



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม
Investigation of potential anticancer compound from
Etlingera pavieana rhizome

โดย

ดร. ผาณิตา เอี้ยวชิโป
ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข
ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล
ดร. อนันต์ อธิพรชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802355 (222385)

สัญญาเลขที่ 69/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม
Investigation of potential anticancer compound from
Etlingera pavieana rhizome

โดย

ดร. ผาณิตา เอี้ยวชิโป

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร. อนันต์ อธิพรชัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการเสร็จสิ้น สิงหาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 69/2559

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ตลอดจนเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ มา ณ ที่นี้ด้วย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งจัดเป็นโรคร้ายที่คร่าชีวิตคนไทยเป็นอันดับหนึ่ง โดยผู้เสียชีวิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา จากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2555 ที่ผ่านมา พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้อีกถึง 63,272 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 98.5 คนต่อประชากร 100,000 คน โดยมีมะเร็งที่มีผู้เสียชีวิตมากที่สุดเป็นอันดับต้นๆ ได้แก่ มะเร็งตับและท่อน้ำดี มีผู้เสียชีวิตถึง 14,469 คน มะเร็งปอดและหลอดลม 10,652 คน มะเร็งเต้านม 2,896 คน มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 2,879 คน และมะเร็งปากมดลูก 1,915 คน (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข) ซึ่งโรคมะเร็งนอกจากจะทำให้เกิดความทุกข์ทรมานต่อผู้ป่วยจนไปถึงการเสียชีวิตแล้ว ยังทำให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่มากมายตลอดช่วงเวลาในการรักษา ส่งผลให้ประเทศสูญเสียทรัพยากรบุคคล สูญเสียงบประมาณในการอภิบาลรักษาและนำเข้ายารักษาโรค อันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้ ดังนั้น การป้องกันและรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดการสูญเสียนี้

ในปัจจุบัน วิธีการรักษาโรคมะเร็ง มีทั้งการฉายรังสี การรักษาด้วยเคมีบำบัด และการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง และการรักษาแบบเคมีบำบัดด้วยยาในปัจจุบันก็ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยมาก เช่น ผมร่วง คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เป็นต้น การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความสนใจอย่างมากทั้งในคนไทยและชาวต่างชาติ เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าการใช้สารเคมี เสียค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่า และเป็นการใช้ประโยชน์จากพืชที่หาได้ทั่วไปในเขตชุมชนซึ่งผู้ป่วยและครอบครัวมีความคุ้นเคยเป็นอย่างดี และอาจมีการบริโภคตามคำบอกเล่าต่อกันมาอยู่แล้ว การศึกษาวิจัยฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านมะเร็งจึงเป็นการนำเอาความรู้ทางวิทยาศาสตร์เข้าไปสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในท้องถิ่น และยืนยันถึงฤทธิ์การรักษาที่มีอยู่จริงในสมุนไพรนั้น เป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับพืชท้องถิ่น สนับสนุนภูมิปัญญาชาวบ้านเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับตัวยาที่มีอยู่ในสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง เป็นการลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันจากต่างประเทศ ช่วยประหยัดงบประมาณให้กับประเทศและอาจเป็นการนำรายได้เข้าสู่ประเทศจากการส่งออกยาสมุนไพรเหล่านี้

เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etingera paviana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้หลายชนิดเคยมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ เช่น ขมิ้น (*Curcuma longa*) กระชาย (*Boesenbergia pandurata*) จิง (*Zingiber officinale*) ข่า (*Alpinia galangal*) *Etingera velutina*, *Etingera belalongensis* และ *Zingiber vinosum* เป็นต้น โดยผลวิจัยชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7, MDA-MB231), เซลล์มะเร็งรังไข่ (CaOV3, SKOV3ip1) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU145 และ LNCaP) เป็นต้น รวมทั้งในหนูทดลองด้วย (Elkady Al *et al.*, 2012; Sinha D *et al.*, 2012; Debata PR *et al.*, 2013; Lin YG *et al.*,

2007; Mukhopadhyay A *et al.*, 2001; Rahman S *et al.*, 2011; Sabli F *et al.*, 2012; Vinothkumar R *et al.*, 2014; Samarghandian S *et al.*, 2014) นอกจากนี้ยังมีการแสดงให้เห็นถึงการใช้สารสกัดจากชิงร่วมกับยา gemcitabine ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ได้มากกว่าการใช้ยา gemcitabine เพียงอย่างเดียว (Sharma C *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชในวงศ์นี้ออกมามากมาย แต่ยังไม่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์นี้ในเร่วหอมมาก่อน ซึ่งเร่วหอมถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในภาคตะวันออกของไทย มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นหอม เหง้านิยมใช้เป็นเครื่องเทศปรุงอาหารรับประทานในชีวิตประจำวัน ใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) จากงานวิจัยของ เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข (2551) พบว่า ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ค่า $IC_{50} = 16.28 \pm 9.16 \mu\text{g/ml}$) และสามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 (PGE_2) ลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน รวมถึงลดการเคลื่อนที่ของ p65 NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียสและเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; Palachot M, 2012) และเนื่องจากกระบวนการอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดและการพัฒนาของมะเร็งให้มีความรุนแรงมากขึ้น กล่าวคือ NF- κ B สามารถป้องกันการตาย (apoptosis) ของ transformed cell และส่งเสริมให้มะเร็งลุกลาม (invasion) และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ (metastasis) (Greten FR *et al.*, 2004; Yang CR *et al.*, 2005; Luo JL *et al.*, 2004) ไนตริกออกไซด์เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็ง และสนับสนุนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยส่งเสริมการลุกลามและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) มายังก้อนมะเร็ง (Rao CV, 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษากลไกของสาร 1'-Acetoxychavicol acetate (ACA) ซึ่งสกัดได้จากเหง้าว่าสามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด multiple myeloma ได้ทั้งในหลอดทดลองและในหนูโดยกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis และยับยั้งวิถี NF- κ B (Ito K *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับสารประกอบบริสุทธิ์ curcumin จากขมิ้นซึ่งก็พบว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็งและการสร้างเส้นเลือดใหม่ในมะเร็งรังไข่ได้โดยผ่านทางกลไกยับยั้งวิถี NF- κ B (Lin YG *et al.*, 2007) ซึ่งจากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้ ทำให้คณะผู้วิจัยเห็นว่า มีแนวโน้มเป็นอย่างมากที่สารสกัดจากเร่วหอมจะมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ และจากการทดสอบก่อนหน้า (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558) คณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและเวลาที่ใช้บ่ม และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยเมื่อนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่า sub-fraction ทั้ง 5 ชนิด (F1-F5) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยที่ความเข้มข้นสารน้อยกว่าหรือเท่ากับ

