รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าเร่วหอมต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา

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

โดย

ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802110
สัญญาเลขที่ ๑๔๖/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าเร่วหอมต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา

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

โดย

ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ที่ปรึกษาโครงการ
ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 146/2560

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย มา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและพบสาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) เป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์นั้น นำมาสู่การทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็งดื้อยาของสารทั้งสองในงานวิจัยชิ้นนี้ เนื่องจากปัญหาการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันด้วยยาเคมีบำบัดที่ไม่ประสบความสำเร็จ ส่วนหนึ่งพบว่าเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเกิดการพัฒนาตัวเองให้ดื้อต่อยาเคมีบำบัดหลังได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลาหนึ่ง ในงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเซลล์มะเร็งดื้อยาขึ้นมา 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ดื้อต่อยา doxorubicin (MDA-MB-231/Dox^{R}) และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ดื้อต่อยา cisplatin (C33A/Cis^{R10}) ซึ่งมีค่าดัชนีการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง (resistance index, RI) เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น เท่ากับ 1.36 และ 2.37 ตามลำดับ ผลจากการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์หลังได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-MCA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาทั้งสองชนิดได้ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นเช่นเดียวกันกับผลที่พบในเซลล์มะเร็งตั้งต้น โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดเอทานอลต่อเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231/Dox^{R} เท่ากับ 357.90±53.62 µg/mL และเซลล์มะเร็ง C33A/Cis^{R10} เท่ากับ 246.4±9.03 µg/mL ในขณะที่สาร 4-MCA มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231/Dox^{R} เท่ากับ 108.67±1.15 µM และเซลล์มะเร็ง C33A/Cis^{R10} เท่ากับ 65.50±1.50 µM ซึ่งกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดื้อยาของสารทั้งสองจะถูกทำการทดสอบต่อไป

คำสำคัญ : เร่วหอม, 4-methoxycinnamaldehyde, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, เซลล์มะเร็งดื้อยา

Abstract

Previous study, we reported the anti-cancer effect of ethanolic extract of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. rhizome (EE) and identified 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) as one of bioactive compounds. Since the acquired drug resistance of cancer cells after chemotherapy is one cause of treatment failures, in this study, the EE and 4-MCA were thus examined for their anti-proliferative effect on drug-resistant cancer cells. We established two types of drug-resistant cancer cells, doxorubicin-resistant breast cancer cell (MDA-MB-231/Dox^{R}) and cisplatin-resistant cervical cancer cell (C33A/Cis^{R10}). When compared to the parental cancer cells, MDA-MB-231/Dox^{R} and C33A/Cis^{R10} cells showed the resistance index (RI) of 1.36 and 2.37, respectively. MTT results demonstrated dose-dependent reduction of viability of both resistant cancer cells treated with EE with the IC_{50} values of 357.90±53.62 µg/mL against MDA-MB-231/Dox^{R} and 246.4±9.03 µg/mL against C33A/Cis^{R10} cells. With the same manner, 4-MCA also exhibited the anti-proliferative effect in those cell lines with the IC_{50} values of 108.67±1.15 µM and 65.50±1.50 µM, respectively. The mechanism of EE and 4-MCA on this action is under investigated.

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

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการดำเนินการวิจัย	10
ผลการวิจัย	12
อภิปราย และสรุปการทดลอง	20
ผลผลิต	23
บรรณานุกรม	24
ประวัติของหัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยของโครงการวิจัย	29

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4-1 TLC pattern ของสารทดสอบชนิดต่างๆ	12
4-2 ลักษณะรูปร่างภายนอกของเซลล์มะเร็งตั้งต้น MDA-MB-231 และ C33A และเซลล์มะเร็งที่ถูกพัฒนาให้ดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} (ค) และ C33A/Cis^{R10}	13
4-3 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MD-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับยา Doxorubicin	14
4-4 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A, C33A/Cis^{R3} และ C33A/Cis^{R10} ที่ได้รับยา Cisplatin	14
4-5 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MD-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม	16
4-6 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A, C33A/Cis^{R3} และ C33A/Cis^{R10} ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม	16
4-7 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MD-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสาร 4-MCA	18
4-8 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A, C33A/Cis^{R3} และ C33A/Cis^{R10} ที่ได้รับสาร 4-MCA	18

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4-1 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการพัฒนาและค่า resistance index (RI) 15

4-2 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งและเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม 17

4-3 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งและเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อสาร 4-MCA 19

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีแนวโน้มของผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นทุกปีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา ซึ่งจากสถิติที่บันทึกไว้ล่าสุดในปี พ.ศ. 2556 พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งถึง 67,692 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 104.8 คนต่อประชากร 100,000 คน (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข) ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งมีด้วยกันหลายวิธี ทั้งการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป การฉายรังสี และการรักษาด้วยเคมีบำบัด ซึ่งโดยปกติแล้ว มะเร็งในระยะที่ยังไม่ลุกลามหากได้รับการรักษาด้วยสองวิธีแรกซึ่งเป็นการรักษาเฉพาะจุดก็สามารถทำให้ผู้ป่วยหายจากโรคได้ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ามารับการรักษามักจะตรวจพบว่าเป็นมะเร็งในระยะที่ลุกลามแล้วหรือมีความเสี่ยงสูงว่าจะลุกลาม ซึ่งจะต้องทำการรักษาควบคู่ไปกับการใช้ยาเคมีบำบัด แม้ว่าในปัจจุบันจะมียาเคมีบำบัดหลากหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในสถานพยาบาลต่างๆ แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จ คือการที่เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาเคมีบำบัดหลังจากได้รับการรักษาไปแล้วระยะหนึ่ง (acquired drug resistance) ซึ่งการปรับเปลี่ยนสูตรยาเคมีบำบัดก็ทำให้ผู้ป่วยต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้น มีค่าใช้จ่ายที่มากขึ้น ต้องทนทุกข์ทรมานกับผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดอย่างต่อเนื่อง รวมถึงทำให้ตัวผู้ป่วยและคนใกล้ชิดเสียกำลังใจในการที่จะต่อสู้กับโรคร้ายนี้ต่อไป

