน standard diluent buffer โดยเติม 117 µl ของ standard diluent buffer ใน microfuge tube ตามด้วย sample 3 µl

9.2 การเตรียม standard

- Label tube สำหรับการทำ standard
- เติม 300 µl ของ standard diluent buffer ลงใน tube จำนวน 6 tube : 750, 375, 187.5, 93.8, 46.9 และ 23.5 pg/ml Hu MMP-9

- Dilution of Hu MMP-9 standard

ตารางที่ 3.2 แสดง Dilution of Hu MMP-9 standard

Standard	Add :	Into :
1,500 pg/ml	Swirl or mix gently and allow to sit for 10 minute	
750 pg/ml	300 µl of 1,500 pg/ml	300 µl of Diluent buffer
375 pg/ml	300 µl of 750 pg/ml	300 µl of Diluent buffer
187.5 pg/ml	300 µl of 375 pg/ml	300 µl of Diluent buffer
93.8 pg/ml	300 µl of 187.5 pg/ml	300 µl of Diluent buffer
46.9 pg/ml	300 µl of 93.8 pg/ml	300 µl of Diluent buffer
23.5 pg/ml	300 µl of 46.9 pg/ml	300 µl of Diluent buffer
0 pg/ml	300 µl of Diluent buffer	Empty tube

9.3 การ Dilution of streptavidin-HRP (100x)

เตรียมโดยเติม 10 µl ของ 100x concentration ใน 1 ml ของ streptavidin-HRP diluent สำหรับ 8 well

ตารางที่ 3.3 แสดงการ Dilution of Streptavidin-HRP (100x)

# of 8-well strips	Volume of streptavidin-HRP (100x)	Volume of diluent
2	20 µl solution	2 ml
4	40 µl solution	4 ml
6	60 µl solution	6 ml
8	80 µl solution	8 ml
10	100 µl solution	10 ml
12	120 µl solution	12 ml

9.4 การ Dilution of wash buffer

วาง wash buffer concentration (25X) ไว้ที่ room temp และ mix เพื่อละลาย salts จากนั้น dilute 1 ml ของ wash buffer concentration ด้วย 24 ml ของ deionized water และ label คำว่า working wash buffer

9.5 ขั้นตอนการทำ MMP9 ELIZA kit

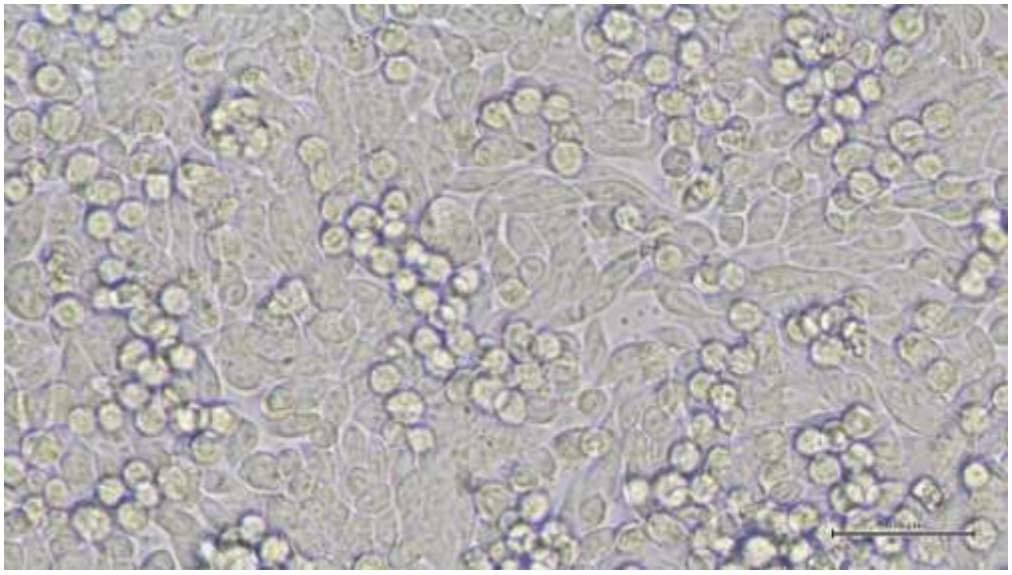
- Dilute tissue culture samples (1:40) ด้วย standard diluent buffer
- เติม 100 µl ของ standard diluent buffer ไปที่ zero standard wells
- เติม 100 µl ของ standards, control หรือ samples ลงในแต่ละ well
- ปิด plate ด้วย plate cover และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
- เท solution จาก well และล้าง plate จำนวน 4 ครั้ง
- เติม 100 µl ของ biotinylated Hu MMP-9 Biotin conjugate solution ลงในแต่ละ well ยกเว้น chromogen blank
- ปิด plate ด้วย plate cover และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
- เท solution จาก well และล้าง plate จำนวน 4 ครั้ง
- เติม 100 µl ของ streptavidin-HRP working solution ลงในแต่ละ well ยกเว้น chromogen blank
- ปิด plate ด้วย plate cover และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- เท solution จาก well และล้าง plate จำนวน 4 ครั้ง
- เติม 100 µl ของ stabilized chromogen ลงในแต่ละ well (สังเกตเห็นเป็นสีฟ้า)
- Incubate เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด (ห้าม cover plate ด้วย aluminum foil)
- เติม 100 µl ของ stop solution ลงในแต่ละ well (จะสังเกตเห็นสารละลายใน well เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง)
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

บทที่ 4

ผลการวิจัย (Results)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620

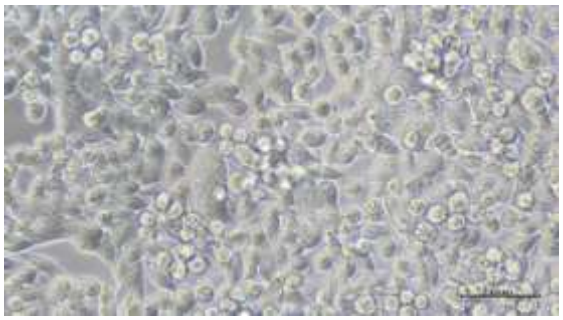
- เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด SW-620 ใน flask T25 ใน RPMI-1640 medium ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator



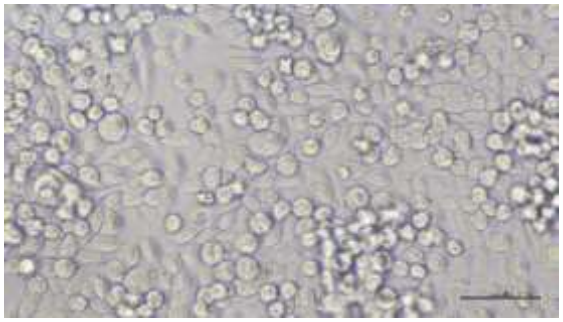
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 cells ที่กำลังขยาย 100x

2. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 ที่ทดสอบด้วย cyclopamine

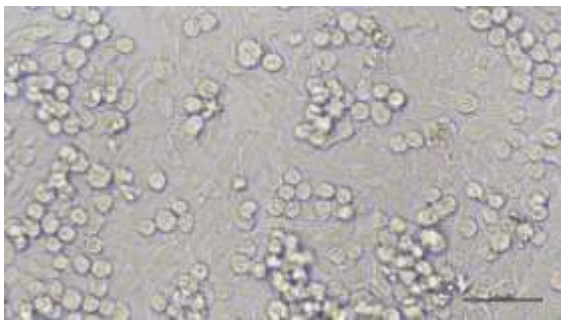
Control



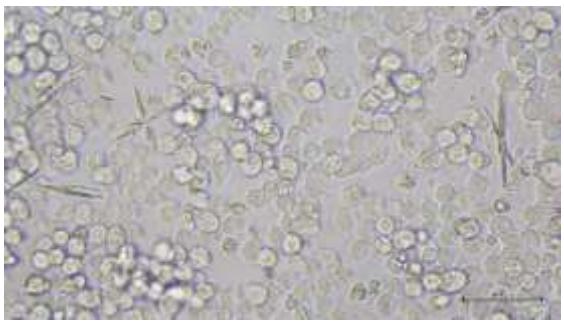
Cyclopamine 5 µg/ml



Cyclopamine 10 µg/ml



Cyclopamine 25 µg/ml

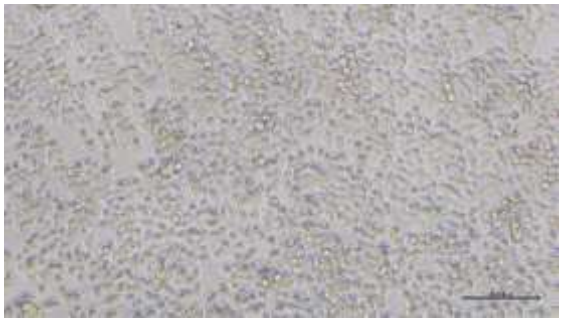


ผลการทดลองจากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ด้วยกล้อง light microscope ที่กำลังขยาย 100x เซลล์ถูกทดสอบด้วย cyclopamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 25 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์สูญเสียลักษณะรูปร่าง epithelial morphology โดยที่ความเข้มข้น 25 µg/ml ของ cyclopamine จะพบเซลล์มีขนาดเล็ก รูปร่างกลม มีลักษณะของเซลล์ที่อยู่ในระยะ apoptosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง

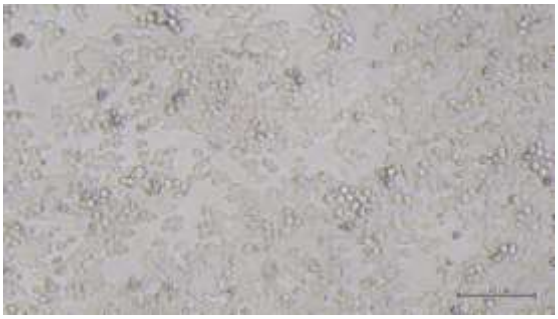
3. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 ที่ทดสอบด้วย oxymatrine

Control

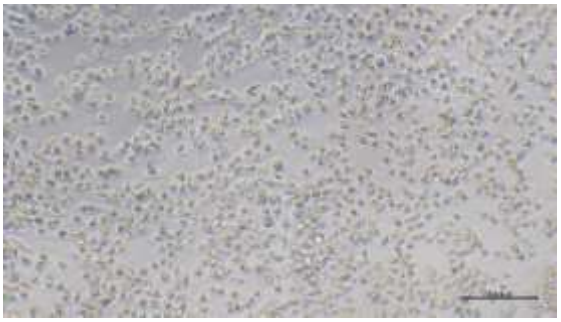
Oxymatrine 25 µg/ml



Oxymatrine 50 µg/ml

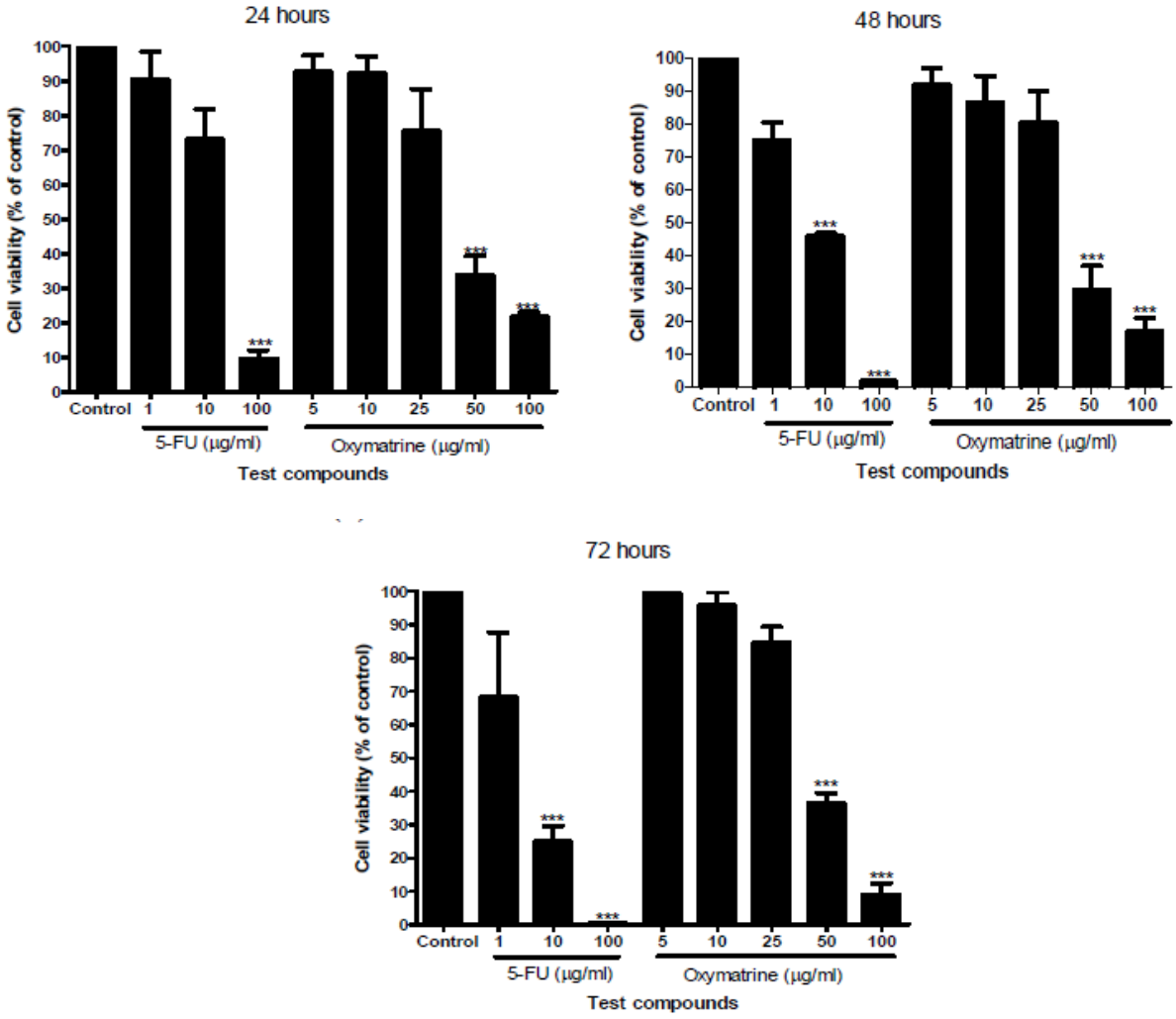


Oxymatrine 100 µg/ml



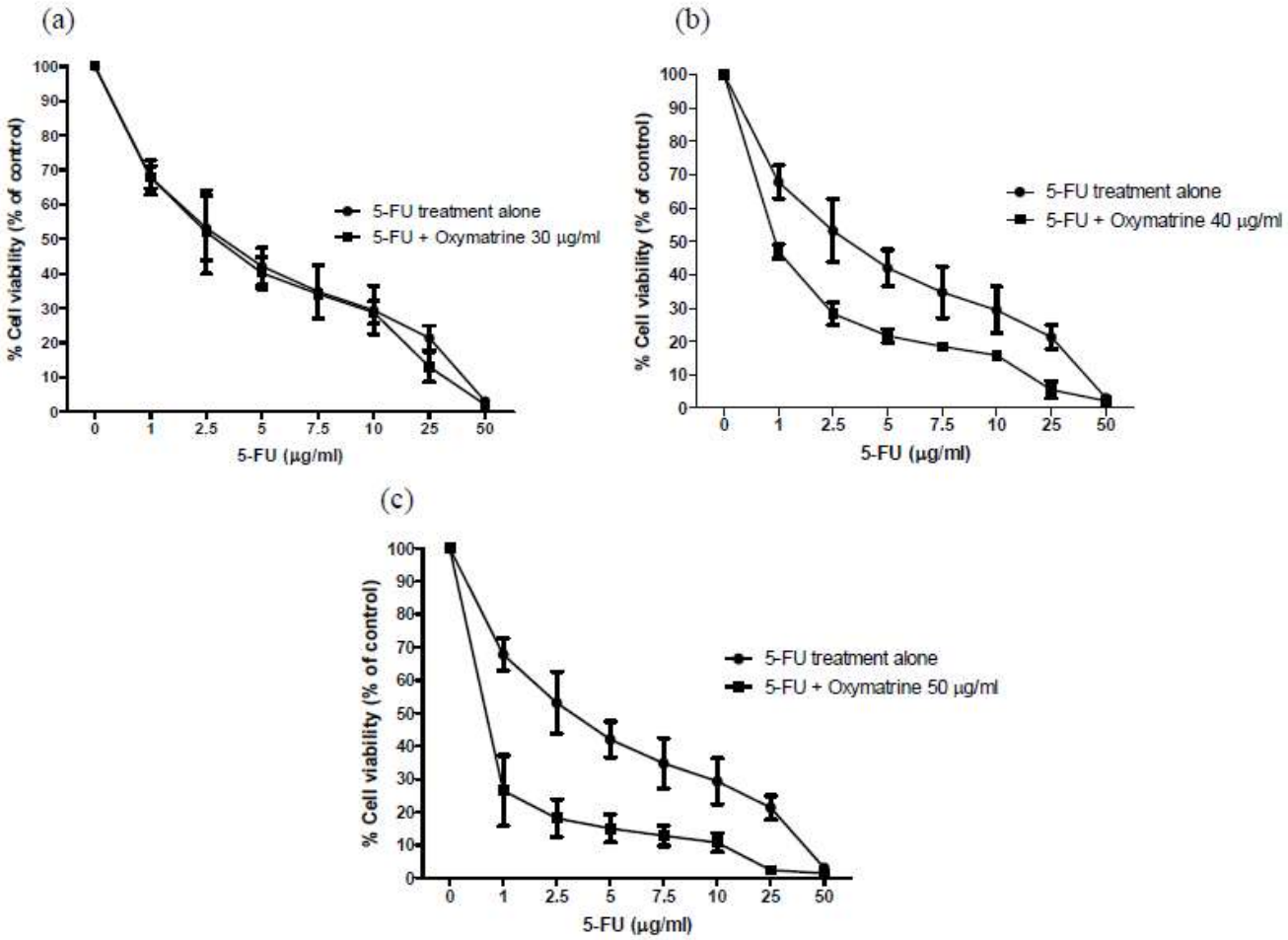
ผลการทดลองจากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ด้วยกล้อง light microscope ที่กำลังขยาย 10x เซลล์ถูกทดสอบด้วย oxymatrine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 25, 50, 100 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์มะเร็งลดลง และเซลล์มีรูปร่างกลมมากขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ของ oxymatrine จะพบเซลล์มีขนาดเล็ก รูปร่างกลม มีลักษณะของเซลล์ที่อยู่ในระยะ apoptosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งมากนัก แต่พบว่าจำนวนของเซลล์มะเร็งลดลง