50 µg/ml และเวลาในการบ่มเท่ากับ 24 ชั่วโมง sub-fraction F1 แสดงความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งและไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ตอบสนองต่อ sub-fraction F1 ได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 แสดงให้เห็นว่า sub-fraction F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายกลุ่มและเหมาะสมที่จะนำไปแยกหาสารประกอบบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง รวมทั้งศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการต้านเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ต่อไป อันมีความเป้าหมายในระยะยาวเพื่อนำสารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้นั้นมาใช้แทนยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หรือใช้ร่วมกับกับยาแผนปัจจุบันเพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นการเพิ่มคุณค่าและค่านิยมให้กับการบริโภคสมุนไพรท้องถิ่น อีกทั้งเป็นการกระตุ้นเศรษฐกิจของชุมชนภาคตะวันออกให้หันมาปลูกเร็วหอมเป็นเชิงพาณิชย์มากขึ้นด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

จากการศึกษาและพบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเหง้าเร็วหอมที่มีต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด (โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘) ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยที่ทำต่อเนื่องและมีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1. เพื่อหาสารประกอบบริสุทธิ์ในเร็วหอมที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารประกอบบริสุทธิ์จากเหง้าเร็วหอมในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
3. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารประกอบบริสุทธิ์ในเร็วหอมกับยาที่ใช้รักษามะเร็งในปัจจุบัน

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ sub-fraction F1 (F1) จะถูกนำไปวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบ ด้วยวิธี NMR และ ยืนยันสารองค์ประกอบหลักด้วยวิธี HPLC จากนั้น สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ F1 จะถูกนำมาทดสอบผลที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay และทดสอบการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (cell cycle analysis) และการตายของเซลล์ (apoptosis assay) ด้วย Flow Cytometry เปรียบเทียบฤทธิ์กับยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน (cisplatin) ตามด้วยการศึกษาการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล โดยจะศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งเซลล์ ยีนที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ ยีนที่ควบคุมการตายของเซลล์ และยีนในวิถี NF-κB ทั้งหมดประมาณ 5 ยีน ด้วยวิธี Real-time PCR และ Western blot analysis

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติระดับโมเลกุลของเซลล์ร่างกาย โดยมีขั้นตอนในการเกิดโรคหลายขั้นตอนกว่าที่เซลล์ร่างกายปกติจะกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ (multistep carcinogenesis) ซึ่งเริ่มแรกอาจถูกชักนำโดยปัจจัยทางกายภาพภายนอก เช่น สารเคมี รังสี การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย เป็นต้น แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (gene) ในเซลล์ร่างกายอย่างถาวร ทำให้เซลล์นั้นมีความผิดปกติในการเจริญเติบโตและแบ่งตัว และเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ธรรมดา กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ซึ่งจะสามารถลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังที่อื่นๆ ในร่างกาย (metastasis) ตามระบบน้ำเหลืองหรือระบบเลือด จนไปเกิดเป็นเซลล์มะเร็งที่อวัยวะที่อยู่ไกลออกไปได้

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน มีทั้งการฉายรังสี (radiation therapy) การผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป (surgery) และการรักษาโดยใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) โดยจะเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือรักษาหลายวิธีร่วมกันขึ้นกับชนิดและระยะของมะเร็ง ซึ่งความแตกต่างของการใช้เคมีบำบัดกับการรักษาแบบสองวิธีแรกคือ ตัวยาจะสามารถเคลื่อนที่ไปได้ทุกส่วนของร่างกายเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ ในขณะที่การฉายรังสีหรือการผ่าตัดจะเป็นการกำจัดมะเร็งเฉพาะส่วนที่ได้รับการรักษาเท่านั้น ในปัจจุบันมียาเคมีบำบัดที่ผลิตออกมามากกว่า 100 ชนิด ซึ่งยาแต่ละตัวจะมีคุณสมบัติที่ต่างกันไป แต่ถึงแม้จะมียารักษามะเร็งอยู่มากมาย การคิดค้นวิจัยเพื่อผลิตตัวยาใหม่ๆ หรือวิธีการรักษาแบบใหม่ก็ยังคงเกิดขึ้นอยู่เรื่อยๆ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้โรคหายขาดหรือบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น เพิ่มการตอบสนองต่อการรักษา เพิ่มความจำเพาะของตัวยาต่อเซลล์มะเร็ง และมีความมุ่งหวังที่จะให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยน้อยที่สุด

การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความสนใจทั้งในคนไทยและชาวต่างชาติ เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าการใช้สารเคมี เสียค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่า และเป็นการใช้ประโยชน์จากพืชที่หาได้ทั่วไปในเขตชุมชนซึ่งผู้ป่วยและครอบครัวมีความคุ้นเคยเป็นอย่างดี เป็นพืชพื้นบ้านที่รับประทานในชีวิตประจำวันและอาจมีการบริโภคเป็นยารักษาโรคหรือยาบำรุงร่างกายตามคำบอกเล่าต่อกันมาอยู่แล้ว สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิด ก็มีรายงานการวิจัยว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ เช่น curcumin ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากขมิ้น (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ในด้านอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งต้านมะเร็งหลายชนิดทั้งในหลอดทดลองและในหนู เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม เป็นต้น (Sinha D *et al.*, 2012; Debata PR *et al.*, 2013; Lin YG *et al.*, 2007; Mukhopadhyay A *et al.*, 2001) สาร panduratin A ซึ่งสกัดได้จากกระชาย (*Boesenbergia pandurata*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 (Kirana C *et al.*, 2007), สารสกัดจากขิง (*Zingiber officinale*) สามารถต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 ได้ และถ้าใช้ร่วมกับยา gemcitabine จะทำให้กระตุ้นการตายของ

