



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผาณิตา เอี้ยวชิโป

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 60635
สัญญาเลขที่ ๑๓.๔/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผาณิตา เอี้ยวชิโป
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ความล้มเหลวของการรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดส่วนหนึ่งพบว่า เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งพัฒนาให้ดื้อต่อยาหลังได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลาหนึ่ง อีกทั้ง ผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดที่ทำให้ผู้ป่วยทุกข์ทรมานจากอาการไม่พึงประสงค์ ซึ่งอาจรุนแรงจนทำให้เสียชีวิตได้ ดังนั้น การค้นหาสารจากธรรมชาติเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาและแก้ปัญหาข้างต้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น ในงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยได้นำเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^R ที่พัฒนาขึ้น มาทดสอบกับสาร 4-methoxycinnamaldehyde (4-MCA) ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในเหง้าของเร่วหอมและเราเคยรายงานแล้วว่า มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด รวมถึงเซลล์มะเร็งดื้อยาที่เราพัฒนาขึ้นด้วย ผลจากการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) และ Western blot analysis แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงระดับของยีนภายในเซลล์มะเร็งหลังได้รับสาร 4-MCA ที่สื่อได้ถึงกลไกที่สาร 4-MCA นี้ใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ได้รับสาร 4-MCA มีการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่ผลิตโปรตีน p-glycoprotein ลดลง ร่วมกับการลดการแสดงออกของ p53 mutant ที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งยังพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *DDH* ที่เกี่ยวข้องกับระบบกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการพบว่าเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ได้รับสาร 4-MCA มีระดับ Reactive oxygen species (ROS) ที่สูงขึ้น จนนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis จากผลการทดสอบทั้งหมดนี้ ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสาร 4-MCA ที่จะนำไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งที่ดื้อยาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : 4-methoxycinnamaldehyde, มะเร็งดื้อยา, เร่วหอม

Abstract

Failure of chemotherapy is partly due to chemotherapeutic resistance of cancer cells evolved during treatment period. Despite high efficiency in killing cancer, chemotherapeutic drugs result in adverse effects ranged from mild symptoms to death. Thus, the natural agents with anti-cancer activity which have no or least effect on normal cells should be considered. In this study, the mechanism of 4-methoxycinnamaldehyde on modulating target gene expression in cisplatin resistant cervical cancer cells (C33/Cis^R) was addressed. Results from Real-time PCR and Western blot analysis revealed the reduction in expression of *MDR1* and (mutated) *TP53* genes after C33/Cis^R cells exposed to 4-MCA. Moreover, we found that 4-MCA also downregulated the antioxidant enzyme genes, *DDH*, in C33/Cis^R which was consistent to the increase in intracellular ROS production, and eventually lead to apoptosis in the cancer cells. Overall results from this study indicate the 4-MCA as a promising compound for cancer treatment.

Keywords : 4-methoxycinnamaldehyde, drug-resistant cancer, *Etilingera pavieana*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 13.4/2562

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย และผู้มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยทุกท่าน มา ณ ที่นี้

ผู้วิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	6
วิธีการดำเนินการวิจัย	10
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	14
สรุปการทดลอง	22
ผลผลิต	23
บรรณานุกรม	24
ประวัติผู้วิจัย	29

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 Melting curve ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ real-time PCR ด้วย primer ของยีน <i>MDR1 p65 p21</i> และ <i>TP53</i> จาก cDNA ของเซลล์ C33A และ C33A/Cis ^R	16
4.2 แลบบ์โปรตีนที่ได้จากการบ่มเมมเบรนด้วย anti-PARP antibody และตรวจสอบด้วย ECL reagent ตรวจวัดสัญญาณและถ่ายภาพผ่านเครื่อง Gel Documentation	19
4.3 (บน) แลบบ์โปรตีนที่ได้จากการบ่มเมมเบรนด้วย anti-p53 antibody และตรวจสอบด้วย ECL reagent ตรวจวัดสัญญาณและถ่ายภาพผ่านเครื่อง Gel Documentation (ล่าง) แลบบ์โปรตีนที่ได้จากการย้อมเมมเบรนหลังทดสอบโปรตีน p53 ด้วย Ponceau S เพื่อแสดงปริมาณโปรตีนรวมในแต่ละเลน	20
4.4 กราฟแสดงปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จาก 2', 7' -dichlorofluorescein (DCF) จากการตรวจวัดด้วย fluorescence spectroscopy	21