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

เร่วหอม [*Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm.] จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นกันและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคตะวันออกของไทย มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นหอม เหง้าของเร่วหอมนิยมนำมาใช้ผสมในเครื่องเทศปรุงอาหาร รวมทั้งใส่ในน้ำซุปของก๋วยเตี๋ยวหมูเลียงซึ่งเป็นอีกหนึ่งเมนูขึ้นชื่อของจังหวัดจันทบุรี เร่วหอมมีสรรพคุณใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของเหง้าเร่วหอม พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ และสารบริสุทธิ์ 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A, SiHa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เป็นต้น และมีพิษต่ำต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Wanichwatanadecha P et al., 2016 และผลวิจัยรอตีพิมพ์, ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558และ 2559) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าเร่วหอม ได้แก่ Methoxycinnamyl p-coumarate 4-methoxycinnamaldehyde และ p-coumaric acid สามารถต้านการอักเสบได้โดยผ่านทางการยับยั้งวิถี NF-κB หรือการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยที่ Methoxycinnamyl p-coumarate จะเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีที่สุด รองลงมาคือ 4-methoxycinnamaldehyde (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ซึ่งวิถีของ NF-κB นี้นอกจากจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำให้เซลล์มะเร็งอยู่รอดและมีความรุนแรงของโรคมากขึ้นแล้ว ยังพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ด้วย (Weldon CB et al., 2001; Broxterman HJ *et al*., 2009; Godwin P *et al*., 2013) เซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF-κB สูง มักจะมีความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดมากกว่า ซึ่งทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของยาสูงกว่าเซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF-κB ต่ำ และตัวยาที่ใช้ในการรักษาเคมีบำบัดหลายชนิด แม้ว่าจะมีกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งแตกต่างกัน เช่น doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, vincristine, paclitaxel ฯลฯ แต่ก็มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ NF-κB เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน (Das KC และ White CW, 1997; Chuang SE *et al*., 2002) การให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF-κB เช่น Celecoxib, Valspodar (PSC833), Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), Salicylic acid และ Genistein แก่เซลล์พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231 และ MCF-7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (SiHa และ HeLa) ตอบสนองต่อยา doxorubicin หรือ cisplatin ได้ดีขึ้น (Venkatraman M *et al*., 2005; van Wijngaarden J *et al*., 2007; Chen C *et al*., 2011; Sahin K *et al*., 2012) นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบในหนู mice ยังพบว่าการยับยั้งการทำงานของ NF-κB ทำให้เกิดการถดถอยของมะเร็ง (cancer regression) ในหนู mice ได้ และยังทำให้เซลล์มะเร็งดื้อยา ในหนู mice เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อทำการให้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง CPT-11 เข้าไปในเซลล์ที่มีการยับยั้งการทำงานของ NF-κB (Wang CY *et al*., 1999)

สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิดพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาได้ รวมทั้งช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งดื้อยา เช่น สารสกัดจากพืช *Aframonum polyanthum*, *A. arundinaceum* และสารที่แยกได้ ได้แก่ galanals A and B, naringenin และ kaempferol-3,7,4'-trimethylether พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดื้อยา CEM/ADR5000 เซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231-BCRP และเซลล์เนื้องอกสมองดื้อยา U87MGΔEGFR ได้ (Kuete V *et al*., 2014) สาร Curcumin ซึ่งแยกได้จาก *Curcuma longa* (Zingiberaceae) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Glioma ที่ดื้อยาและ

ทำให้เซลล์ดื้อยานั้นตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด cisplatin, etoposide, camptothecin และ doxorubicin ได้ ซึ่งมีกลไกผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ NF-κB และ AP-1 (Dhandapani KM *et al*., 2007) อีกทั้งสาร Curcumin ยังสามารถเพิ่มการตอบสนองของเซลล์มะเร็งตับ HA22T/VGH ต่อยา cisplatin และ doxorubicin ได้อีกด้วย (Notarbartolo M *et al*., 2005) นอกจากการยับยั้งผ่านทางวิถี NF-κB แล้ว สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ permeability glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์และมีหน้าที่ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์ เช่น สารสกัดของ *Curcuma aeruginosa* และ *Zingiber cassumunar* และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/ADR ที่ดื้อต่อยา daunomycin กลับมาตอบสนองต่อยา daunomycin ได้เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนให้ยาเคมีบำบัด (Kim HR *et al*., 2004; Chung SY *et al*., 2009) นอกจากนี้ สาร tetrahydrocurcumin ซึ่งเป็นสารหลักที่ได้จากการย่อย curcumin ในร่างกายสิ่งมีชีวิต พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ตัวหลักที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้ทั้ง 3ชนิด ได้แก่ P-glycoprotein (P-gp), mitoxantrone resistance protein (MXR) และ multidrug resistance protein 1 (MRP1) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยา (Limtrakul P *et al*., 2007)

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

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

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

1. เพื่อผลิตเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ดื้อยา Doxorubicin และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ดื้อยา Cisplatin
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยา โดยไม่ใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดใดๆ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ เริ่มแรกคณะผู้วิจัยจะทำการพัฒนาเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา 2 แบบ คือ เซลล์มะเร็งเต้านมระยะลุกลามชนิด MDA-MB-231 (invasive breast cancer cell lines) ที่ดื้อต่อยา Doxorubicin (Adriamycin) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ดื้อต่อยา Cisplatin ทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ต่อยาเคมีบำบัดกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น หลังจากนั้นจะทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 และ C33A ที่ดื้อยาโดยไม่ใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด ด้วยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

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

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

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

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

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

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

เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกัน พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย เช่น จันทบุรี ระยอง และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลม และแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย จะมีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียง แกงป่า และผัดเผ็ด เป็นต้น ในอดีตเร่วหอมนิยมปลูกเพื่อเป็นพืชสวนครัวและปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย แต่ในปัจจุบัน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์มากขึ้น เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (http://www.kehakaset.com) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ และสาร 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A, SiHa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เป็นต้น และมีพิษต่ำต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสาร 4- methoxycinnamaldehyde ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าน่าจะเป็นผลมาจากการที่สารทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการหยุดชะงักของวัฏจักรเซลล์และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ (Wanichwatanadecha P et al., 2016; Iawsipo P et al., 2018; ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558 และ 2559) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าเร่วหอม ได้แก่ Methoxycinnamyl p-coumarate 4-methoxycinnamaldehyde และ p-coumaric acid สามารถต้านการอักเสบได้โดยผ่านทางการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์หรือวิถี NF-κB โดยไปลดการจับของ NF-κB กับดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ที่ลดลง ซึ่งพบว่าสาร Methoxycinnamyl p-coumarate จะเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ 4-methoxycinnamaldehyde (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) จากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้ ทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและสารบริสุทธิ์ที่พบได้ในเหง้าเร่วหอมต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา โดยจะเลือกใช้เซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบมากที่สุดในหญิงไทย และพัฒนาให้เซลล์มะเร็งเหล่านี้เกิดการดื้อยา โดยใช้ตัวยาที่อยู่ในสูตรยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยจริง นอกจากนี้จะทำการศึกษาว่าสารสกัดสามารถเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้หรือไม่ เพื่อลดผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดในผู้ป่วย แล้วจึงศึกษาลึกลงไปถึงกลไกยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาของสารสกัดจากเร่วหอม และสารบริสุทธิ์ โดยดูผลที่เกิดขึ้นต่อการทำงานของ NF-κB การทำงานของ AP-1 ตลอดจนระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยา เช่น ยีนในวิถี NF-κB, Bcl-2 family, IAPs, BRCA, ยีนที่เกี่ยวข้องกับ drug metabolism (เช่น CYPs)

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

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม

นำเหง้าของเร่วหอมมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง จากนั้นนำเหง้าที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งน้ำหนักเหง้าแห้งหลังจากที่ปั่นได้ทั้งหมด นำเหง้าที่บดละเอียดแช่ในสารละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน กรองส่วนสกัดที่ได้ แล้วนำผงของเหง้าเร่วหอมมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลอีก 2 รอบ ทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและโถดูดความชื้น ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสงเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