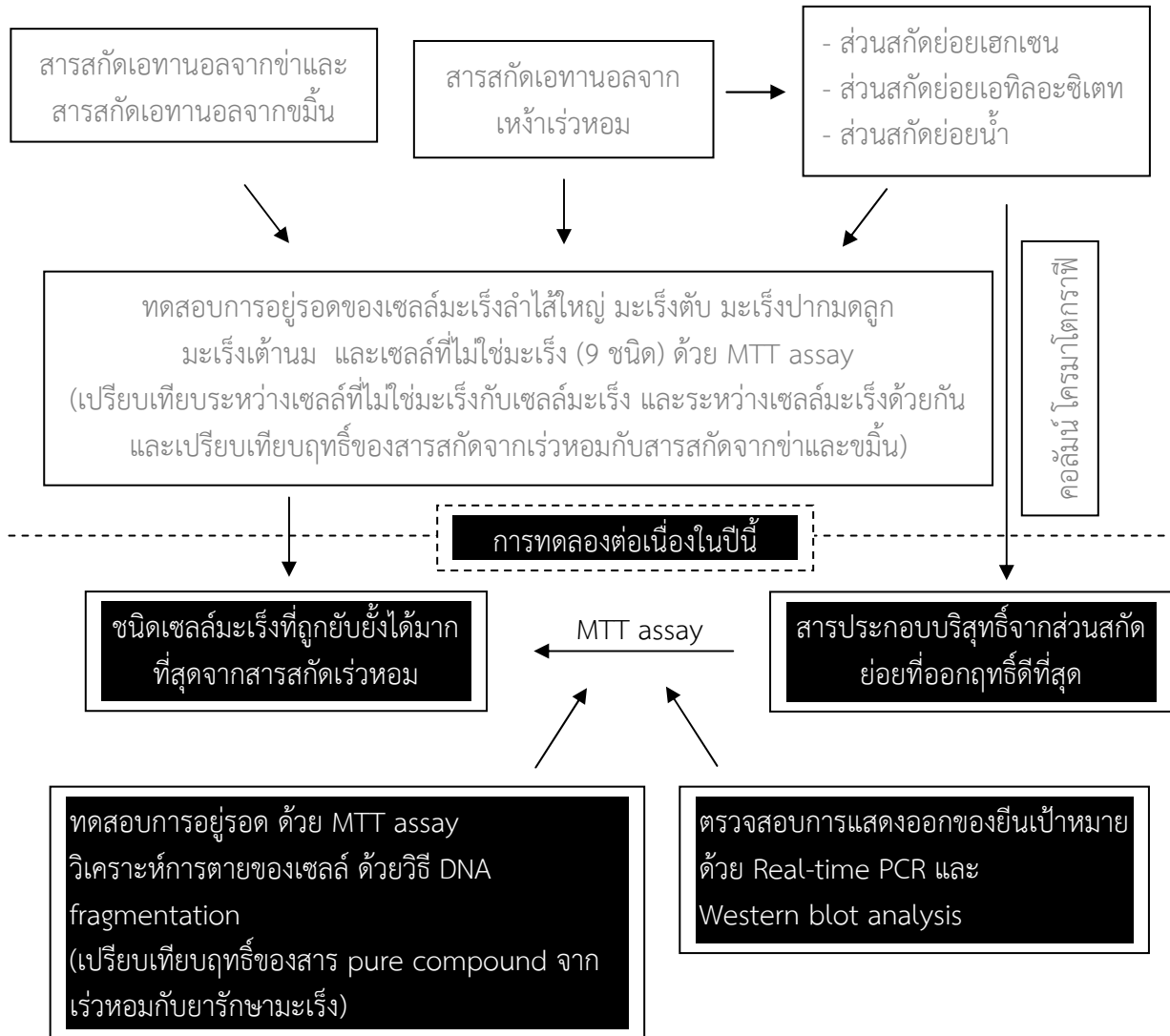
เซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ได้มากขึ้น (Rahman S *et al.*, 2011; Sharma C *et al.*, 2009) ,สาร phenylbutenoid, (\pm)-*trans*-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3,4-dimethoxystyryl]cyclohexene (PSC) ซึ่งสกัดได้จาก *Zingiber cassumunar* มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอด A549 (Lee JW *et al.*, 2007) และสารสกัดจาก *Kaempferia galangal* L. (ethyl *p*-methoxycinnamate) กระตุ้นการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ เป็นต้น (Liu B *et al.*, 2010)

เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและบุก พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น จันทบุรี ระยอง และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับ ปัสสาวะ แก้ลม และแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียง แกงป่า และ ผัดเผ็ด ในอดีตเร่วหอมนิยมปลูกเพื่อเป็นพืชสวนครัวและปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อชุดเหง้าจำหน่าย แต่ในปัจจุบัน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์มากขึ้น เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (<http://www.kehakaset.com>) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Srisook K and Srisook E, 2011) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ ลดการกระตุ้น NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (Palachot M, 2012) และเนื่องจากกระบวนการอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งและการพัฒนาของโรคมะเร็งให้มีความรุนแรงมากขึ้น กล่าวคือ NF- κ B ป้องกันการตาย (apoptosis) ของ transformed cell และส่งเสริมให้มะเร็งลุกลาม (invasion) และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ (metastasis) (Greten FR *et al.*, 2004; Yang CR *et al.*, 2005; Luo JL *et al.*, 2004) อีกทั้ง ไนตริกออกไซด์ยังเกี่ยวข้องกับเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็ง และสนับสนุนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยส่งเสริมการลุกลามและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) มายังก้อนมะเร็งอีกด้วย (Rao CV, 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาของ curcumin ในการยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็งและการสร้างเส้นเลือดใหม่ในมะเร็งรังไข่โดยผ่านทางกลไกการยับยั้งวิถี NF- κ B (Lin YG *et al.*, 2007) และจากการทดสอบก่อนหน้านี้ (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558) คณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและเวลาที่ใช้

บ่ม และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยเมื่อนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่า sub-fraction ทั้ง 5 ชนิด (F1-F5) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยที่ความเข้มข้นสารน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 µg/ml และเวลาในการบ่มเท่ากับ 24 ชั่วโมง sub-fraction F1 แสดงความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งและไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ตอบสนองต่อ sub-fraction F1 ได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 แสดงให้เห็นว่า sub-fraction F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายกลุ่ม ในงานวิจัยชิ้นนี้คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาต่อเพื่อค้นหาสารประกอบบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งที่มีอยู่ใน sub-fraction F1 รวมทั้งศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารประกอบบริสุทธิ์นั้นที่ใช้ในการต้านเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