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 การแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับ mRNA ที่วัดด้วยเทคนิค Real-time PCR ในเซลล์มะเร็งตั้งต้นและเซลล์มะเร็งดื้อยา	15
4.2 การแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับ mRNA ที่วัดด้วยเทคนิค Real-time PCR ในเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ได้รับสาร 4-MCA เทียบกับเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ไม่ได้รับสาร	18

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง จัดเป็นโรคไม่ติดต่อที่สำคัญติดอันดับ 1 ใน 5 ของไทยและของโลก โดยมีแนวโน้มของผู้เสียชีวิตในไทยเพิ่มขึ้นทุกปีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา ซึ่งจากสถิติที่บันทึกไว้ล่าสุดในปี พ.ศ. 2558 พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งถึง 73,938 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 113.7 คนต่อประชากร 100,000 คน (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข) ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งมีด้วยกันหลายวิธี ทั้งการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป การฉายรังสี และการรักษาด้วยเคมีบำบัด ซึ่งโดยปกติแล้ว มะเร็งในระยะที่ยังไม่ลุกลามหากได้รับการรักษาด้วยสองวิธีแรกซึ่งเป็นการรักษาเฉพาะจุดก็สามารถทำให้ผู้ป่วยหายจากโรคได้ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ามาได้รับการรักษามักจะตรวจพบว่าเป็นมะเร็งในระยะที่ลุกลามแล้วหรือมีความเสี่ยงสูงว่าจะลุกลาม ซึ่งจะต้องทำการรักษาควบคู่ไปกับการใช้ยาเคมีบำบัด แม้ว่าในปัจจุบันจะมียาเคมีบำบัดหลากหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในสถานพยาบาลต่างๆ แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จ คือการที่เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาเคมีบำบัด หลังจากได้รับการรักษาไปแล้วระยะหนึ่ง (acquired drug resistance) ซึ่งการปรับเปลี่ยนสูตรยาเคมีบำบัดก็ทำให้ผู้ป่วยต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้น มีค่าใช้จ่ายที่มากขึ้น ต้องทนทุกข์ทรมานกับผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดอย่างต่อเนื่อง รวมถึงทำให้ตัวผู้ป่วยและคนใกล้ชิดเสียกำลังใจในการที่จะต่อสู้กับโรคร้ายนี้ต่อไป

ในขณะที่แนวโน้มของสังคมไทยกำลังก้าวเข้าสู่สังคมของผู้สูงอายุ แต่สถิติด้านสาธารณสุขกลับชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มการขาดสุขภาพในช่วงอายุที่เพิ่มขึ้น (http://osthailand.nic.go.th/files/social_sector/SDP_health291057-new6.pdf) การนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับประชาชนจึงเป็นเรื่องที่ทำนายสำหรับนักวิทยาศาสตร์ 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 Al *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 [*Etingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm.] จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นกันและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นหอม เหง้าของเร่วหอมนิยมนำมาใช้ผสมในเครื่องเทศปรุงอาหาร รวมทั้งใส่ใน น้ำซุปรองก้วยเตี้ยวหมุเฉียงซึ่งเป็นอีกหนึ่งเมนูขึ้นชื่อของจังหวัดจันทบุรี เร่วหอมมีสรรพคุณใช้ในการ รักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้าน มะเร็งของเหง้าเร่วหอม พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ และสารบริสุทธิ์ 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A, SiHa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เป็นต้น และมีพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Wanichwatanadecha P et al., 2016 และผลวิจัยรอตตีพิมพ์, ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงิน รายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558 และ 2559) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าเร่วหอม ได้แก่ Methoxycinnamyl p-coumarate 4-methoxycinnamaldehyde และ p-coumaric acid สามารถต้านการอักเสบได้โดยผ่านทางกลไกการยับยั้งวิถี NF- κ B หรือการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยที่ Methoxycinnamyl p-coumarate จะเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีที่สุด รองลงมาคือ 4-methoxycinnamaldehyde (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ซึ่งวิถีของ NF- κ B นั้นนอกจากจะมีความเกี่ยวข้องกับ การทำให้เซลล์มะเร็งอยู่รอดและมีความรุนแรงของโรคมามากขึ้นแล้ว ยังพบว่ามีผลเกี่ยวข้องกับการดื้อยา เคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ด้วย (Weldon CB et al., 2001; Broxterman HJ et al., 2009; Godwin P et al., 2013) เซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF- κ B สูง มักจะมีความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดมากกว่า ซึ่งทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของยาสูงกว่าเซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF- κ B ต่ำ และตัวยาที่ใช้ในการรักษาเคมีบำบัดหลายชนิด แม้ว่าจะมีกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งแตกต่างกัน เช่น doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, vincristine, paclitaxel ฯลฯ แต่ก็มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน (Das KC และ White CW, 1997; Chuang SE et al., 2002) การให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B 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- κ B ทำให้เกิดการถดถอยของมะเร็ง (cancer regression) ในหนู mice ได้ และยังทำให้เซลล์มะเร็งดื้อยา ในหนู mice เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อทำการให้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง CPT-11 เข้าไปในเซลล์ที่มีการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B (Wang CY et al., 1999)

สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิดพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างได้ รวมทั้งช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งคือยา เช่น สารสกัดจากพืช *Aframomum polyanthum*, *A. arundinaceum* และสารที่แยกได้ ได้แก่ galanals A and B, naringenin และ kaempferol-3,7,4'-trimethylether พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคือยา CEM/ADR5000 เซลล์มะเร็งเต้านมคือยา MDA-MB-231-BCRP และเซลล์เนื้องอกสมองคือยา U87MG Δ EGFR ได้ (Kute V *et al.*, 2014) สาร Curcumin ซึ่งแยกได้จาก *Curcuma longa* (Zingiberaceae) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Glioma ที่คือยาและทำให้เซลล์ต่อนั้นตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด cisplatin, etoposide, camptothecin และ doxorubicin ได้ ซึ่งมีกลไกผ่านการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B 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- κ B แล้ว สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ permeability glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์และมีหน้าที่ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์ เช่น สารสกัดของ *Curcuma aeruginosa* และ *Zingiber cassumunar* และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/ADR ที่คือต่อยา daunomycin กลับมาตอบสนองต่อยา daunomycin ได้เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนให้ยาเคมีบำบัด (Kim HR *et al.*, 2004; Chung SY *et al.*, 2009) นอกจากนี้ สาร tetrahydrocurcumin ซึ่งเป็นสารหลักที่ได้จากการย่อย curcumin ในร่างกายสิ่งมีชีวิต พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ตัวหลักที่เกี่ยวข้องกับการคือยาได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ P-glycoprotein (P-gp), mitoxantrone resistance protein (MXR) และ multidrug resistance protein 1 (MRP1) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเต้านมที่คือยา (Limtrakul P *et al.*, 2007)

จากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้และจากผลการวิจัยของคณะผู้วิจัยที่พบว่าสารสกัดเร่วหอมและสารบริสุทธิ์จากเร่วหอม 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด รวมถึงชนิดที่เป็นเซลล์มะเร็งในระยะรุนแรง และสามารถยับยั้งวิถี NF- κ B ได้ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้มะเร็งคือยา ทำให้คณะผู้วิจัยเห็นว่าแนวโน้มเป็นอย่างมากที่สารสกัดจากเร่วหอมหรือสารบริสุทธิ์ที่พบได้ในเหง้าเร่วหอมจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่คือยาได้ และ/หรือเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งที่อยู่ในระยะรุนแรงและคือยาได้ โดยจะเน้นมะเร็งที่พบมากที่สุดในหญิงไทยก่อน คือ มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้คำนึงถึงความรู้สึกของผู้ป่วยและญาติที่จะมีความสบายใจมากกว่าหากใช้ยาสมุนไพรซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในการรักษาร่วมกับยาเคมีบำบัด ทางผู้วิจัยจึงจะเริ่มทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอมเป็นอันดับแรก ซึ่งหากผลการทดลองสำเร็จ ก็อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สมุนไพรเร่วหอมในรูปแบบแคปซูลหรือยาลูกกลอนที่ให้ผู้ป่วยรับประทานในระหว่างเข้ารับการรักษาเคมีบำบัดได้ อย่างไรก็ตาม สารบริสุทธิ์ที่พบได้ในเหง้าเร่วหอมก็จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ด้วย เนื่องจากมีเป้าหมายเพื่อที่จะนำมาใช้แทนยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หรือใช้ร่วมกันกับยาแผนปัจจุบันเพื่อให้

การรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งความสำเร็จของงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นการเพิ่มโอกาสให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งที่อยู่ในระยะรุนแรงสามารถรักษาให้หายจากโรคได้และมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น รวมถึงส่งเสริมให้คนไทยมีสุขภาพตามอายุคาดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเพื่อรองรับสังคมผู้สูงอายุในอนาคต นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มคุณค่าและค่านิยมให้กับการบริโภคสมุนไพรท้องถิ่น สนับสนุนภูมิปัญญาชาวบ้าน เพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับตัวยาที่มีอยู่ในสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งเป็นการกระตุ้นเศรษฐกิจของชุมชนภาคตะวันออกให้หันมาปลูกเร็วหอมเป็นเชิงพาณิชย์มากขึ้น และอาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เร็วหอมสร้างชื่อเสียงให้กับชุมชนหรือทำเป็นสินค้าส่งออกได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าเร็วหอมและสารบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา ซึ่งการดื้อยาของเซลล์มะเร็งนี้เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากเร็วหอมเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมนำมาปรุงอาหารในภาคตะวันออก และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากเร็วหอมและสารบริสุทธิ์ 4-methoxycinnamaldehyde มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้หลายชนิด โดยยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก อีกทั้งสารสกัดทั้งสองยังมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านทางกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์หรือวิถี NF- κ B ซึ่งเป็นวิถีที่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาว่าสารสกัดจากเหง้าเร็วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยาได้โดยไม่ต้องใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดหรือไม่ และศึกษาว่าสารสกัดมีความสามารถในการเพิ่มการตอบสนองของเซลล์มะเร็งดื้อยาต่อยาเคมีบำบัดได้หรือไม่ แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้สารสกัดหรือยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว รวมทั้งศึกษากลไกในระดับโมเลกุล

กล่าวโดยสรุป งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์ทำวิจัยต่อเนื่องมาจากงานวิจัยเดิมและคงเหลือวัตถุประสงค์สำหรับปีนี้ คือ

1. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารสกัดจากเหง้าเร็วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ เริ่มต้นคณะผู้วิจัยจะทำการพัฒนาเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา 2 แบบ คือ เซลล์มะเร็งเต้านมระยะลุกลามชนิด MDA-MB-231 (invasive breast cancer cell lines) ที่ดื้อต่อยา Doxorubicin (Adriamycin) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ดื้อต่อยา Cisplatin หลังจากนั้นจะทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร็วหอมและสาร 4-methoxycinnamaldehyde ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 และ C33A ที่ดื้อยาโดยไม่ใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด ทดสอบด้วยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่ดื้อยา จากนั้นจะทำการศึกษาต่อไปว่าสารสกัดเร็วหอมสามารถช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้หรือไม่ โดยจะให้สาร

สกัดหรือสาร 4-methoxycinnamaldehyde ในเซลล์มะเร็งดื้อยาทั้ง 2 ชนิดร่วมกับยา Doxorubicin หรือ Cisplatin แล้วทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ที่ได้ระหว่างการใส่สารสกัดร่วมกับยาเคมีบำบัดกับการใส่สารสกัดหรือยาเพียงอย่างเดียว สุดท้ายจะนำเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ถูกลบยั้งไปศึกษากลไกของสารสกัดหรือสาร 4-methoxycinnamaldehyde ในการออกฤทธิ์ โดยวัดระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยา ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ด้วย Real-time PCR และ Western blot analysis

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 ยาในกลุ่ม platinum drugs (cisplatin, carboplatin) เป็นต้น กลุ่ม **Antimetabolites** ตัวยาจะเข้าไปแทนที่ในสายพันธุกรรม ส่งผลให้เกิดยับยั้งการสร้างสายพันธุกรรม 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) โดยยาในกลุ่มนี้มีออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ผิดปกติไปในเซลล์มะเร็ง เช่น ยา Imatinib (Gleevec/Glivec) และ ยา Gefitinib (Iressa) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase หรือ ยา Trastuzumab (Herceptin) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ HER2/neu ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม โดยจะเข้าจับกับโปรตีนผิวเซลล์ที่ผลิตขึ้นบนเซลล์มะเร็งเท่านั้น หรือยาในกลุ่มฮอร์โมน เช่น ยา Tamoxifen ที่มีคุณสมบัติต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Anti-estrogen) เป็นต้น (<http://www.chulacancer.net>)

ปัจจุบันสูตรยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมถูกพัฒนาขึ้นมาหลายสูตร ซึ่งยาที่นิยมใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมระยะเริ่มแรก ได้แก่ ยาในกลุ่ม Antracyclines เช่น Doxorubicin (Adriamycin) และยาในกลุ่ม taxanes เช่น Paclitaxel (Taxol) สูตรยามีด้วยกันหลายสูตร เช่น สูตร AC (Adriamycin และ Cyclophosphamide) เป็นสูตรเคมีบำบัดที่นิยมใช้กันมาก โดยเฉพาะกลุ่มที่มะเร็งเต้านมยังไม่แพร่ไปยังต่อมน้ำเหลือง สูตร TAC เป็นสูตรที่เพิ่ม Paclitaxel (Taxol) หรือ Docetaxel (Taxotere) เข้าไปในสูตร AC เพื่อไปรักษากลุ่มที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมไปยังต่อมน้ำเหลืองแล้ว หรือในรายที่มีการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังการรักษา โดย TAC จะให้หลังจากเสร็จสิ้นการรักษาด้วย AC สูตร FAC (5-Fluorouraci, Adriamycin และ Cyclophosphamide) เป็นสูตรยาที่ใช้ได้ทั้งกลุ่มที่ยังไม่แพร่ หรือแพร่ไปยังต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น (<http://www.cancer.org>; <http://www.thaibreastcancer.com>) สำหรับสูตรยารักษาโรคมะเร็งปากมดลูกนั้น จะมีตั้งแต่การใช้ยา Cisplatin เพียงชนิดเดียว หรือใช้ยา Cisplatin ควบคู่กับยาชนิดอื่น เช่น ควบคู่กับยา Paclitaxel, หรือ Gemcitabine เป็นต้น ซึ่ง Cisplatin จัดว่าเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษามะเร็งปากมดลูก (Yu S และ Garcia AA, 2015) แม้ว่าการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันจะทำให้เกิดผลการรักษาที่ดีขึ้น แต่ยาหลายชนิดมีผลข้างเคียงมากหรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงเกินไป เช่น ยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อหัวใจ ยา Cisplatin เป็นพิษต่อไต ซึ่งพบได้ 20-30% ของผู้ป่วย เป็นต้น (Wright JC, 1985; Miller RP *et al.*, 2010) และปัญหาสำคัญของการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดที่ทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร นั่นคือการที่เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้หลังจากได้รับยาไปแล้วระยะหนึ่ง (acquired drug resistance) ซึ่งกลไกในการดื้อยาอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ที่มีหน้าที่ในการผลักยาออกนอกเซลล์ (drug efflux) ได้แก่ กลุ่ม ABC (ATP-binding cassette) membrane transporter ซึ่งโปรตีนตัวหลักๆ ประกอบด้วย P-glycoprotein (P-gp; หรือ MDR1 หรือ ABCB1), breast cancer resistance protein (BCRP; หรือ MXR หรือ ABCG2) และ multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1; หรือ ABCC1) ยาด้านมะเร็งหลายชนิดสามารถถูกขนส่งออกนอกเซลล์ได้ด้วย ABC transporter เหล่านี้ เช่น Doxorubicin Daunorubin และ Etoposide เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งนั่นเอง แนวทางที่สามารถจะลดปัญหาการดื้อยานี้ อาจทำได้โดยการใช้ยาด้านมะเร็งที่ไม่สามารถถูกขับออกได้ด้วยโปรตีน 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