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก SW-620 cells ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay



ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine พบว่าสาร oxymatrine สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิตตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มมากขึ้นและระยะเวลาที่นานขึ้นที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการทดสอบด้วยสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 µg/ml โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml ของ oxymatrine สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิตได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 เมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของ oxymatrine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 cells มีค่าเท่ากับ 54.29, 51.27 และ 46.41 µg/ml

5. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Drug combination assay



ตาราง แสดงค่า IC_{50} และ CI value ของการทดสอบด้วยสาร oxymatrine, 5-fluorouracil alone และ oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml + 5-fluorouracil

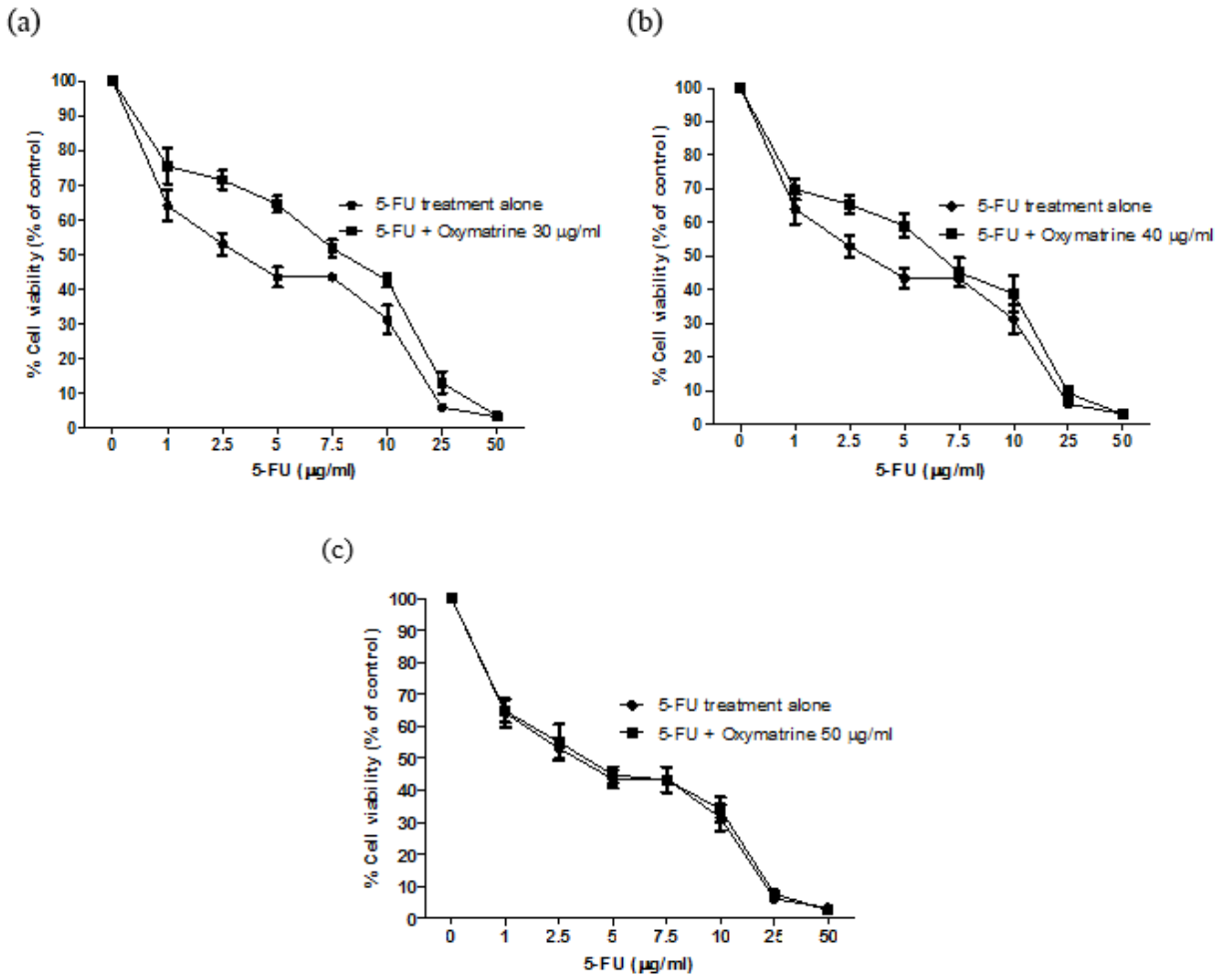
Test compound	IC_{50} (µg/ml)	CI value	Description
Oxymatrine	46.41	-	-
5-FU alone	1.25	-	-
Oxymatrine 30 µg/ml +5-FU	0.02	0.662	synergism

*CI < 1, CI = 1, and CI > 1 were synergism (CI < 1), additive (CI = 1), antagonism (CI > 1), respectively.

ผลการทดสอบแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, และ 50 µg/ml และสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30, 40, และ 50 µg/ml พบว่า สาร oxymatrine สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-fluorouracil และลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว ค่า IC_{50} ของยา

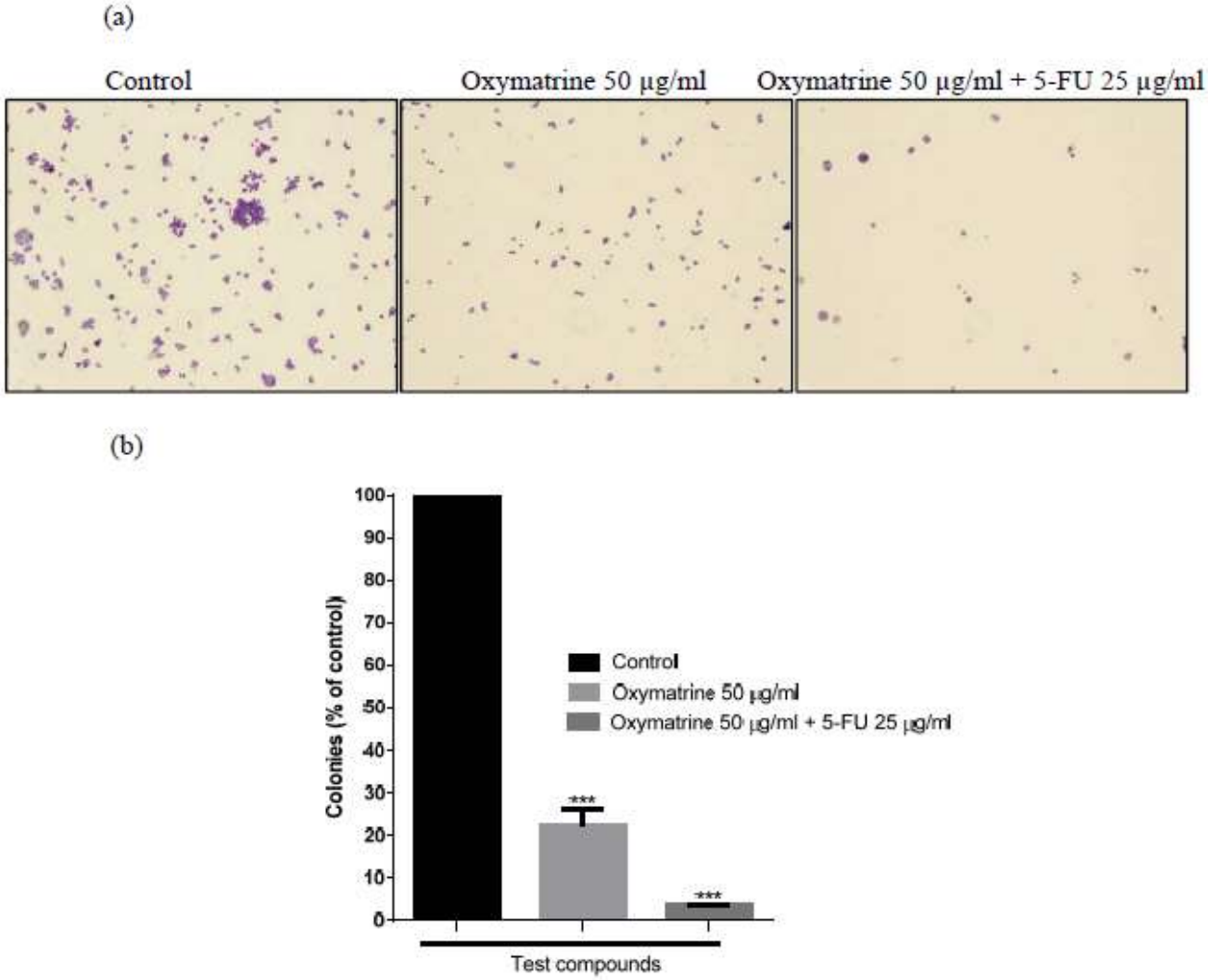
5-fluorouracil ลดลงจาก 1.25 µg/ml เป็น 0.02 µg/ml เมื่อทดสอบร่วมกับ oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณค่า Combination index (CI) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.662 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine และยา 5-fluorouracil เมื่อทดสอบร่วมกันให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (synergism)

6. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของสาร oxymatrine เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบบลาส (fibroblast) ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug combination toxicity testing



ผลการศึกษาแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ปกติ (normal cell) ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, และ 50 µg/ml และสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30, 40, และ 50 µg/ml พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตในกลุ่มที่ทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil และสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 µg/ml มีค่ามากกว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิตในกลุ่มที่ทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า สาร oxymatrine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าเซลล์มะเร็ง และเมื่อเพิ่มขนาดของสาร oxymatrine ที่ 50 µg/ml พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine ออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ

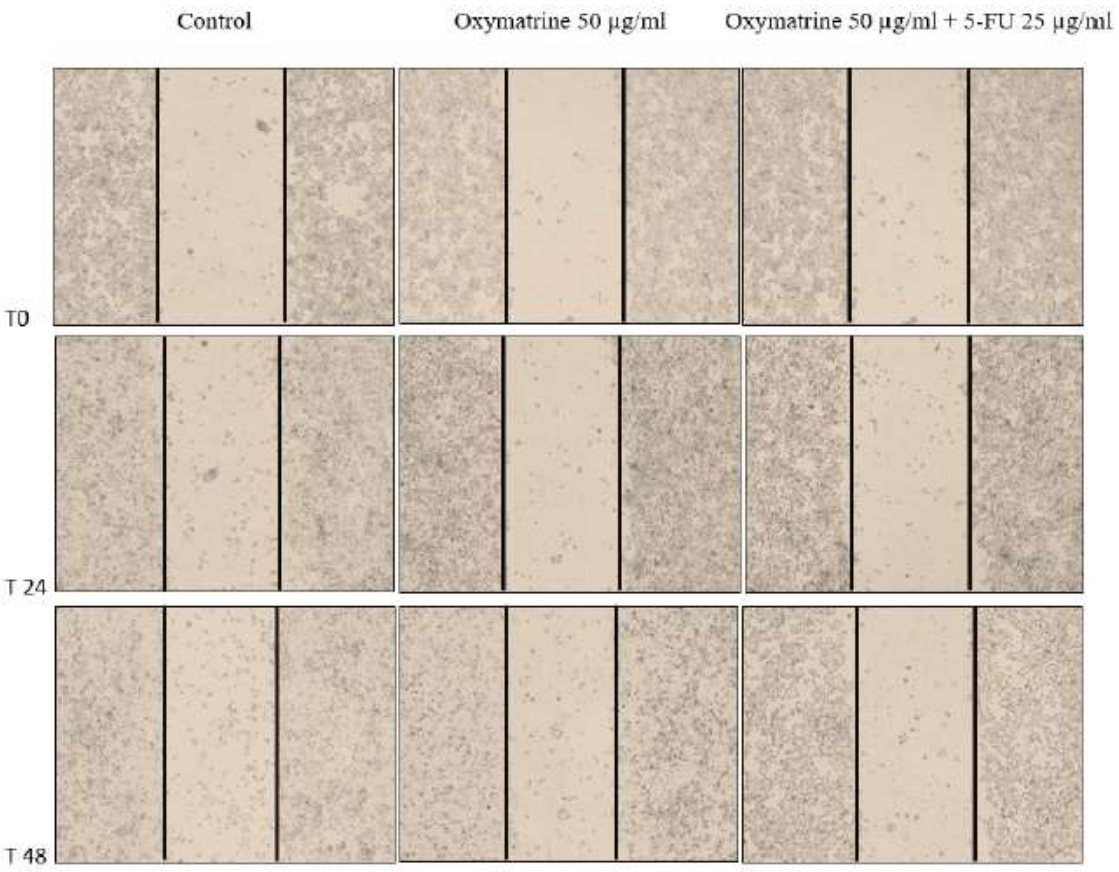
7. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine และยา 5-fluorouracil ต่อการเจริญเป็น colony ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Colony formation assay



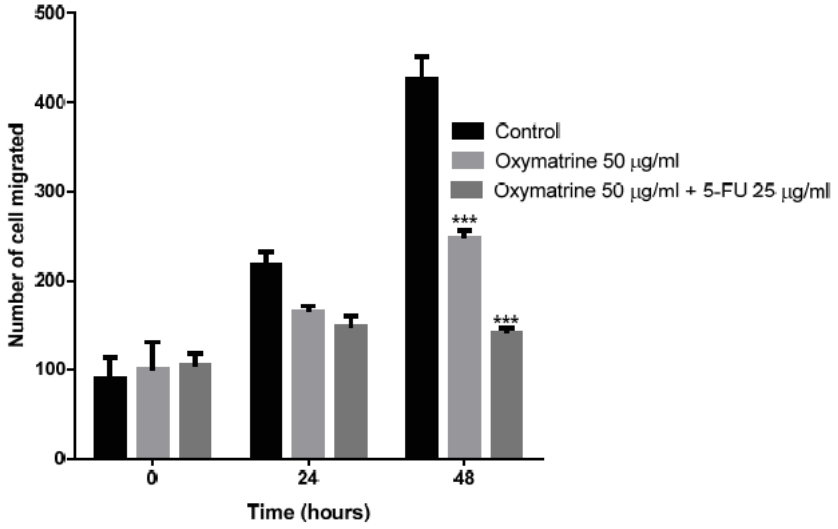
ผลการทดสอบพบว่าสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน และเลี้ยงเซลล์ต่อใน RPMI1640 media + 10% FBS เป็นระยะเวลา 7 วัน และเมื่อศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml และยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml ต่อการเจริญเป็นโคโลนีในเซลล์มะเร็งพบว่า เมื่อทดสอบร่วมกันสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$)

8. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Scratch assay

(a)



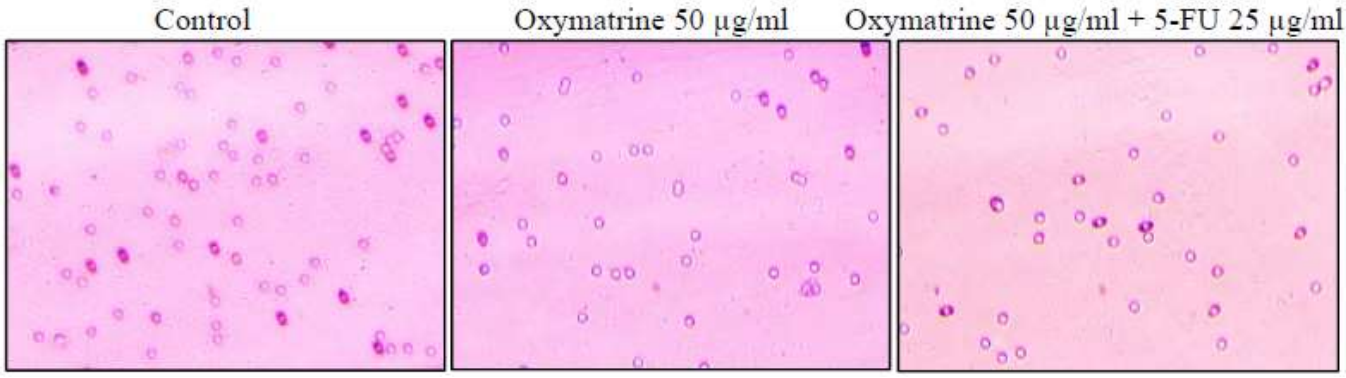
(b)



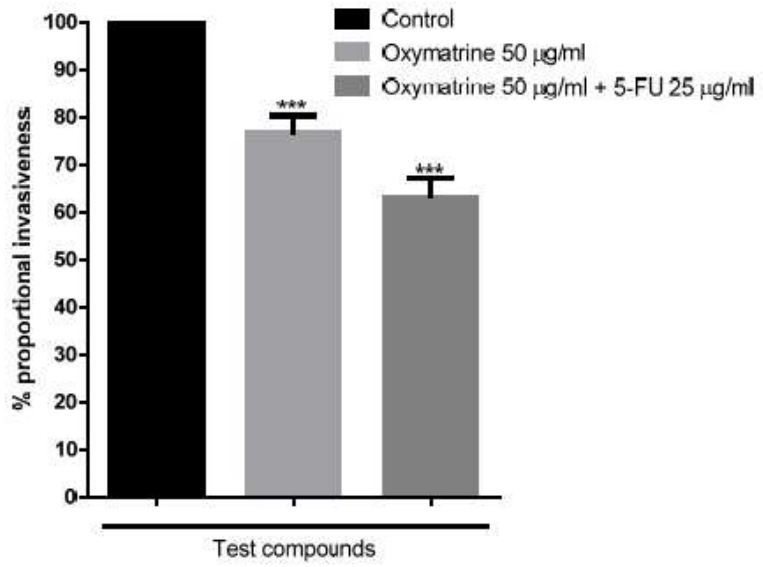
ผลการทดสอบพบว่า สาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถลดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 cells หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml สามารถลดจำนวนของเซลล์ที่เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิด wound อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$)

9. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay

(a)