ภาพรวมของขั้นตอนการวิจัยทั้งหมดแสดงได้ดังแผนภาพด้านล่าง



3.1 การเตรียม sub-fraction เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบด้วยวิธี Nuclear Magnetic resonance (NMR)

ชั่งน้ำหนักของ sub-fraction F1 ปริมาณ 5 mg แล้วละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Chloroform-d (CDCl₃) ปริมาตร 750 µl ใส่หลอด NMR ปิดฝา ส่งไปทำ ¹H-NMR ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.2 การเตรียมสารสำหรับทดสอบ

สาร Trans-4-Methoxycinnamaldehyde (4-MCA) ถูกสั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich (ประเทศสหรัฐอเมริกา) จะถูกเตรียมให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 0.5 M ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และทำการเจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.075 M และ 0.15 M ในการทดสอบฤทธิ์ สารจะถูกเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 150 μ M และ 300 μ M (ปริมาตรรวม 100 μ l) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.2% (v/v)

3.3 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ซึ่งถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay (Wanichwatanadecha P *et al.*, 2012)

เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งจะถูกเลี้ยงใน 96-well plate ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนทำการทดสอบ 24 ชั่วโมง จากนั้นจะใส่สารทดสอบลงไป บ่มเซลล์ไว้ 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงที่มีสารละลาย MTT 5 mg/ml ซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBS ลงไป นำเซลล์กลับไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายผลึกสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 200 μ l DMSO ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตรอด} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารสกัด}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารสกัด}} \times 100$$

โดยจะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วรายงานผลการยับยั้งมะเร็งของสารสกัดด้วยค่า IC₅₀ (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%)

3.5 การวิเคราะห์การตายของเซลล์ ด้วยวิธี DNA fragmentation

เซลล์จะถูกเลี้ยงไว้ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนทำการทดสอบ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สารทดสอบผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ บ่มเซลล์ไว้ 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์และทำการสกัด Genomic DNA ด้วยชุดสกัด (FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit) จากนั้นนำมาวิเคราะห์แถบ DNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis

3.6 การทดสอบผลของสารประกอบบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งเซลล์ ยีนที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ ยีนที่ควบคุมการตายของเซลล์ และยีนในวิถี NF-κB

3.6.1 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับ mRNA ด้วยวิธี Real-time PCR (Wanichwatanadecha P *et al.*, 2012)

ปริมาณ mRNA ของยีนเป้าหมายทั้งหมดจะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ผสมสารสกัด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด RNA ทั้งหมดชุดสกัด illustraTM RNAspin Mini (GE healthcare) วัดปริมาณ RNA ที่ได้โดยใช้เครื่อง NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific) จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ทั้งหมดที่ได้ด้วยวิธี reverse transcription ด้วยเอนไซม์ SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) แล้วนำ cDNA ที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ mRNA ของยีนเป้าหมาย ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ระบบติดตามเป็น qPCR BIO SyGreen Mix Lo-Rox (PCR BIOSYSTEM) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย ทั้ง 9 ยีน (ตารางที่ 3-1) จากนั้นวิเคราะห์หา cycle of threshold (Ct) ของแต่ละปฏิกิริยา แล้วนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณหาการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเปรียบเทียบเชิงสัมพันธ์กับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ตามสมการด้านล่าง

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{เซลล์ที่ได้รับสารสกัด}) - \Delta Ct (\text{เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด})$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ ของยีนเป้าหมาย} - Ct \text{ ของยีนควบคุม*}$$

*ยีนควบคุม หมายถึง housekeeping gene ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* เป็นยีนควบคุมทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.6.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับโปรตีนด้วย Western blot analysis (Wanichwatanadecha P *et al.*, 2012)

ปริมาณโปรตีนของยีนเป้าหมายจะถูกตรวจสอบด้วยวิธี Western blot analysis โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ผสมสารสกัด 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็น 2 ครั้ง ใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml ปั่นเพื่อเอาตะกอนเซลล์แล้วเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1%(v/v) SDS, 1% (v/v) sodium deoxycholate, 1%(v/v) Nonidet P-40] ปริมาตร 40 μL ซึ่งผสมสารละลาย 1X protease inhibitors ผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 12.5% separating gel และ 4% stacking gel ก่อนจะย้ายโปรตีนบนแผ่นเจลไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifluoride (PVDF) จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะ

ต่อโปรตีนเป้าหมายและ GAPDH (primary antibody) บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C พร้อมทั้งเขย่าข้ามคืน ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T 3 ครั้งก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T แล้วนำไปบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม Bio-1D เวอร์ชัน 12.10a (Vilber Lourmat) แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีนเป้าหมาย ในเซลล์ที่สัมผัสสารสกัดเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่สัมผัสสารสกัด ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

ตารางที่ 3-1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และขนาดของผลผลิต ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา realtime RT-PCR

ยีน	ไพรเมอร์	ผลผลิต (bp)
<i>p21/CDK1A</i>	Forward: 5'-GACCAGCATGACAGATTTTC-3'	141 bp
	Revers: 5'-TGAGACTAAGGCAGAAGATG-3'	
<i>TP53</i>	Forward: 5'-TGAGGTGCGTGTGGTGCCTGT-3'	217 bp
	Revers: 5'-TCGGAACATCTCGAAGCGCTCA-3'	
<i>Bax</i>	Forward: 5'-CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAC-3'	99 bp
	Revers: 5'-CCACCCTGGTCTGGATCCAGCCC-3'	
<i>p65</i>	Forward: 5'-CTGCAGTTTGATGATGAAGA-3'	183 bp
	Revers: 5'-TAGGCGAGTTATAGCCTCAG-3'	
<i>C-myc</i>	Forward: 5'-GGCTCCTGGCAAAAGGTCA-3'	119 bp
	Revers: 5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'	
<i>Bcl-2</i>	Forward: 5'-TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG-3'	114 bp
	Revers: 5'-GGTGCCGGTTCAGGTAAGTCAAGTCA-3'	
<i>CyclinD1</i>	Forward: 5-TGGAGCCCGTGAAAAAGAGC-3'	75 bp
	Revers: 5'-TCTCCTTCATCTTAGAGGCCAC-3'	
<i>Survivin</i>	Forward: 5'-AAGAACTGGCCCTTCTTGGA-3'	253 bp
	Revers: 5'-CAACCGGACGAATGCTTTT-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	226 bp
	Revers: 5'-GAAGATGGTGGATGGGATTTTC-3'	