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ค้นหาฮัยนหรือโปรตีนภายในเซลล์เพื่อเป็นเป้าหมายใหม่ๆ สำหรับการลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง หนึ่งในนั้นคือ transcription factor NF- κ B ซึ่งในแง่ของการเกิดและพัฒนาเซลล์มะเร็ง พบว่า NF- κ B 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 วิธีของ NF- κ B สัมพันธ์กับการดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด (Weldon CB *et al.*, 2001; Broxterman HJ *et al.*, 2009; Godwin P *et al.*, 2013) โดยพบว่า เซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF- κ B สูง มักจะมีความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดมากกว่า เซลล์มะเร็งที่มีระดับการแสดงออกของ NF- κ B ต่ำ และตัวยาที่ใช้ในการรักษาเคมีบำบัดหลายชนิด เช่น doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, vincristine, paclitaxel ฯลฯ มีผลทำให้การทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้นแม้ว่าจะมีกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกันก็ตาม (Das KC และ White CW, 1997; Chuang SE *et al.*, 2002) การให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B 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 ยังพบว่า การยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ทำให้เกิดการถดถอยของมะเร็ง (cancer regression) ในหนู mice ได้ และยังทำให้เซลล์มะเร็งในหนู mice เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อทำการให้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง CPT-11 เข้าไปในเซลล์ที่มีการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B (Wang CY *et al.*, 1999)

สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิดพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ รวมทั้งช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งเต้านม เช่น สารสกัดจากพืช *Aframomum 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 U87MG Δ EGFR ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อต่อยา doxorubicin ได้ (Kuate V *et al.*, 2014) สาร Curcumin ซึ่งแยกได้จาก *Curcuma longa* (Zingiberaceae) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Glioma ที่ดื้อยาและทำให้เซลล์ที่ดื้อยานั้นตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด cisplatin, etoposide, camptothecin และ doxorubicin ได้ ซึ่งมีกลไกผ่านการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B และ AP-1 (Dhandapani KM *et al.*, 2007) อีกทั้งสาร Curcumin ยังสามารถเพิ่มการตอบสนองของเซลล์มะเร็งตับ HA22T/VGH ต่อยา cisplatin และ doxorubicin ได้อีกด้วย (Notarbartolo M *et al.*, 2005) นอกจากการยับยั้งผ่านทางวิธี NF- κ B 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 ซึ่งเป็น

สารหลักที่ได้จากการย่อย curcumin ในร่างกายสิ่งมีชีวิต พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนผิวเซลล์ตัวหลักที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ P-glycoprotein (P-gp), mitoxantrone resistance protein (MXR) และ multidrug resistance protein 1 (MRP1) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาได้ (Limtrakul P *et al.*, 2007)