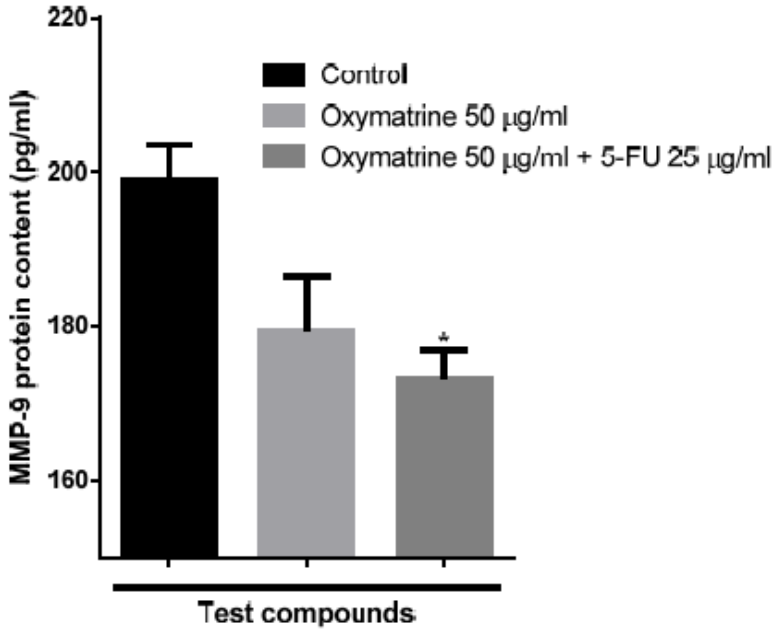


(b)



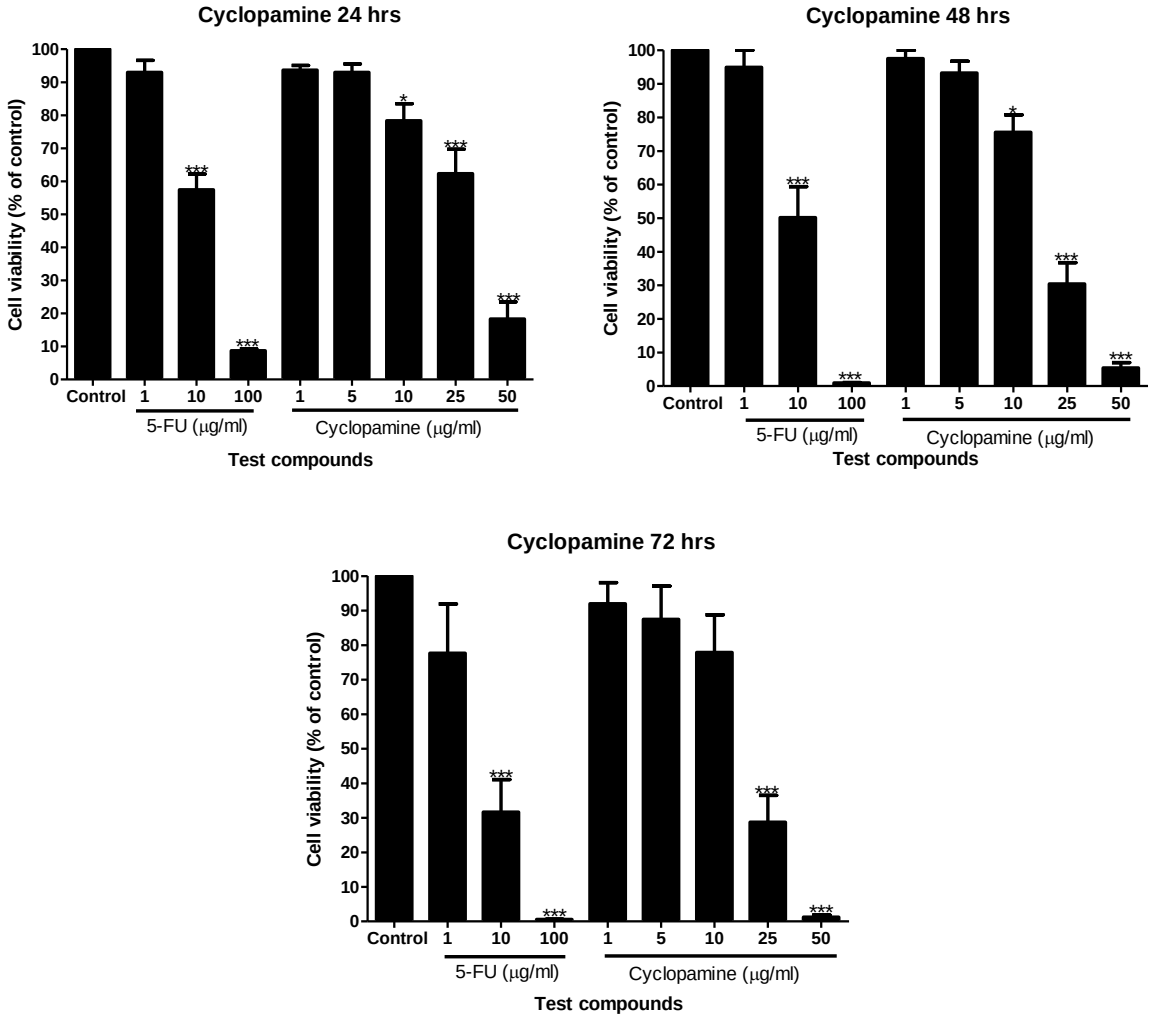
ผลการทดสอบพบว่าสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถลดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel-coated invasion chamber และ % proportional invasiveness ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 และเมื่อทดสอบสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml สามารถลดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel-coated invasion chamber และลดเปอร์เซ็นต์ proportional invasiveness ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการทดสอบร่วมกันของสาร oxymatrine และ 5-fluorouracil ให้ผลเสริมฤทธิ์กันเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยสาร oxymatrine อย่างเดียว

10. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค ELISA



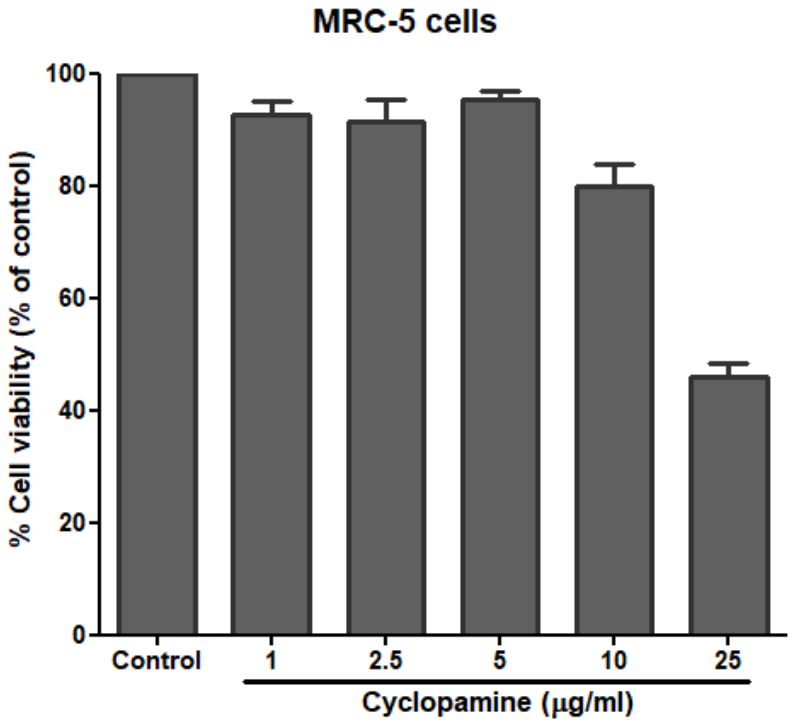
ผลการทดลองพบว่าสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์นี้ใน supernatant ของเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ร่วมกับ 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml พบว่าสามารถลดระดับเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สาร oxymatrine สามารถลดการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ผ่านทางการลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9

11. การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร cyclopamine ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay



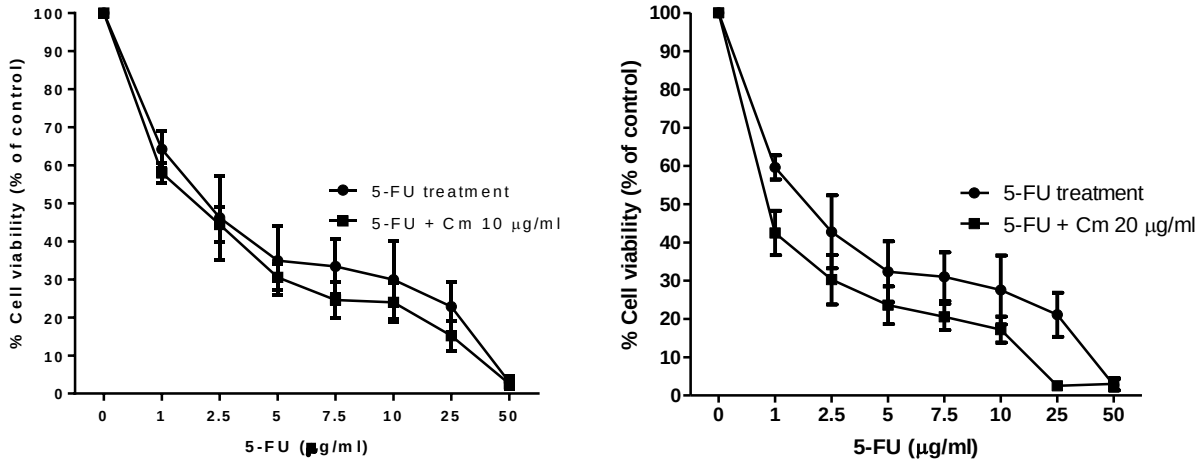
ผลการศึกษาหลังจากการทดสอบด้วยสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, และ 50 μg/ml เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสาร cyclopamine สามารถลดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตามความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของ cyclopamine ที่ 25 และ 50 μg/ml สามารถลดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ เมื่อคำนวณค่า IC_{50} values ที่ 24, 48, 72 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับ 30.52, 23.49 และ 21.99 μg/ml ตามลำดับ