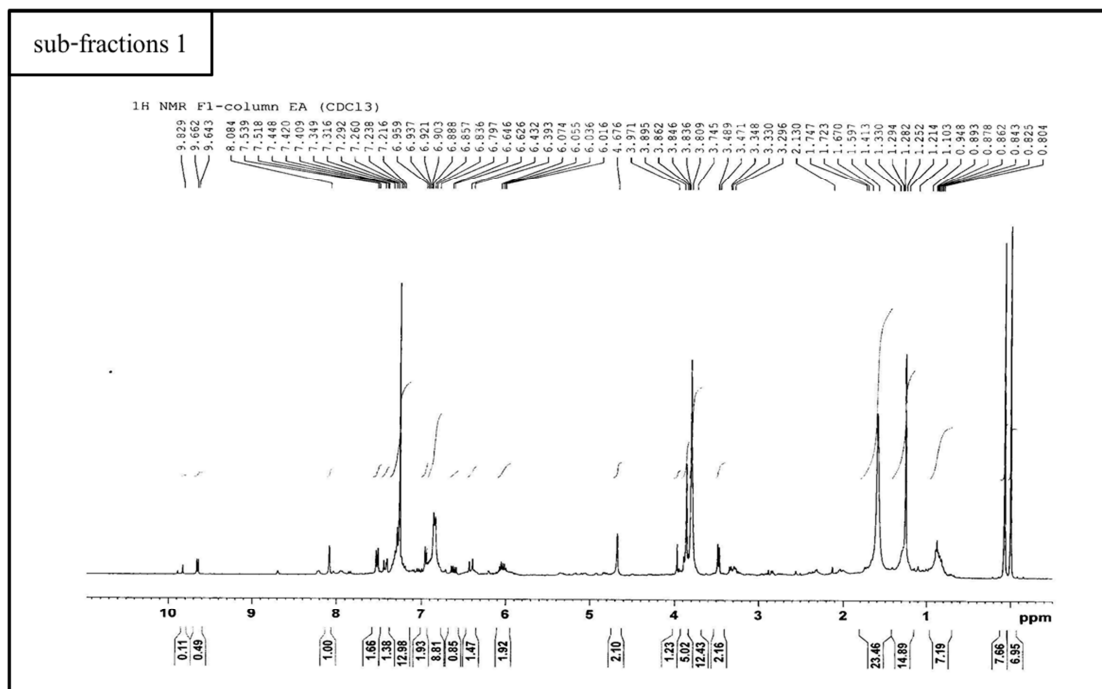
3.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ด้วย ANOVA และ Tukey's Honestly Significant Difference โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

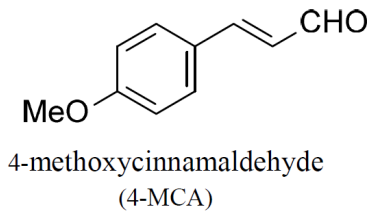
บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบด้วยวิธี Nuclear Magnetic resonance (NMR)

จากที่คณะผู้วิจัยพบว่า sub-fraction F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้มากที่สุดและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง Vero (รายงานฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558) ดังนั้น sub-fraction F1 จึงถูกเลือกไปทำการวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบที่มีอยู่ ด้วยวิธี NMR ซึ่งผลจากการทำ $^1\text{H-NMR}$ พบพิกัดที่ $\delta 9.62$ ppm ลักษณะเป็น doublet ($J = 7.6$ Hz) ของหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ซึ่งน่าจะต่ออยู่กับโปรตอนของพันธะคู่ที่ติดกับวงแหวนอะโรมาติก (ArCH=CH-CHO) และพบพิกัดที่ $\delta 3.80$ ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทอกซี (-OCH₃) ที่เกาะอยู่กับวงแหวนอะโรมาติก (ภาพที่ 4-1) จากการเปรียบเทียบข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ข้างต้นกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 4-methoxycinnamaldehyde ที่เคยรายงานมาแล้ว (Battistuzzi G et al., 2003; Srisook E et al., 2017) ระบุได้ว่า สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ sub-fraction F1 คือ สาร 4-methoxycinnamaldehyde หรือ 4-MCA (ภาพที่ 4-2)



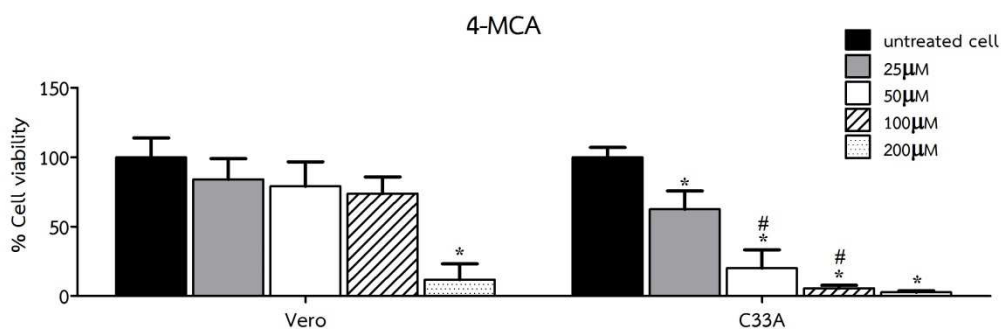
ภาพที่ 4-1 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของ sub-fraction F1 ใน CDCl_3



ภาพที่ 4-2 โครงสร้างสาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA)