3.2 การแยกสาร 4-methoxycinnamaldehyde จากเหง้าเร่วหอม

นำสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมาสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ จะได้เป็นส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดย่อยน้ำ นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและตามด้วยโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยที่ได้ จากนั้นจะนำไปแยกสารประกอบบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ Silica gel เป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ของ Fraction แรกคือ 10-80% EtOAc/Hexane ตามด้วย 100% EtOAc และระบบเฟสเคลื่อนที่ของ fraction ย่อย คือ MeOH/DCM ตามวิธีที่รายงานใน เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข (2555) ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารโดยเทคนิคสเปกโทรสโคปีและเปรียบเทียบสเปกตรัม NMR สารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้จะละลายใน DMSO และกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.22 μm ก่อนนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์

3.3 การเลี้ยงเซลล์

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

3.4 การพัฒนาเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา

เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A จะถูกพัฒนาให้ดื้อต่อยา Doxorubicin และ Cisplatin ตามลำดับ โดยจะใช้วิธีการพัฒนาที่แตกต่างกัน ดัดแปลงมาจากวิธีที่รายงานไว้ใน Yang J et al. (2017) และ Yen WC และ Lamph WW. (2005) ดังนี้

เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 จะถูกบ่มด้วยยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0.01-0.2 μg/mL (การบ่มจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกที่ความเข้มข้น 0.01-0.1 μg/mL เพิ่มความเข้มข้นครั้งละสองเท่า หลังจากนั้นจะเพิ่มความเข้มข้นของยาครั้งละ 0.01 μg/mL จนครบ 0.2 μg/mL) สำหรับ

เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จะถูกบ่มด้วยยา Cisplatin ที่ความเข้มข้น 0.5-3 μM (ช่วงแรกบ่มด้วย 0.5 μM จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1 μM และเพิ่มความเข้มข้นครั้งละ 0.1 μM จนถึง 3 μM) และกลุ่มที่ 2 จะถูกบ่มด้วยยา Cisplatin ที่ความเข้มข้น 0.5-10 μM (ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่เมื่อถึงความเข้มข้นที่ 1.5 μM จะเพิ่มความเข้มข้นครั้งละ 0.5 μM จนถึง 10 μM)

เมื่อเสร็จสิ้นการพัฒนา เซลล์มะเร็งที่ดื้อยาจะถูกนำไปทดสอบการมีชีวิตรอดในอาหารที่ผสมยาเคมีบำบัดที่ใช้พัฒนาด้วยวิธี MTT (วิธีทดลองในข้อ 3.5) เพื่อหาค่า IC_{50} และคำนวณหาค่า resistant index (RI) ซึ่งได้จากการนำค่า IC_{50} ของเซลล์ที่ดื้อยาหารด้วยค่า IC_{50} ของเซลล์ตั้งต้น เซลล์มะเร็งที่ให้ผลการดื้อต่อยาได้ดีที่สุดจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.5 การทดสอบผลของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์จากเหง้าเร่วหอมต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งดื้อยาด้วยวิธี MTT assay (Wanichwatanadecha P *et al*., 2012)

เซลล์มะเร็งจะถูกเลี้ยงใน 96-well plate ในสภาวะที่เหมาะสมและบ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นจะใส่สารทดสอบ ได้แก่ สารสกัดเร่วหอมหรือ 4-methoxycinnamaldehyde ซึ่งละลายด้วย DMSO ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ (ทำอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น; สารสกัดใช้ความเข้มข้น 0-400 μg/ml สารบริสุทธิ์ใช้ความเข้มข้น 0-100 μM) หลังจากนั้นบ่มเซลล์ไว้ 24 48 หรือ 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อครบเวลาแล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงที่มีสารละลาย MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBS ลงไป นำเซลล์กลับไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายผลึกสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 200 μl DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader แสดงผลที่ได้ในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารสกัด/ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารสกัด) X 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ แล้วรายงานผลการยับยั้งของสารสกัดด้วยค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ร่วมกับยา Doxorubicin หรือยา Cisplatin เซลล์จะถูกเตรียมเพื่อประเมินร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยวิธี MTT assay เหมือนกันกับข้างต้น แต่จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดและมีหรือไม่มี Doxorubicin/Cisplatin ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษ แล้วทำการหาค่า IC_{50} ในสภาวะที่มีสารสกัดและยา Doxorubicin/Cisplatin เปรียบเทียบกับสภาวะที่มีสารสกัดหรือยา Doxorubicin/Cisplatin เพียงอย่างเดียว

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

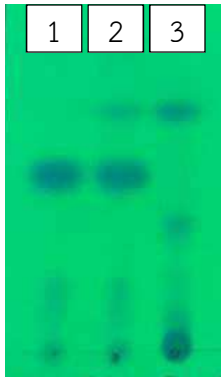
ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม

จากเร่วหอมสดทั้งหมด 61.93 กิโลกรัม นำมาอบได้เป็นผงเร่วหอมแห้ง 4.58 กิโลกรัม เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะได้เป็นสารสกัดหยาบเอทานอลที่มีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม ปริมาณ 372.77 กรัม คิดเป็นร้อยละน้ำหนักสารที่ได้ (%Yield) เท่ากับ 8.14% จากนั้นนำสารสกัดหยาบเอทานอลจำนวน 350 กรัม มาสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ เพื่อนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทไปใช้ในการแยกสารต่อไป

จากการสกัดแยกส่วนได้ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทออกมาทั้งสิ้น 33.27 กรัม (คิดเป็น %Yield เท่ากับ 9.51 %) นำไปแยกสาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ Silica gel เป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ 10-20% EtOAc/Hexane ได้ sub-fraction ที่ 1.4 ซึ่งมีสีเหลือง และจากผลการวิเคราะห์ด้วย TLC เทียบกับสารมาตรฐาน 4-MCA (Sigma-Aldrich) พบว่า sub-fraction นี้มี 4-MCA เป็นส่วนประกอบหลัก (ภาพ 4-1) และได้ทำการยืนยันชนิดของสาร 4-MCA ด้วย HPLC เทียบกับสารมาตรฐาน เนื่องจากสารที่แยกออกมาได้ยังมีสารชนิดอื่นปนอยู่ ดังนั้น ผู้วิจัยจะใช้สาร 4-MCA ที่สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป

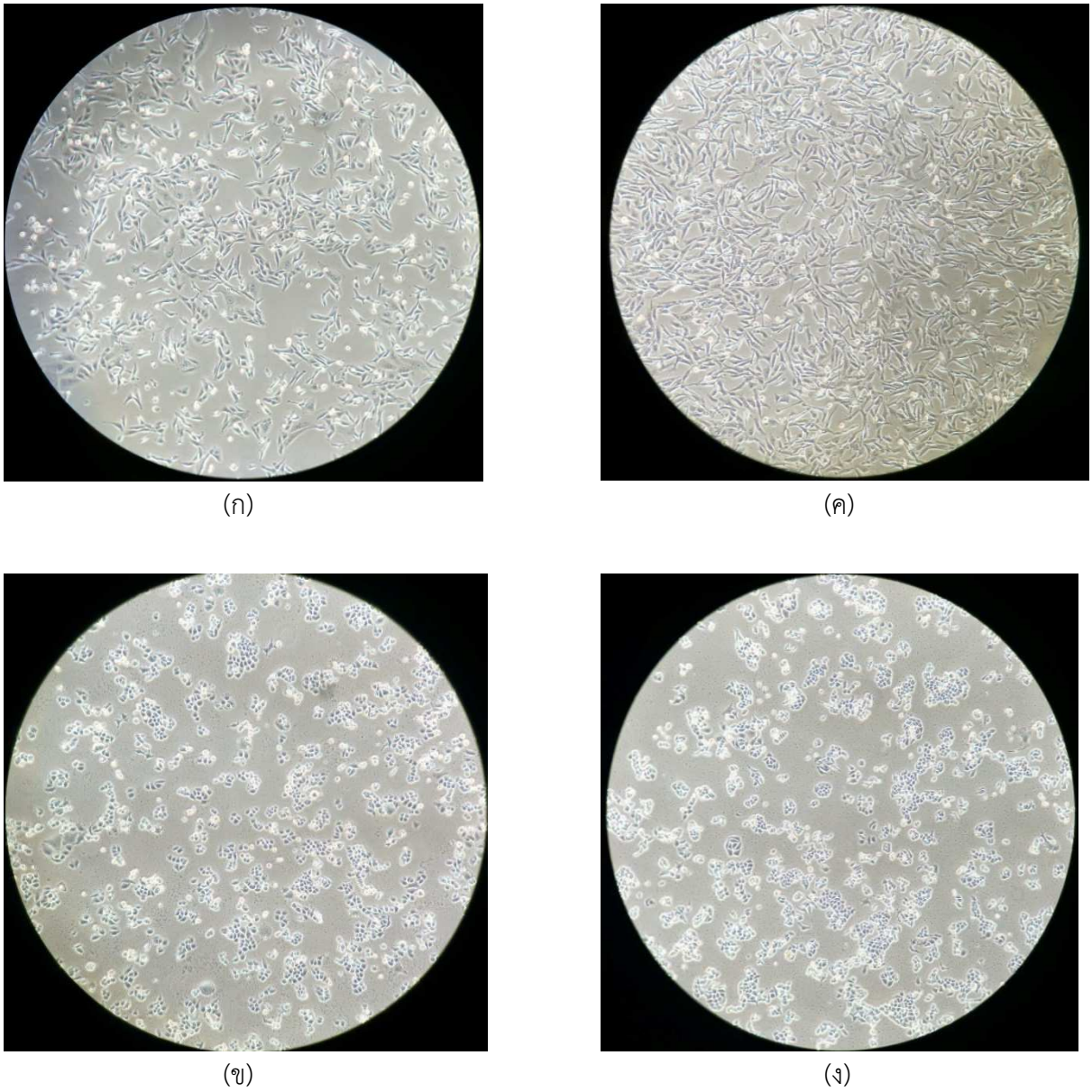


ภาพที่ 4-1 TLC pattern ของสารมาตรฐาน 4-MCA (1), สาร 4-MCA ที่แยกได้ (2) และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (3) ที่รันด้วยตัวทำละลาย 30% EtOAc/Hexane บันทึกภาพภายใต้แสงยูวี

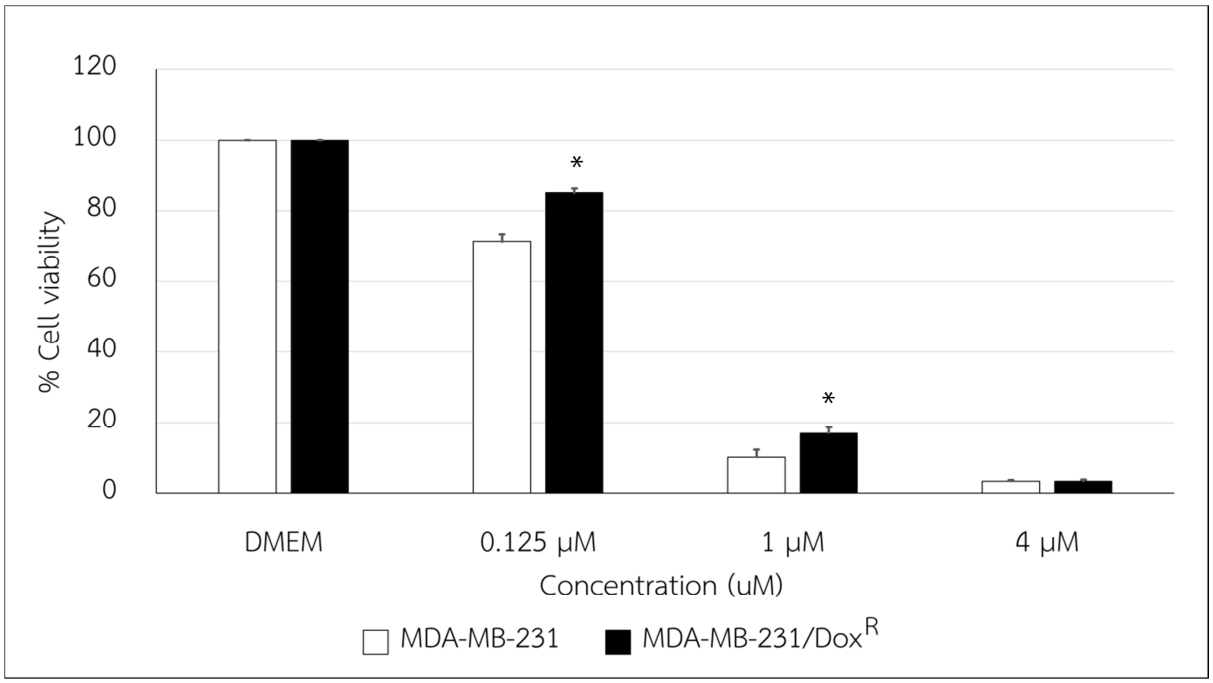
4.2 ผลการพัฒนาเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกให้ดื้อต่อยาเคมีบำบัด

เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ถูกบ่มด้วยยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0.01-0.2 µg/mL ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ได้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มและบ่มด้วยยา Cisplatin ที่ความเข้มข้น