12. การศึกษาความเป็นพิษของ cyclopamine ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค Drug toxicity testing



ผลการทดสอบแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10 และ 25 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 µg/ml มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จำนวนเซลล์เริ่มลดลงจากการทดสอบด้วยสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 µg/ml

13. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ cyclopamine และยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Drug combination assay



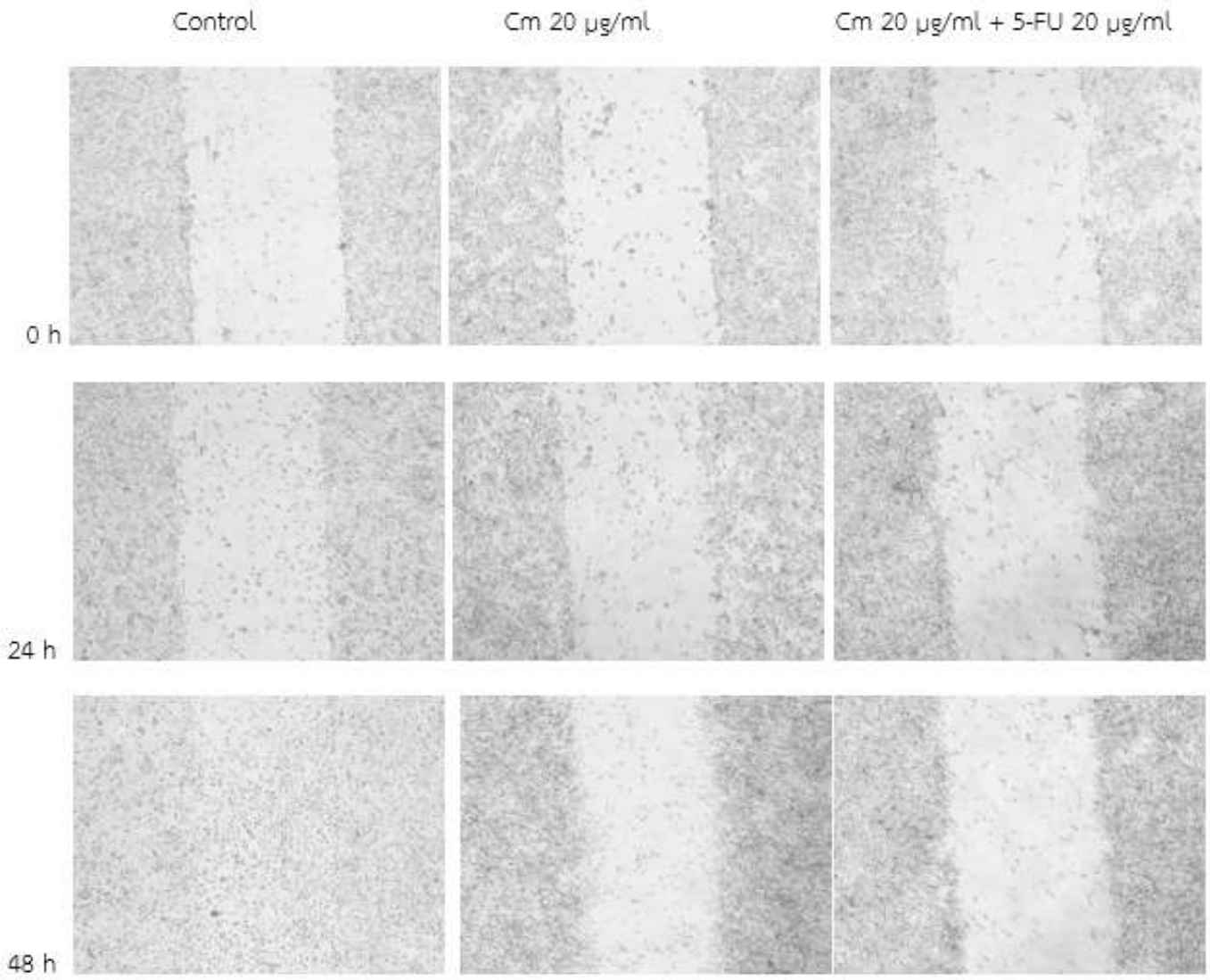
ตาราง แสดงค่า IC_{50} และ CI value ของการทดสอบด้วยสาร cyclopamine, 5-fluorouracil alone และ cyclopamine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml + 5-fluorouracil

Test compound	IC_{50} (µg/ml)	CI value	Description
Cyclopamine	23.49	-	-
5-FU single treatment	2.774	-	-
Cyclopamine 10 µg/ml +5-FU	1.516	0.973	synergism

*CI < 1, CI = 1, and CI > 1 were synergism (CI < 1), additive (CI = 1), antagonism (CI > 1), respectively.

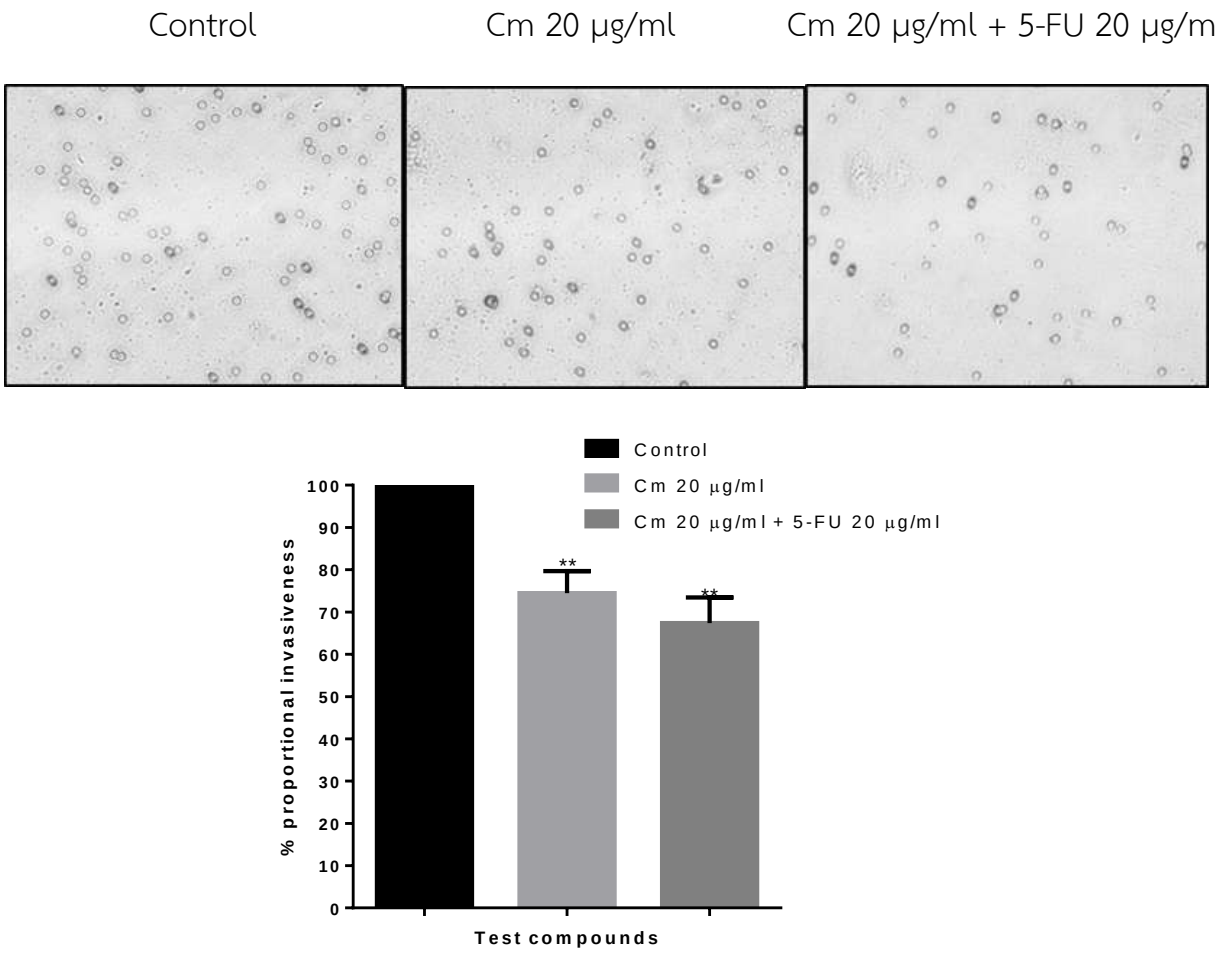
ผลการทดสอบแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, และ 50 µg/ml และสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 µg/ml พบว่า สาร cyclopamine สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-fluorouracil และลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว ค่า IC_{50} ของยา 5-fluorouracil ลดลงจาก 2.774 µg/ml เป็น 1.516 µg/ml เมื่อทดสอบร่วมกับ cyclopamine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณค่า Combination index (CI) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.973 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร cyclopamine และยา 5-fluorouracil เมื่อทดสอบร่วมกันให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (synergism)

14. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ cyclopamine และยา 5-fluorouracil ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells โดยใช้เทคนิค Scratch assay



กระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์มีความสำคัญระหว่างกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบหลังใช้ pipette tip ขนาด 200 µl ทำให้เกิดแผลและทดสอบด้วยสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml และ cyclopamine ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml + 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml พบว่าจำนวนของเซลล์มะเร็งที่เคลื่อนที่มายังบริเวณแผลลดลงอย่างมาก เมื่อทดสอบด้วยสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml และ เมื่อทดสอบร่วมกันระหว่าง cyclopamine + 5-fluorouracil พบว่าเสริมฤทธิ์กันในการลดจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เคลื่อนที่มายังบริเวณแผล

15. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells เมื่อทดสอบด้วยสาร cyclopamine และ cyclopamine+5-fluorouracil โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay



ผลการศึกษาพบว่าสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml สามารถยับยั้งเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ และเมื่อทดสอบด้วย cyclopamine ร่วมกับยา 5-fluorouracil สามารถยับยั้งเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสาร cyclopamine น่าจะมีประสิทธิภาพเป็น anti-invasive agents เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 พบว่าสาร oxymatrine มีฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักภายหลังการทดสอบด้วยสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบ โดยมียา 5-fluorouracil เป็น positive control โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตามความเข้มข้นของสารทดสอบที่เพิ่มมากขึ้นและระยะเวลาที่นานขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าสาร oxymatrine น่าจะสามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิดอื่นๆ

การวิจัยและพัฒนาสารสำคัญจากพืชสมุนไพรจีน หรือ traditional Chinese herb ในปัจจุบันเป็นที่สนใจของนักวิจัย เนื่องจากสารสำคัญในพืชมีฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญมากมาย จึงเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารดังกล่าว เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยามาตรฐานหรือนำมาใช้ร่วมกับการรักษามะเร็งวิธีอื่นๆ เนื่องจากการรักษามะเร็งแบบผสมผสาน (combination therapy) โดยการนำสารสำคัญจากพืชสมุนไพรไม่เพียงแต่เป็นการลดขนาดของยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็ง แต่ยังเป็นการลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมีบำบัดในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง จากการรายงานก่อนหน้าแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาร oxymatrine ในการยับยั้งมะเร็งชนิดต่างๆ โดยนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด ซึ่งผลการทดลองจากการทดสอบด้วยสาร oxymatrine ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 พบว่าสาร oxymatrine สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว โดยค่า combination index (CI value) ภายหลังการทดสอบด้วยสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีค่าเท่ากับ 0.02 เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว ที่มีค่า CI value เท่ากับ 1.25 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาระหว่างกันของสาร oxymatrine และยา 5-fluorouracil คือเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยแต่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสาร oxymatrine ในการเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-fluorouracil ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ได้มีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรจีน เช่น resveratrol และ ginsenoside ในการเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อยา 5-fluorouracil และเพิ่ม

ประสิทธิภาพของยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก แสดงให้เห็นว่า การรักษามะเร็งแบบผสมผสานโดยใช้สาร oxymatrine ร่วมกับยา 5-fluorouracil อาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ในการเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-fluorouracil และยังเป็นการลดขนาดของยา 5-fluorouracil ในการนำไปใช้ในผู้ป่วยมะเร็ง เพื่อลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ และเมื่อทดสอบผลเสริมฤทธิ์ของสาร oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (normal fibroblast, MRC-5 cells) พบว่าการทดสอบร่วมกันของสาร oxymatrine และยา 5-fluorouracil มีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ โดยค่า IC_{50} เมื่อทดสอบด้วยสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบร่วมกับ 5-fluorouracil ในเซลล์ปกติ มีค่าเท่ากับ 11.78, 8.29 และ 4.67 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว มีค่าเท่ากับ 4.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มสาร oxymatrine เพื่อทดสอบร่วมกับ 5-fluorouracil สามารถลดค่า IC_{50} ของยา 5-fluorouracil หรือความเป็นพิษของยา 5-fluorouracil ต่อเซลล์ปกติ แสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine มีความจำเพาะสูงในการฆ่าเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ เมื่อเทียบค่า IC_{50} จากการทดสอบในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง อีกทั้งขนาดของสาร oxymatrine ที่ใช้ในการทดสอบมีขนาดต่ำ แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง ในขนาดเดียวกันมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่า แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสาร oxymatrine และเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการนำ oxymatrine ไปใช้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักหรือพัฒนาต่อเป็น adjuvant therapy ในการให้กับผู้ป่วยมะเร็งทั้งก่อนและหลังการผ่าตัด เพื่อลดขนาดของก้อนมะเร็งและลดอัตราการเกิดมะเร็งซ้ำหลังการรักษา ในขณะที่ผลการศึกษาจากการทดสอบผลของสาร oxymatrine ต่อการเจริญเป็นโคโลนีหรือการเพิ่มจำนวนเพื่อขยายขนาดของโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก พบว่าสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งได้และเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil สามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วยสาร oxymatrine เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากเซลล์เดี่ยวๆเป็นโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ หรืออาจทำให้เซลล์มะเร็งสูญเสียการแบ่งตัว ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสารชนิดนี้ไปใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

กระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเป็นขั้นตอนสำคัญที่ส่งเสริมกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจากบริเวณที่เกิดมะเร็งไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย โดยเซลล์มะเร็งจะหลุดออกจากก้อนมะเร็งและเคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือดและระบบไหลเวียนน้ำเหลืองของร่างกาย เพื่อที่จะแพร่กระจายไปยังบริเวณ

อื่นๆของร่างกายหรืออวัยวะต่างๆ ผลของสาร oxymatrine ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง พบว่าสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดจำนวนของเซลล์มะเร็งมายังบริเวณที่เกิดแผล (wound) ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบ และเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil พบว่าสามารถยับยั้งจำนวนเซลล์มะเร็งที่เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิดแผลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถและฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของสาร oxymatrine ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

กระบวนการลุกลามของเซลล์มะเร็งเป็นขั้นตอนสำคัญในการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งจะเปลี่ยนแปลงโมเลกุลที่จำเพาะของเซลล์ เพื่อใช้ในการยึดเกาะกับเซลล์อื่นๆและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น คอลลาเจน และหลั่งเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายโปรตีน ที่มีชื่อว่า matrix metalloproteinase และเอนไซม์ที่ใช้สลายคอลลาเจน ที่มีชื่อว่า collagenase เพื่อย่อยสลายส่วนของ extracellular matrix, basement membrane และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เซลล์มะเร็งเป็นอิสระที่เคลื่อนที่เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดได้ ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของสาร oxymatrine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก พบว่า สาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดจำนวนของเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านชั้นของ matrigel และลดเปอร์เซ็นต์เซลล์มะเร็งที่ลุกลาม ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งเปอร์เซ็นต์เซลล์มะเร็งที่ลุกลาม ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยสาร oxymatrine เพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

เอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 เป็นชนิดของเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งและใช้เป็น marker ในมะเร็งหลายชนิดและใช้ในการวินิจฉัยระยะของมะเร็ง เอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 จึงเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษามะเร็ง เนื่องจากความสามารถในการแพร่กระจายนั้น มีความสัมพันธ์กับความสามารถของเซลล์มะเร็งในการทำลายชั้น basement membrane ผลการทดลองพบว่าสาร oxymatrine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดระดับการแสดงของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ใน cell supernatant เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil พบว่าสามารถลดระดับเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยสาร oxymatrine เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร oxymatrine สามารถลดการ

เคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ผ่านทางการลดการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 ซึ่งนำไปสู่การลดกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการดำเนินโรคมะเร็ง และเป็นไปได้ว่าสาร oxymatrine อาจมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase ชนิดอื่นๆ หรือ โมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นรีเซ็ฟเตอร์ในกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีการทดลองพบว่าสาร epigallocatechin-3-gallate สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ผ่านทางการลดการหลั่งเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า glaucine เป็นสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากพืชสามารถลดการลุกลามและการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งเต้านม ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร oxymatrine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และข้อมูลความปลอดภัยของสาร oxymatrine เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ในเซลล์ปกติ จึงเป็นไปได้ว่าข้อมูลนี้อาจจะนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนายาหรือสารสำคัญที่ได้จากพืชในการนำไปใช้ร่วมกับยา 5-fluorouracil เพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป

Cyclopamine เป็นสารสเตียรอยด์ที่ถูกแยกจากพืช *Veratrum californicum* มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่า cyclopamine ยับยั้งมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งเต้านม จากการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ cyclopamine ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells ผลการศึกษาพบว่าสาร cyclopamine ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, และ 50 µg/ml เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสาร cyclopamine สามารถลดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตามความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของ cyclopamine ที่ 25 และ 50 µg/ml สามารถลดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ เมื่อคำนวณค่า IC_{50} values ที่ 24, 48, 72 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับ 30.52, 23.49 และ 21.99 µg/ml ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของสาร cyclopamine กับยา 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก พบว่า เมื่อทดสอบร่วมกันสามารถลดเปอร์เซ็นต์ของรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยยา 5-fluorouracil เพียงอย่างเดียว มีค่า IC_{50} ของยา 5-fluorouracil ลดลงจาก 2.774 µg/ml เป็น 1.516 µg/ml เมื่อทดสอบร่วมกับ cyclopamine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณค่า Combination index (CI) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.973 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร cyclopamine และยา 5-fluorouracil เมื่อทดสอบร่วมกันให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (synergism) เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามพบว่าสาร

cyclopamine ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 และเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสาร cyclopamine ที่จะถูกนำไปพัฒนาของสารต้านมะเร็ง เพื่อยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในอนาคต

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร oxymatrine และ cyclopamine ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมากขึ้น ตลอดจนกลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาจากพืชสมุนไพรและสารสำคัญที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อนำไปใช้ร่วมกับยามาตรฐาน 5-fluorouracil ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยและลดอัตราการดื้อต่อการรักษาด้วยยา 5-fluorouracil ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อยอดในสัตว์ทดลองและผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป

ผลผลิต (Output)

- Manmuan S. (2017) Effects of oxymatrine isolated from *Sophora flavescens* on cell viability, cell migration and increasing the cytotoxic effect of 5-fluorouracil in SW-620 human colorectal cancer cells. The 4th International Conference on Advanced Pharmaceutical Research (ICAPH 2017), February 21-22, 2017, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand.

- Manmuan S, Yoykaew P, Thuetong P, Asipong P, Riantong N. (2017) Effects of Cyclopamine on Cell Viability, Cell Invasion, and 5-Fluorouracil Anticancer Activity in SW-620 Colorectal Cancer Cells. Proceedings of the 39th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand meeting. Vol.39, 2017.

- Manmuan S, Yoykaew P, Thuetong P, Asipong P, Riantong N. (2017) Effects of Cyclopamine on Cell Viability, Cell Invasion, and 5-Fluorouracil Anticancer Activity in SW-

620 Colorectal Cancer Cells. Poster Presented at 39th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand meeting. 18-20 May 2017, Bangsaen Heritage hotel, Chonburi, Thailand

- Manmuan S, Yoykaew P, Thuetong P, Asipong P, Riantong N. (2018) Potentiating Effect of Oxymatrine and 5-Fluorouracil on Cell Survival and Inhibits Cancer Metastasis in SW-620 Colorectal Cancer Cells. Vol 15: Forthcoming Issue: Medical Technology, Walailuk journal of Science and Technology (WJST).

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Ortega J, Vigil CE, Chodkiewicz C. Current progress in targeted therapy for colorectal cancer. Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center. 2010;17(1):7-15.
2. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. Ecancermedicalscience. 2015;9:520.
3. Nakayama et al. Current options for the diagnosis, staging and therapeutic management of colorectal cancer. Gastrointest Tumor. 2014 ; 1 : 25-32.
4. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. Molecules. 2008;13(8):1551-69.
5. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet. 2000;355(9209):1041-7.
6. Cui X, Wang Y, Kokudo N, Fang D, Tang W. Traditional Chinese medicine and related active compounds against hepatitis B virus infection. Bioscience trends. 2010;4(2):39-47.
7. Deng ZY, Li J, Jin Y, Chen XL, Lu XW. Effect of oxymatrine on the p38 mitogen-activated protein kinases signalling pathway in rats with CCl4 induced hepatic fibrosis. Chinese medical journal. 2009;122(12):1449-54.
8. Fan H, Li L, Zhang X, Liu Y, Yang C, Yang Y, et al. Oxymatrine downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-kappaB and protects rat brains against focal ischemia. Mediators of inflammation. 2009;2009:704706.
9. Song MQ, Zhu JS, Chen JL, Wang L, Da W, Zhu L, et al. Synergistic effect of oxymatrine and angiogenesis inhibitor NM-3 on modulating apoptosis in human gastric cancer cells. World journal of gastroenterology : WJG. 2007;13(12):1788-93.
10. Zhang Y, Piao B, Zhang Y, Hua B, Hou W, Xu W, et al. Oxymatrine diminishes the side population and inhibits the expression of beta-catenin in MCF-7 breast cancer cells. Medical oncology. 2011;28 Suppl 1:S99-107.

11. Song G, Luo Q, Qin J, Wang L, Shi Y, Sun C. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2006;48(1):1-5.
12. Wu C, Huang W, Guo Y, Xia P, Sun X, Pan X, et al. Oxymatrine inhibits the proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. Molecular medicine reports. 2015;11(6):4129-34.
13. Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. Science. 1998;280(5369):1603-7.
14. Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. Development. 1998;125(18):3553-62.
15. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. Genes & development. 2008;22(18):2454-72.
16. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010;16(12):3130-40.
17. Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li T, et al. (2011) Sonic Hedgehog Pathway Is Essential for Maintenance of Cancer Stem-Like Cells in Human Gastric Cancer. PLoS ONE 6(3)
18. Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. Journal of hepatology. 2011;55(4):838-45.
19. Zhou Y, Yang J, Kopecek J. Selective inhibitory effect of HPMA copolymer-cyclopamine conjugate on prostate cancer stem cells. Biomaterials. 2012;33(6):1863-72.
20. Kai M, Onishi H, Souzaki M, Tanaka H, Kubo M, Tanaka M, et al. Semi-quantitative evaluation of CD44(+) /CD24(-) tumor cell distribution in breast cancer tissue using a newly developed fluorescence immunohistochemical staining method. Cancer science. 2011;102(12):2132-8.

21. ภัทรวินฑ์ อัตตะสาระ และคณะ “มะเร็งที่พบมาก 10 อันดับแรกในผู้หญิง “ รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล ฉบับที่ 27 สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (2555) : 3.
22. Winawer SJ, Zauber AG. The advanced adenoma as the primary target of screening. Gastrointest Endosc Clin N Am. 2002 ; 12 : 1-9, v.
23. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. J Clin Oncol. 2009;27(6):872-7.
24. Wang G, Kelley RK, Gappnet. KRAS mutational analysis for colorectal cancer. Application: pharmacogenomic. PLoS Curr. 2010;2.
25. Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, Sykes DP. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. 2012;14(2):e31-47.
26. Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., et al., 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological function. Trends Plant Sci., 12(1):29-36.
27. Kim SL, Kim SH, Trang KT, Kim IH, Lee SO, Lee ST, et al. Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil in combination with parthenolide in human colorectal cancer. Cancer letters. 2013;335(2):479-86.
28. Liu J, Yao Y, Ding H, Chen R. Oxymatrine triggers apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and activating caspase-3/caspase-9 pathway in human leukemia HL-60 cells. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2014;35(6):5409-15.
29. Zhang Y, Sun S, Chen J, Ren P, Hu Y, Cao Z, et al. Oxymatrine induces mitochondria dependent apoptosis in human osteosarcoma MNNG/HOS cells through inhibition of PI3K/Akt pathway. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2014;35(2):1619-25.

30. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. Nature. 2000;406(6799):1005-9.
31. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. Science. 2002;297(5586):1559-61.
32. Yao J, An Y, Wie JS, Ji ZL, Lu ZP, Wu JL, et al. Cyclopamine reverts acquired chemoresistance and down-regulates cancer stem cell markers in pancreatic cancer cell lines. Swiss medical weekly. 2011;141:w13208.
33. Zhu DM, Xue WL, Tao W, Li JC. Effects of cyclopamine on the biological characteristics of human breast cancer MCF-7 cell line and its mechanism. Eur J Gynaecol Oncol. 2015;36(4):469-72.
34. Lu ZY, Lu LD, Liang-Hong MA. Effects of cyclopamine on the proliferation and apoptosis of LNCaP cells and expression of the PCA3 gene in human prostate cancer. Zhonghua Nan Ke Xue. 2014;20(3):213-7.
35. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. Nat Rev Cancer. 2011;11(7):512-22.
36. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002;2(3):161-74.
37. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. 2002;295(5564):2387-92.
38. Hu, J.; van den Steen, P.E.; Sang, Q.X.; Opdenakker, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 2007, 6, 480–498.
39. Dragutinovic VV, Radonjic NV, Petronijevic ND, Tatic SB, Dimitrijevic IB, Radovanovic NS, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. Mol Cell Biochem. 2011;355(1-2):173-8.

ภาคผนวก

Buffers and reagents

1. RPMI 1640 stock solution ปริมาตร 1 ลิตร

- RPMI powder 10.4 g
- $NaHCO_3$ 1.5 g
- ddH_20 900 ml

ปรับ pH ที่ 7.4 โดย 1 M HCl และ 1 M NaOH

เติม ddH_20 จนได้ปริมาตร 1 ลิตร และกรองผ่านหัวกรอง ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร

2. 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร

- NaCl 80.65 g
- KCl 2 g
- KH_2PO_4 2 g
- Na_2HPO_4 11.5 g
- ddH_2O 900 ml

ปรับ pH ที่ 7.4 โดย 1 M HCl และ 1 M NaOH

เติม ddH_20 จนได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไป sterilized โดยวิธี autoclave

3. Complete RPMI1640 media ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- Incomplete RPMI1640 media 89 ml
- Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) 10 ml
- Penicillin/Streptomycin 1 ml