4.2 ผลของสาร 4-MCA ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

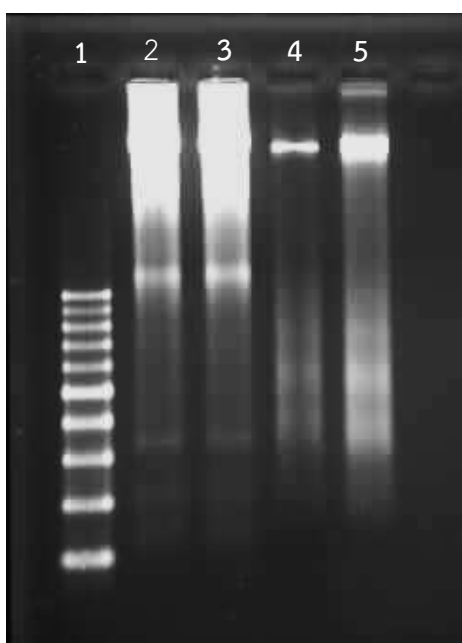
จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสาร 4-MCA ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง C33A และเซลล์ที่ไม่ใช่ มะเร็ง Vero ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สาร 4-MCA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A ได้ ใน ลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น กล่าวคือ การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งจะลดลงมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ของสาร 4-MCA มากขึ้น ในขณะที่สาร 4-MCA ไม่ส่งผลกระทบต่อ การเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่ มะเร็ง Vero (ภาพที่ 4-3) โดยค่า %การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A ที่ได้รับสาร 4-MCA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ความ เข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100 และ 200 μM มีค่าเท่ากับ $62.50 \pm 13.18\%$, $20.09 \pm 13.17\%$, $5.63 \pm 2.12\%$ และ $2.75 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ และ%การมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero ที่ได้รับสารเป็นเวลาเท่ากันที่ความ เข้มข้นดังกล่าว มีค่าเท่ากับ $84.06 \pm 15.04\%$, $79.08 \pm 17.72\%$, $73.88 \pm 11.93\%$ และ $11.79 \pm 11.38\%$ ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} ของสาร 4-MCA ต่อเซลล์ทั้งสอง เท่ากับ 30 และ 140 μM ตามลำดับ



ภาพที่ 4-3 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A และเซลล์ที่ไม่ใช่ มะเร็ง Vero เมื่อได้รับสาร 4-MCA เป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3 ผลการวิเคราะห์การตายของเซลล์ ด้วยวิธี DNA fragmentation

สาร 4-MCA ได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์การเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ด้วยการวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอโครโมโซม (genomic DNA) โดยหลังจากที่เซลล์ได้รับสาร 4-MCA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลจากการทำ gel electrophoresis (ภาพที่ 4-4) พบว่า ดีเอ็นเอโครโมโซมของเซลล์มะเร็ง C33A ที่ได้รับสาร 4-MCA จะมีขนาดที่เล็กลง โดยมีขนาดต่างๆ ปะปนกัน เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอเรียงกันเป็น ladder บนเจล (lane 5) บ่งบอกถึงการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอโครโมโซม ลักษณะเช่นนี้เหมือนกันกับที่พบในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารสกัดย่อย sub-fraction F1 (lane 4) ซึ่งจะแตกต่างกับเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้รับสารใดๆ และเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย ที่จะไม่พบการแตกหักของดีเอ็นเอโครโมโซม (lane 2 และ 3 ตามลำดับ)



ภาพที่ 4-4 ดีเอ็นเอโครโมโซมของเซลล์มะเร็ง C33A ที่ได้รับอาหารปกติ (lane 2) อาหารผสม DMSO (lane 3) อาหารผสมสารสกัดย่อย sub-fraction F1 (lane 4) และอาหารผสมสาร 4-MCA (lane 5) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (lane 1) หลังตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

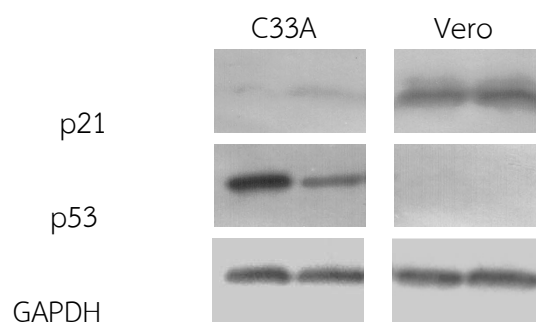
4.4 ผลการแสดงออกของยีนเป้าหมายของเซลล์ที่ได้รับสาร 4-MCA

เซลล์มะเร็ง c33A และเซลล์ Vero ที่ได้รับสาร 4-MCA ความเข้มข้น 150 μ M เป็นเวลา 24 ชม. จะถูกนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *p21/CDK1A*, *TP53*, *Bax*, *p65*, *C-myc*, *Bcl-2*, *CyclinD1*, *Survivin* และยีนควบคุม *GAPDH* ด้วยวิธี real-time RT PCR ผลจากการคำนวณเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ แสดงดังภาพที่ 4-5 พบว่า เซลล์มะเร็ง c33A ที่ได้รับสาร 4-MCA มีการแสดงออกของยีน *p21*, *p65* และ *C-myc* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็น 3.91, 1.90 และ 2.94 เท่าของเซลล์ c33A

ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 4-MCA สามารถลดการแสดงออกของยีน *TP53*, *Bax* และ *Survivin* ได้ 1.36, 1.32 และ 1.36 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ แต่ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และ *CyclinD1* ระหว่างเซลล์ที่ได้รับสารและไม่ได้รับสาร 4-MCA

4.5 ผลของสาร 4-MCA ที่มีต่อปริมาณโปรตีน p21 และ p53

เมื่อนำเซลล์มะเร็ง C33A และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ที่ได้รับสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้น 150 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธี western blot ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-6 พบว่าเมื่อเซลล์มะเร็ง C33A ได้รับสาร 4-MCA จะมีปริมาณโปรตีน p21 ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีน p53 ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร (lane X และ Y เมื่อเทียบกับ lane A และ B ตามลำดับ) แต่สำหรับเซลล์ Vero ที่ได้รับสารหรือไม่ได้รับสาร 4-MCA จะไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณโปรตีนทั้งสองชนิดนี้



ภาพที่ 4-6 ปริมาณโปรตีนเป้าหมายจากเซลล์มะเร็ง C33A และเซลล์ Vero ที่ได้รับสาร 4-MCA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการตรวจสอบด้วยวิธี western blot

บทที่ 5

อภิปราย สรุปการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยที่พบว่า สารสกัดหยาดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด และมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Wanichwatanadecha et al, 2016; ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2558) คณะผู้วิจัยจึงได้นำสารสกัดหยาดไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ ตามลำดับ ซึ่งผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต มีความสามารถในการต้านมะเร็งได้ดีที่สุด และเมื่อนำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography พบว่า sub-fractions ทั้ง 5 sub-fractions (F1, F2, F3, F4 และ F5 ตามลำดับ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ แต่เมื่อพิจารณาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติพบว่า F1 จะเป็น sub-fractions ที่ดีที่สุด เนื่องจากสามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231, C33A และ HCT116 ได้ ในขณะที่ไม่กระทบต่อการเจริญของเซลล์ปกติ