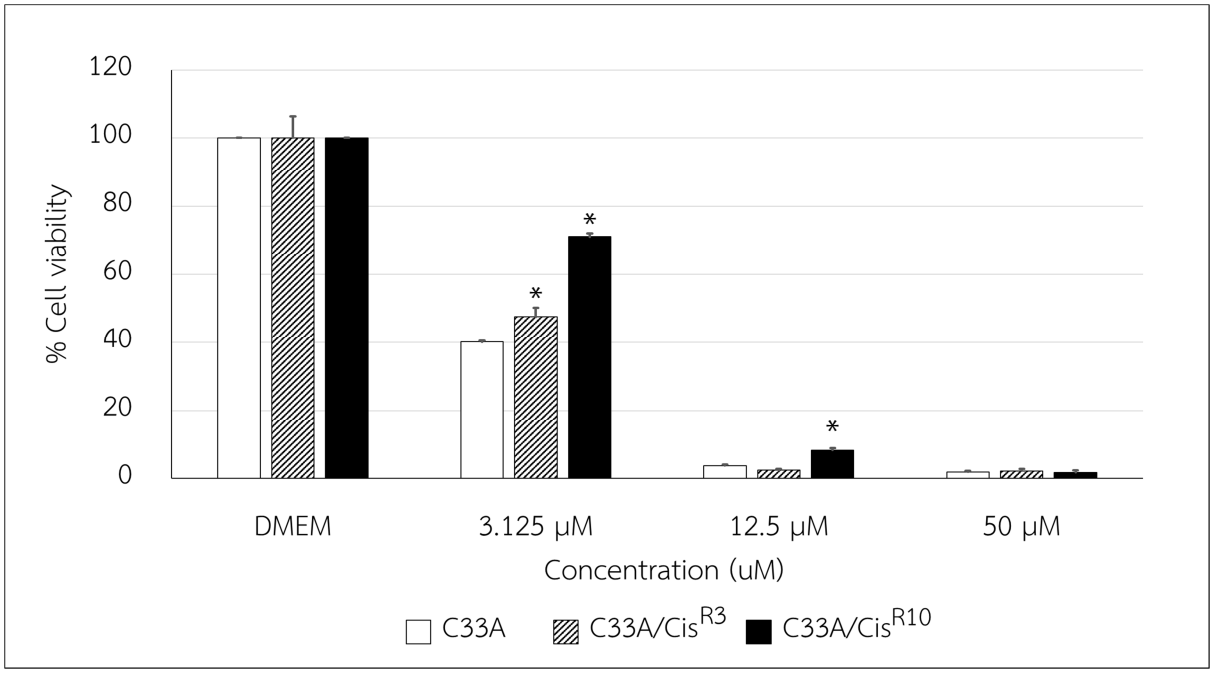
0.5-3 μM (กลุ่ม 1) และ 0.5-10 μM (กลุ่ม 2) โดยเซลล์จะถูกบ่มด้วยยาที่ความเข้มข้นละ 3-4 วัน แล้วจึง subculture ลงในอาหารที่ไม่มียา 1 passage เพื่อให้เซลล์พักฟื้นก่อนจะบ่มด้วยยาที่ความเข้มข้นถัดไป รวมระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาเซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ C33A กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 ให้ดื้อต่อยา ทั้งสิ้น 49 วัน 76 วัน และ 86 วัน ตามลำดับ และเรียกเซลล์ที่พัฒนาให้ดื้อต่อยาเคมีบำบัดนี้ว่า MDA-MB-231/Dox^{R} C33A/Cis^{R3} และ C33A/Cis^{R10} ตามลำดับ เมื่อพิจารณารูปร่างลักษณะของเซลล์ดื้อยาที่พัฒนาได้พบว่าเซลล์มะเร็งดื้อยาทั้งหมดมีรูปร่างภายนอกที่ไม่แตกต่างไปจากเซลล์ตั้งต้นเดิม (ภาพที่ 4-2) หลังจากนั้น นำเซลล์ที่พัฒนาได้มาทดสอบการมีชีวิตรอดกับยา Doxorubicin หรือ Cisplatin ด้วยวิธี MTT assay ได้ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4-3 และ 4-4



ภาพที่ 4-2 ลักษณะรูปร่างภายนอกของเซลล์มะเร็งตั้งต้น MDA-MB-231(ก) และ C33A (ข) และเซลล์มะเร็งที่ถูกพัฒนาให้ดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} (ค) และ C33A/Cis^{R10} (ง) ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับกำลังขยาย 100 เท่า



ภาพที่ 4-3 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MD-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0.125 - 4 µM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ดื้อยาที่ได้รับยาที่ความเข้มข้นเดียวกันเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น (p<0.05))



ภาพที่ 4-4 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A, C33A/Cis^{R3} และ C33A/Cis^{R10} ที่ได้รับยา cisplatin ที่ความเข้มข้น 0.125 - 4 µM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ดื้อยาที่ได้รับยาที่ความเข้มข้นเดียวกันเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น (p<0.05))

จากผล MTT ที่ได้ในภาพ 4-3 และ 4-4 สามารถนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC_{50}) แสดงผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการพัฒนาและค่า resistance index (RI)

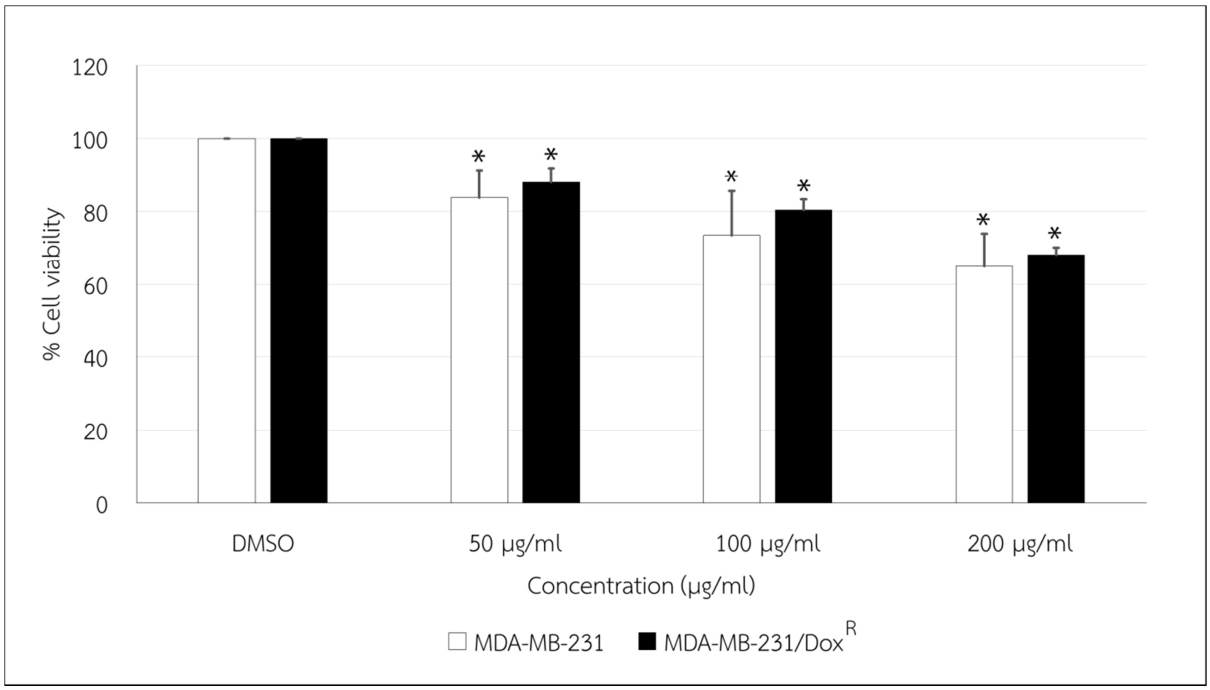
ชนิดของเซลล์	IC_{50} ต่อ Doxorubicin (^{d}) หรือ Cisplatin (^{c}) (μM)	RI
MDA-MB-231	0.33 ± 0.01^{d}	1.0
MDA-MB-231/Dox^{R}	0.45 ± 0.02^{d}	1.36
C33A	2.22 ± 0.03^{c}	1.0
C33A/Cis^{R3}	2.48 ± 0.05^{c}	1.12
C33A/Cis^{R10}	5.27 ± 0.08^{c}	2.37