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการนำ sub-fraction F1 มาวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี NMR ซึ่งจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (ภาพที่ 4-1) ระบุได้ว่า สารที่เป็นองค์ประกอบหลักใน sub-fraction F1 นี้คือ 4-methoxycinnamaldehyde หรือ 4-MCA (ภาพที่ 4-2) จึงคาดว่าสารนี้น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้

สาร 4-MCA นี้เคยถูกรายงานว่าพบได้จากพืชหลายชนิด รวมถึงเหง้าเร่วหอม (Tachai S and Nuntawong N, 2016; Srisook E et al., 2017) และเคยพบว่ามีความสามารถในการต้านการติดเชื้อของไวรัส respiratory syncytial virus (RSV) ในเซลล์มะเร็งกล่องเสียง HEP-2 (Wang KC et al., 2009) เป็นตัวกระตุ้น transient receptor potential ankyrin1 (TRPA1) (TRPA1 agonist) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ homeostasis, somatosensory และ neurogenic inflammation (Moon H et al., 2015) อีกทั้งในงานวิจัยที่เพิ่งตีพิมพ์ในปี (2017) ของ Srisook E และคณะ พบสารนี้เป็นหนึ่งในสารองค์ประกอบหลักของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ซึ่งเป็นส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้ดีที่สุด จึงคาดว่าสาร 4-MCA น่าจะมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบได้ด้วย อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสาร 4-MCA นี้ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

เช่นเดียวกับกับสาร cinnamaldehyde (CA) และสารอนุพันธ์ของ CA หลายชนิดที่เคยถูกรายงานว่ามีความสามารถในการต้านเซลล์มะเร็งต่างๆ ได้ (Hong SH et al., 2016; Wu C et al., 2017; Nguyen HA and Kim SA, 2017) ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสาร 4-MCA ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้ถูกแสดงให้เห็นในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นครั้งแรก โดยผลการทดสอบพบว่า สารนี้สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

ปากมดลูก C33A ได้ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ซึ่งที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A ได้เกือบ 100% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30 μM ซึ่งมากกว่าค่า IC_{50} ของเซลล์ Vero ถึง 4.6 เท่า บ่งบอกถึงการออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ ผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ที่ได้รับสาร 4-MCA แสดงให้เห็นว่า สาร 4-MCA อาจยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการหยุดชะงักของวัฏจักรเซลล์หรือเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ โดยผ่านทางกลไกที่ทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* และ *c-myc* และลดการแสดงออกของยีน *survivin* และ *TP53* ซึ่งในเซลล์มะเร็ง C33A นี้จะเป็น p53 ชนิดกลายพันธุ์ (mutated p53, MTP53)

อย่างที่ทราบกันดีว่า โดยปกติเมื่อดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย โปรตีน p53 ชนิดดั้งเดิม (wild-type p53, WTP53) จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน โดย WTP53 จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ หรือหากความเสียหายของดีเอ็นเอไม่สามารถซ่อมแซมได้ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ก็จะถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้นเพื่อกำจัดเซลล์นั้นไป ในทางตรงกันข้าม โปรตีน MTP53 (ชนิดที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์แบบที่ตรวจพบได้ในเซลล์มะเร็งต่างๆ) กลับพบว่าไม่ได้มีหน้าที่ในการช่วยปกป้องเซลล์ปกติหรือเป็นตัวต้านเนื้องอก (tumor suppressor) แต่กลับมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง อีกทั้งยังช่วยให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาเคมีบำบัดด้วย และมักพบโปรตีนนี้ถูกสะสมเป็นปริมาณมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งชนิดลูกลามหรือชนิดรุนแรง (Parrales and Iwakuma, 2015; Yue et al., 2017; Zhao et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่า MTP53 จะมียีนเป้าหมายที่แตกต่างกับ WTP53 ซึ่งทำให้ผลการแสดงออกของยีนที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้เป็นไปตามที่คาดไว้เหมือนที่พบในงานวิจัยอื่นๆ ดังเช่น ยีน pro-apoptotic *Bax* ที่ควรจะเพิ่มขึ้น หรือยีน anti-apoptotic *Bcl-2* ที่ควรจะลดลงเมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis แต่กลับพบการแสดงออกของยีน *Bax* ที่ลดลง และการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ที่ไม่เปลี่ยนแปลง ในเซลล์มะเร็ง C33A ได้รับสาร 4-MCA ซึ่งสอดคล้องกับผลที่รายงานในการศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่มี MTP53 ซึ่งจะแตกต่างจากเซลล์ที่มี WTP53 นั่นเอง (He M et al., 2002)

ดังนั้น การที่สาร 4-MCA ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้โดยผ่านทางกลไกการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Mutp53 จะเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนว่าสารนี้มีศักยภาพในการที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อเป็นยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในอนาคต และน่าจะช่วยลดอาการข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วยได้ เนื่องจากโปรตีน Mutp53 นี้ไม่พบในเซลล์ปกติ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้กำลังศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับพืชที่มีสาร 4-MCA เป็นองค์ประกอบ อย่างเช่น เหง้าเร่วหอม ซึ่งปลูกกันมากในภาคตะวันออกของไทย อันจะเป็นการส่งเสริมเศรษฐกิจในระดับชุมชนได้เป็นอย่างดี

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ sub-fraction F1 คือ สาร 4-methoxycinnamaldehyde หรือ 4-MCA

2. สาร 4-MCA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A ได้ ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น โดยค่า %การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A ที่ได้รับสาร 4-MCA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100 และ 200 μM มีค่าเท่ากับ $62.50 \pm 13.18\%$, $20.09 \pm 13.17\%$, $5.63 \pm 2.12\%$ และ $2.75 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ

3. ค่า IC_{50} ของสาร 4-MCA ต่อเซลล์ C33A และ Vero มีค่าเท่ากับ 30 และ 140 μM ตามลำดับ

4. เซลล์มะเร็ง C33A ที่ได้รับสาร 4-MCA จะพบการแตกหักของดีเอ็นเอโครโมโซม ซึ่งบ่งบอกได้ถึง การตายแบบ apoptosis

5. เซลล์มะเร็ง C33A ที่ได้รับสาร 4-MCA จะพบการแสดงออกของยีน *p21*, *p65* และ *C-myc* เพิ่มขึ้น และการแสดงออกของยีน *TP53*, *Bax* และ *Survivin* ลดลง รวมถึงการเพิ่มขึ้นของโปรตีน p21 และการลดลงของโปรตีน Mutp53 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

บรรณานุกรม

- ผาดตา วาณิชวัฒน์เดชา เอกรัฐ ศรีสุข และ มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. (2558). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พงศ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- สถิติสาธารณสุข 2555 (Public health A.D. 2012). สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออก. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2554). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Battistuzzi G, Cacchi S, Fabrizi G. (2003). An efficient palladium-catalyzed synthesis of cinnamaldehydes from acrolein diethyl acetal and aryl iodides and bromides. Org Lett; 5(5): 777-80.
- Debata PR, Castellanos MR, Fata JE, Baggett S, Rajupet S, Szerszen A, Begum S, Mata A, Murty VV, Opitz LM, Banerjee P. (2013). A novel curcumin-based vaginal cream Vacurin selectively eliminates apposed human cervical cancer cells. Gynecol Oncol. 129(1): 145-153.
- 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.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell 118(3): 285-296.
- He M, Rennie PS, Dragowska V, Nelson CC, Jia W. (2002). A mutant P53 can activate apoptosis through a mechanism distinct from those induced by wild type P53. FEBS Lett. 517(1-3): 151-154.

- Hong SH, Ismail IA, Kang SM, Han DC, Kwon BM. (2016). Cinnamaldehydes in cancer chemotherapy. Phytother Res. 30(5):754-67. doi: 10.1002/ptr.5592.
- Ito K, Nakazato T, Xian MJ, Yamada T, Hozumi N, Murakami A, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M. (2005). 1'-acetoxychavicol acetate is a novel nuclear factor kappaB inhibitor with significant activity against multiple myeloma in vitro and in vivo. Cancer Res. 65(10):4417-24.
- Kirana C, McIntosh GH, Record IR, Jones GP. (2007). Anticancer properties of panduratin A isolated from *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae). J Nat Med. 61: 131-137.
- Lee JW, Min HY, Han AR, Chung HJ, Park EJ, Park HJ, Hong JY, Seo EK, Lee SK. (2007). Growth inhibition and induction of G1 phase cell cycle arrest in human lung cancer cells by a phenylbutenoid dimer isolated from *Zingiber cassumunar*. Biol Pharm Bull. 30(8): 1561-1564.
- Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, Kamat AA, Spannuth WA, Gershenson DM, Lutgendorf SK, Aggarwal BB, Sood AK. (2007). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. Clin Cancer Res. 13(11): 3423-3430.
- Liu B, Liu F, Chen C, Gao H. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of ethyl p-methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* L. rhizome and its apoptotic induction in human HepG2 cells. Nat Prod Res. 24(20): 1927-1932.
- 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.
- Moon H, Kim MJ, Son HJ, Kweon HJ, Kim JT, Kim Y, Rhyu MR. (2015). Five hTRPA1 agonists found in indigenous Korean mint, *Agastache rugose*. PloS One; 10(5). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127060>.
- Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. (2001). Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. Oncogene. 20(52): 7597-7609.
- Nguyen HA, Kim SA. (2017). 2'-Hydroxycinnamaldehyde induces apoptosis through HSF1-mediated BAG3 expression. Int J Oncol. 50(1): 283-289. doi: 10.3892/ijo.2016.3790.
- 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.

- Parrales A, Iwakuma T. (2015). Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy. Front Oncol. 5:288. doi: 10.3389/fonc.2015.00288. eCollection 2015.
- 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.
- Rao CV. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. Mutat Res. 555(1-2): 107-119.
- Sabli F, Mohamed M, Rahmat A, Abu Bakar MF. (2012). Cytotoxic Properties of Selected *Etligeria* spp. and *Zingiber* spp. (Zingiberaceae) Endemic to Borneo. Pertanika J. Trop. Agric. Sci. 35(3): 663–671.
- Samarghandian S, Hadjzadeh MA, Afshari JT, Hosseini M. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptotic by ethanolic extract of *Alpinia galanga* rhizome in human breast carcinoma cell line. BMC Complement Altern Med. 14: 192.
- Sharma C, Ahmed T, Sasidharan S, Ahmed M and Hussain A. (2009). Use of gemcitabine and ginger extract infusion may improve the efficiency of cervical cancer treatment. African Journal of Biotechnology. 8(24): 7087-7093.
- 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): 1799-1819.
- Srisook E, Palachot M, Mankhong S, Srisook K. (2017) Anti-inflammatory effect of *Etligeria pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Phamacogn Mag. 13: S230-5.
- Srisook, K. and Srisook, E. (2011). Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etligeria pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceedings of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. (Fulltext, CD version).
- Tachai S, Nuntawong N. (2016). Uncommon secondary metabolites from *Etligeria pavieana* rhizomes. Nat Prod Res. 1-5.
- 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. doi: 10.1097/CEJ.0b013e32836473ac.

- Wang KC, Chang JS, Chiang LC, Lin CC. (2009). 4-Methoxycinnamaldehyde inhibited human respiratory syncytial virus in a human larynx carcinoma cell line. Phytomedicine; 16(9): 882-886.
- Wanichwatanadecha P, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J, Ponglikitmongkol M. (2012). Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*1 on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. J Gen Virol. 93(Pt 5): 1081-1092.
- Wu C, Zhuang Y, Jiang S, Tian F, Teng Y, Chen X, Zheng P, Liu S, Zhou J, Wu J, Wang R, Zou X. (2017). Cinnamaldehyde induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ β -catenin pathway in non-small cell lung cancer. Int J Biochem Cell Biol. 84:58-74. doi: 0.1016/j.biocel.2017.01.005.
- 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): 1647-1656.
- Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. (2017). Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-Function, and therapy. J Mol Biol. 429(11): 1595-1606. doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.030.
- Zhao D, Tahaney WM, Mazumdar A, Savage MI, Brown PH. (2017). Molecularly targeted therapies for p53-mutant cancers. Cell Mol Life Sci. doi: 10.1007/s00018-017-2575-0.

ผลผลิต (Output)

lawsipo P, Srisook E, Ponglikitmongkol M, Somwang T, Singaed O. 4-Methoxycinnamaldehyde: A new anti-tumor compound from *Etlingera pavieana* rhizome. Asian Pac J Trop Biomed. Manuscript submitted (June 2017).