จากค่า IC_{50} ข้างต้น จะเห็นได้ว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231/Dox^{R} มีความสามารถในการต้านทานยา doxorubicin ได้มากกว่าเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 ที่เป็นเซลล์ตั้งต้น โดยมีค่า resistant index (RI) เท่ากับ 1.36 สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่พัฒนาให้ดื้อต่อยา cisplatin ทั้งสองกลุ่ม ให้ผลการต้านทานต่อยาได้แตกต่างกัน โดยเซลล์มะเร็ง C33A/Cis^{R3} (กลุ่ม 1) ไม่แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านทานยาที่แตกต่างไปจากเซลล์ C33A ตั้งต้นมากนัก ในขณะที่เซลล์มะเร็งดื้อยา C33A/Cis^{R10} (กลุ่ม 2) แสดงให้เห็นถึงการต้านทานต่อยา cisplatin ได้มากขึ้นกว่าเซลล์ตั้งต้นที่ใช้พัฒนาถึง 2.37 เท่า ดังนั้น เซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} และ C33A/Cis^{R10} จึงถูกนำไปทดสอบการมีชีวิตรอดในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและ 4-MCA ต่อไป

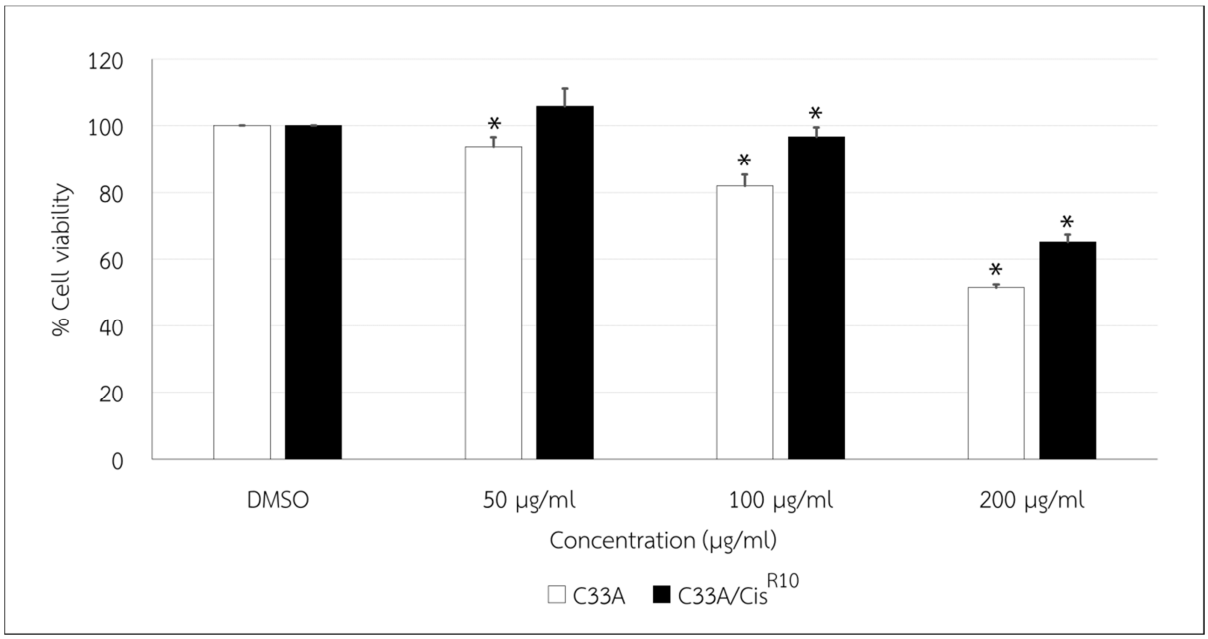
4.3 ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งดื้อยาในสภาวะที่มีสารสกัดจากเหง้าเร่วหอม

ผลการทดสอบด้วยวิธี MTT ของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-200 μg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงได้ดังภาพที่ 4-5 ถึง 4-6 ซึ่งพบว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ทุกชนิดจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยที่ความเข้มข้น 200 μg/ml พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} และเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R10} มีค่า %cell viability เท่ากับ 68.13±2.06 และ 64.99±2.47 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 และเซลล์ C33A ตั้งต้น ที่มีค่า %cell viability เท่ากับ 64.91±9.04 และ 51.62±0.92 ตามลำดับ และจากการคำนวณเพื่อหาค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งทั้งหมด (ตารางที่ 4.2) ก็ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกันมากนัก สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองกลุ่ม จะมีค่า IC_{50} ประมาณ 350 μg/mL ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกจะตอบสนองต่อสารสกัดได้ดีกว่าด้วยค่า IC_{50} ประมาณ 200-245 μg/mL

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกได้ทั้งชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา



ภาพที่ 4-5 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MD-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้น 50-200 µM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05))



ภาพที่ 4-6 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A และ C33A/Cis^{R10} ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ที่ความเข้มข้น 50-200 µM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05))

ตารางที่ 4.2 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งและเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม

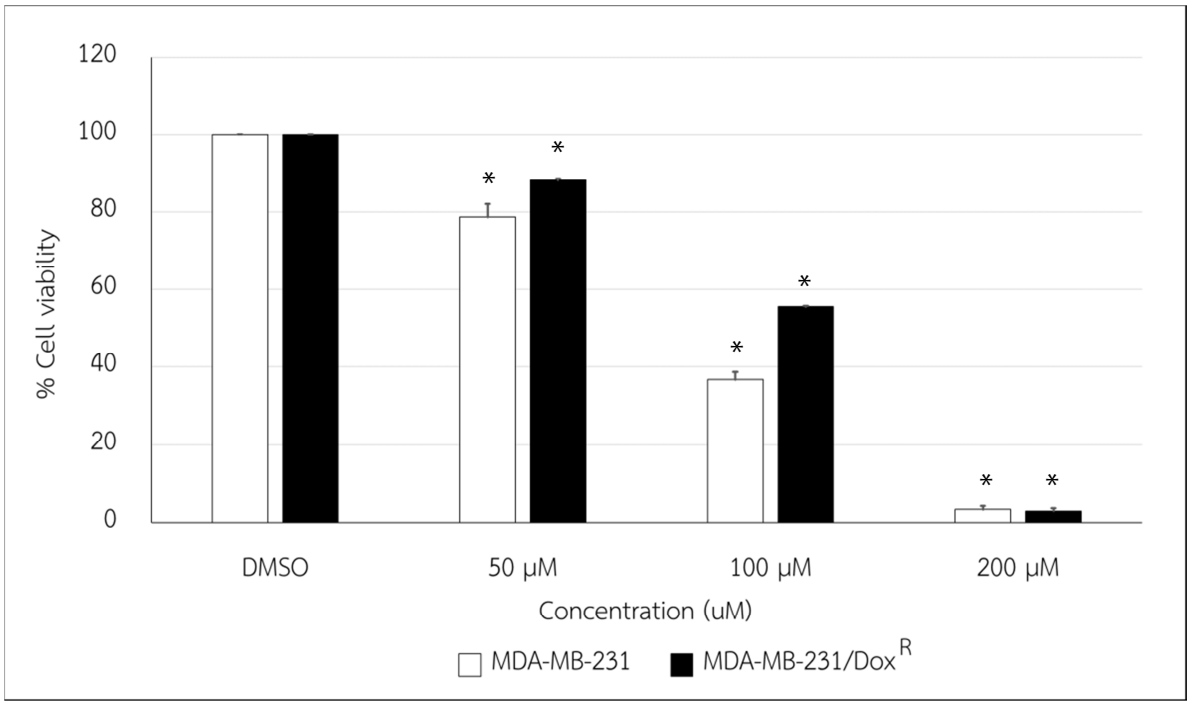
ชนิดของเซลล์	สารสกัดเอทานอล (µg/mL)
MDA-MB-231	367.72±67.50
MDA-MB-231/Dox^{R}	357.90±53.62
C33A	205.68±3.31
C33A/Cis^{R}	246.4±9.03

4.4 ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งดื้อยาในสภาวะที่มีสาร 4-MCA

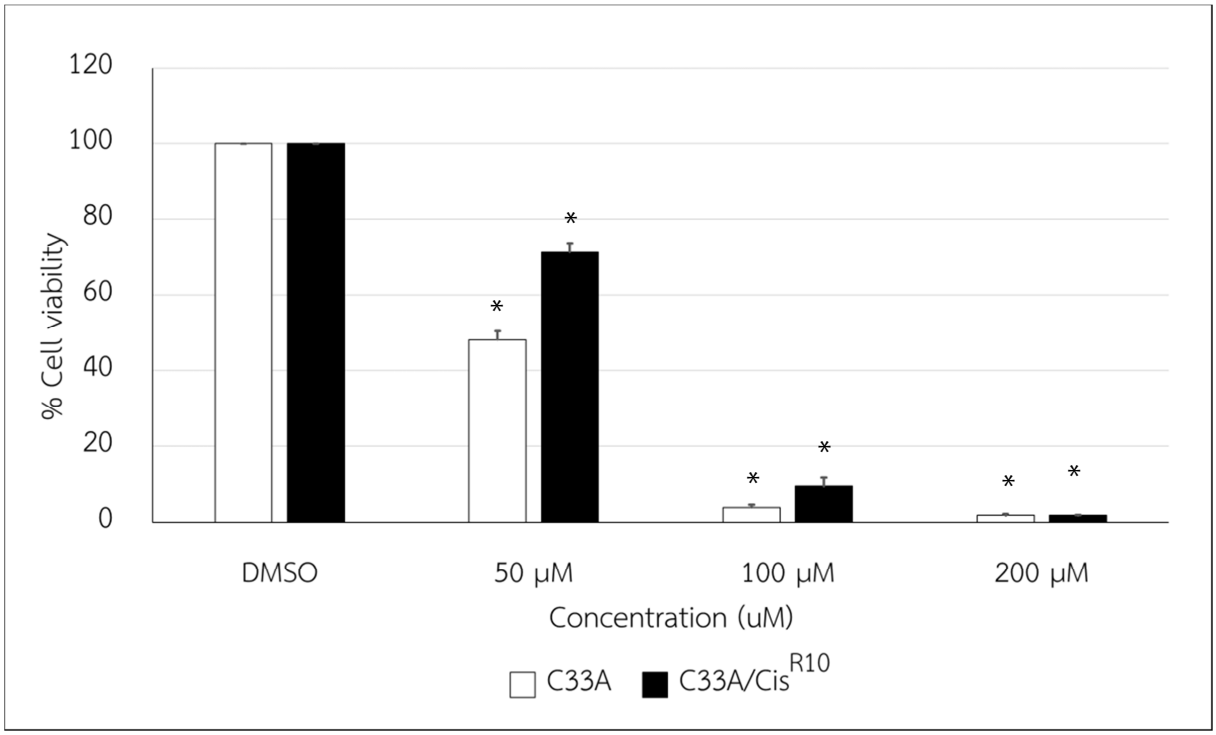
จากการทดสอบด้วยวิธี MTT ของสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 µM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อเซลล์มะเร็งตั้งต้นและเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4-7 ถึง 4-8 ซึ่งพบว่า การมีชีวิตรอดของเซลล์ทั้งสี่ชนิดจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสาร 4-MCA ที่ใช้ กล่าวคือ ความเข้มข้นของสาร 4-MCA ที่มากขึ้นจะทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งยิ่งลดลง โดยที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าเซลล์มะเร็งเต้า-นม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 36.66 ±1.97% และ 55.48 ± 0.17% ตามลำดับ ในขณะที่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R10} ที่ความเข้มข้นของ 4-MCA เท่ากับ 50 µg/ml มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 48.22±2.34 และ 71.28±2.41 ตามลำดับ

จากค่าเปอร์เซ็นการมีชีวิตรอดเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีสาร 4-MCA สามารถคำนวณค่า IC_{50} ของสาร 4-MCA ต่อเซลล์ทุกชนิดได้ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ค่า IC_{50} ของสาร 4-MCA ต่อเซลล์มะเร็งตั้งต้นต่ำกว่าค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งดื้อยา และพบผลเช่นนี้เหมือนกันในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด

จากผลการทดลองทั้งหมด จะเห็นได้ว่า สาร 4-MCA มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถลดการมีชีวิตรอดได้ทั้งเซลล์มะเร็งปกติและเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด



ภาพที่ 4-7 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MDA-MD-231 และ MDA-MB-231/Dox^{R} ที่ได้รับสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้น 50-200 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับและไม่ได้รับยาเคมีบำบัด (p<0.05))



ภาพที่ 4-8 กราฟการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง C33A และ C33A/Cis^{R10} ที่ได้รับสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้น 50-200 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับและไม่ได้รับยาเคมีบำบัด (p<0.05))

ตารางที่ 4.3 ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งและเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อสาร 4-MCA

ชนิดของเซลล์	4-MCA (μM)
MDA-MB-231	80.67±1.15
MDA-MB-231/Dox^{R}	108.67±1.15
C33A	48.33±2.89
C33A/Cis^{R}	65.50±1.50

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ก่อนหน้านี้ คณะวิจัยของเราได้เคยรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม และพบว่าสารที่น่าจะมีส่วนในการแสดงฤทธิ์นี้คือ สาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) (Wanichwatanadecha et al, 2016; ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2558 และ 2559; Iawsipo et al, 2018) ซึ่งในงานวิจัยนี้ เราได้พบว่า นอกจากสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-MCA จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาเคมีบำบัดซึ่งพัฒนามาจากเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้ได้อีกด้วย

การดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งจัดเป็นปัญหาหนึ่งที่ทำให้การรักษาด้วยวิธี Chemotherapy ไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ซึ่งกลไกในการดื้อยาของเซลล์มะเร็งนี้พบว่าเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การลดปริมาณการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง หรือยาต้านมะเร็งที่เข้าเซลล์ไปแล้วถูกขนส่งกลับออกมานอกเซลล์ผ่านทาง ABC (ATP-binding cassette) transporter จำพวก P-glycoprotein (P-gp; หรือ MDR1 หรือ ABCB1), breast cancer resistance protein (BCRP; หรือ MXR หรือ ABCG2) และ multidrug resistance-associated protein 1(MRP1; หรือ ABCC1) หรือการดื้อยาอาจเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเพิ่มการผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม detoxifying enzyme เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยา หรือเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย หรือผลิตเอนไซม์ที่ลดปริมาณ ROS ที่ยาเคมีบำบัดสร้างขึ้น หรือเพิ่มระดับสมดุลของ ROS ภายในเซลล์มะเร็ง (Redox Resetting) เป็นต้น (Zhu et al, 2016; Liu et al, 2016)

ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการรักษาให้กับผู้ป่วยที่มีเซลล์มะเร็งดื้อยา ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ให้ดื้อต่อยาเคมีบำบัดในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เซลล์นี้มาเป็นโมเดลในการค้นหาวิธีการรักษา โดยเลือกใช้ยาเคมีบำบัดที่นิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งทั้งสองชนิด (Zhu et al, 2016; Lovitt et al, 2018) นั่นคือ ใช้ยา doxorubicin ในการพัฒนาเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และใช้ยา cisplatin ในการพัฒนาเซลล์มะเร็งเต้านม C33A

สำหรับวิธีในการพัฒนาให้เซลล์มะเร็งดื้อยานั้นได้ถูกรายงานไว้หลากหลายวิธี ทั้งความเข้มข้นของยาที่แตกต่างกัน ระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้ได้เซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการต้านทานยาได้แตกต่างกัน หนึ่งในตัวชี้วัดที่สามารถใช้ในการติดตามการเพิ่มขึ้นของการดื้อยา คือ ค่า Resistance index (RI) ซึ่งหาได้จากสัดส่วนของค่า IC_{50} ต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งดื้อยา ต่อค่า IC_{50} ต่อยาของเซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นตัวตั้งต้น ในงานวิจัยนี้ เราสามารถพัฒนาเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ให้มีความสามารถในการดื้อต่อยา doxorubicin (MDA-MB-231/Dox^{R}) ได้มากกว่าเดิม 1.36 เท่า (มีค่า RI

เท่ากับ 1.36) ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ใช้ความเข้มข้นของยา cisplatin ในการพัฒนาสูงสุดที่ 3 μM (C33A/Cis^{R3}) แสดงการดื้อยาที่น้อยกว่าเซลล์ที่ใช้ความเข้มข้นของยาสูงสุดที่ 10 μM (C33A/Cis^{R10}) ซึ่งสามารถดื้อยา cisplatin ได้มากกว่าเซลล์ C33A ตั้งต้นถึง 2.37 เท่า (มีค่า RI เท่ากับ 2.37) ผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกเซลล์มะเร็งดื้อยา C33A/Cis^{R10} เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยาเพื่อทำการทดสอบต่อไป ถึงแม้ว่าค่า RI ที่ได้จากการทดลองจะไม่ได้มีค่าสูงมาก แต่เซลล์ดื้อยาที่พัฒนาขึ้นนี้ก็ได้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่แตกต่างไปจากเซลล์มะเร็งตั้งต้น ซึ่งผลนี้จะถูกรายงานไว้ในรายงานฉบับสมบูรณ์ของทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2561 ต่อไป

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) อีกทั้งในงานวิจัยของ Srisook E และคณะ (2017) พบสารนี้เป็นหนึ่งในสารองค์ประกอบหลักของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ซึ่งเป็นส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลิแซคคาไรด์ได้ดีที่สุด และในปี 2018 ทีมวิจัยของเราได้รายงานถึงฤทธิ์ของสาร 4-MCA ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT-116 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A โดยเราพบว่า สาร 4-MCA สามารถหยุดการเจริญของเซลล์ในระยะ G2/M และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ (Iawsipo et al, 2018) แต่สำหรับฤทธิ์ของสาร 4-MCA ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดื้อยานั้น ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

จากผล MTT ที่พบว่าเซลล์มะเร็งและเซลล์มะเร็งดื้อยามีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดลดลงเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าเร่วหอม (ภาพที่ 4-5 ถึง 4-6) แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทั้งชนิดที่ดื้อยาและเซลล์มะเร็งตั้งต้น และแสดงฤทธิ์ได้ทั้งในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งส่วนหนึ่งก็น่าจะเป็นผลมาจากการที่สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีสาร 4-MCA เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากสาร 4-MCA ก็แสดงให้เห็นถึงความสามารถนี้ได้เช่นกัน (ภาพที่ 4-7 ถึง 4-8) อีกทั้งในสารสกัดเอทานอลก็น่าจะมีสารอื่นๆ ที่แสดงฤทธิ์นี้ได้รวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ จากตาราง 4.2-4.3 จะเห็นได้ว่าค่า IC_{50} ของสารทดสอบต่อเซลล์มะเร็งดื้อยาและเซลล์มะเร็งตั้งต้นมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอัณฑะ PC3 และเซลล์มะเร็งอัณฑะที่ดื้อยา Docetaxel (PC3R) ของสาร 6-gingerol, 6-shogaol และ 10-shogaol ที่แยกได้จากพืช *Zingiber officinale* (ginger) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae วงศ์เดียวกันกับเร่วหอม โดยสารทั้งสามชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง PC3 และ PC3R ได้ประมาณ 50% เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 μM (Liu et al., 2017)

จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและสาร 4-MCA ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก ทั้งที่มีเซลล์มะเร็งไม่ดื้อยาและเซลล์มะเร็งดื้อยาได้

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. ผงแห้งของเหง้าเร่วหอม 4.58 กิโลกรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้สารสกัดออกมา 372.77 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 8.14%

2. subfraction ที่ 1.4 จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต มีสาร 4-MCA เป็นองค์ประกอบหลัก

3. เซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^{R3} และ C33A/Cis^{R10} มีความสามารถต้านทานยา cisplatin ได้มากกว่าเซลล์ C33A ตั้งต้น 1.12 และ 2.37 เท่า ตามลำดับ

4. เซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^{R} มีความสามารถต้านทานยา doxorubicin มากกว่าเซลล์ MDA-MB-231 ตั้งต้น 1.36 เท่า

5. สารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A และ MDA-MB-231 ได้ ทั้งชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ประมาณ 200-350 µg/mL

6. สาร 4-MCA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A และ MDA-MB-231 ได้ ทั้งชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ประมาณ 50-110 µg/mL

บรรณานุกรม

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

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

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

สถิติสาธารณสุข. 2556. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

http://www.cancer.org

http://www.chulacancer.net

http://www.kehakaset.com

http://www.thaibreastcancer.com

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

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

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

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

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

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

Liu Y, Li Q, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang H, Huang C, Lei Y. (2016). Cancer drug resistance: redox resetting renders a way. *Oncotarget*. 7(27):42740-42761. doi: 10.18632/oncotarget.8600.

Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. (2018). Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*. 18(1):41. doi: 10.1186/s12885-017-3953-6.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Yang J, Wu Y, Wang X, Xu L, Zhao X, Yang Y. (2017). Chemoresistance is associated with overexpression of HAX-I, inhibition of which resensitizes drug-resistant breast cancer cells to chemotherapy. *Tumor Biology*. 39: 1-10.

Yen WC, Lamph WW. (2005). The selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, Targretin) prevents and overcomes multidrug resistance in advanced breast carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 4(5):824-34.

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

Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther*. 10:1885-95.