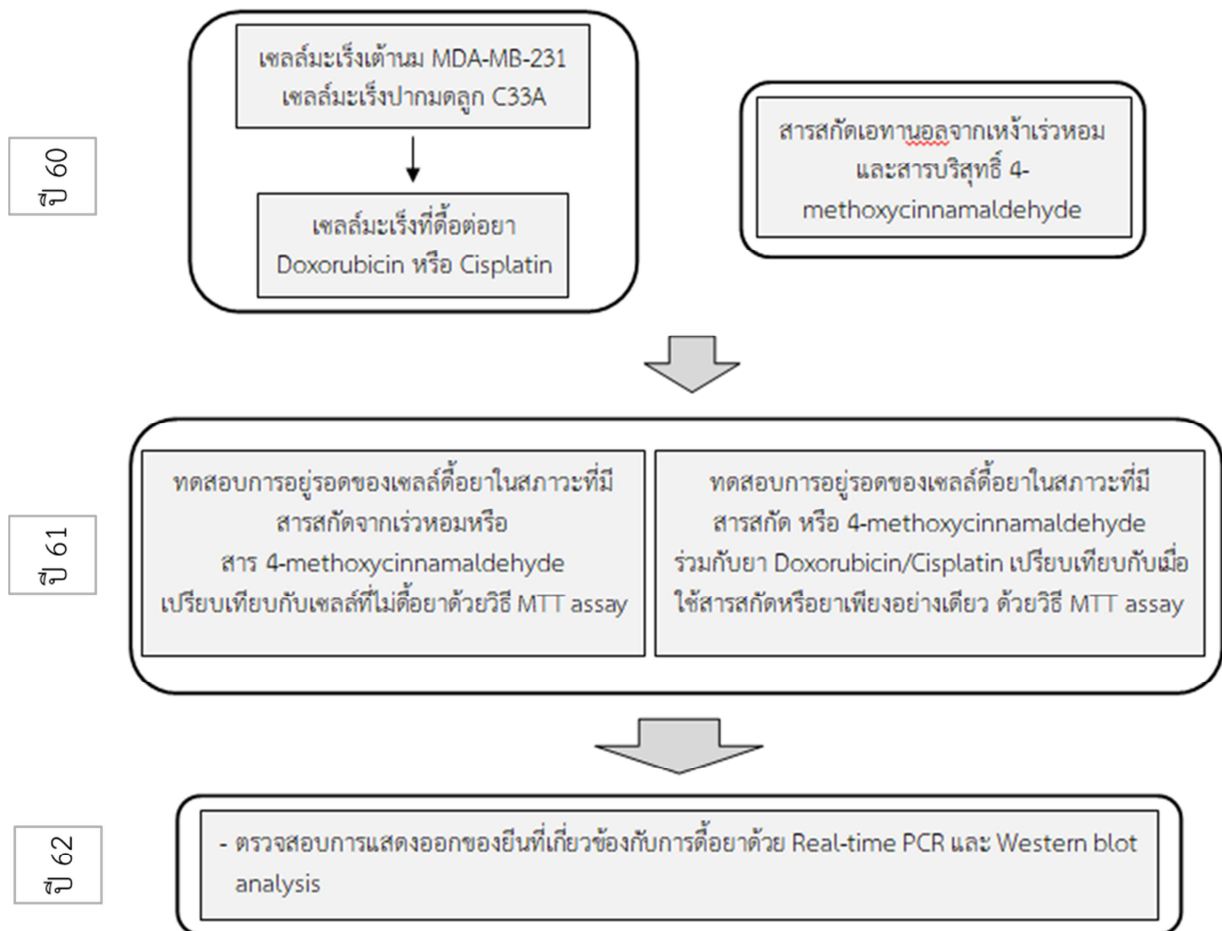
เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกับ พริกไทย พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น จันทบุรี ระยอง และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อแทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลม และแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จะมีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียขี้ แกงป่า และผัดเผ็ด เป็นต้น ในอดีตเร่วหอมนิยมปลูกเพื่อเป็นพืชสวนครัวและปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย แต่ในปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์มากขึ้น เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (<http://www.kehakaset.com>) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ผู้วิจัยทำมาอย่างต่อเนื่องและได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2558 และ 2559 ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ และสาร 4-methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A, SiHa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เป็นต้น และมีพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Wanichwatanadecha P *et al.*, 2016; ผาณิตา เอี้ยวชิโปและคณะ, 2559) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าเร่วหอม ได้แก่ Methoxycinnamyl p-coumarate 4-methoxycinnamaldehyde และ p-coumaric acid สามารถต้านการอักเสบได้โดยผ่านทางกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์หรือวิถี 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 แล้วจึงศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาของสารสกัดจากเร่วหอม และสารบริสุทธิ์ โดยวัดระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการ

ตัวยา เช่น ยีนในวิถี NF- κ B, 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

ภาพรวมของขั้นตอนการวิจัยทั้งหมดแสดงได้ดังแผนภาพด้านล่าง



3.1 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A จะถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสม 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml

streptomycin และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.2 การทดสอบผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง

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

ยีนที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง เช่น ยีนในวิถี NF- κ B, Bcl-2 family, IAPs, BRCA, ยีนที่เกี่ยวข้องกับ drug metabolism (เช่น CYPs) หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับ drug transporter (เช่น ABCs) เป็นต้น จะถูกตรวจสอบระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) โดย primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.1 เริ่มจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ผสมสารสกัด หลังจากนั้นทำการสกัด RNA ทั้งหมด วัดปริมาณ RNA ที่ได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer คำนวณปริมาณ RNA จาก 1 A260 เท่ากับ 40 μ g/mL ของ RNA จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ทั้งหมดที่ได้ด้วยวิธี reverse transcription แล้วนำ cDNA ที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ mRNA ของยีนเป้าหมาย ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย (2X) iTaqTM Universal SYBR[®] Green supermix [antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR[®] Green I dye, enhancers, stabilizers และ blend of passive reference dyes] จำนวน 10 μ l, 10 μ M Forward primer จำนวน 0.5 μ l, 10 μ M Reverse primer จำนวน 0.5 μ l, cDNA ที่สังเคราะห์ จำนวน 2 μ l และปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase ปฏิกิริยาของยีนแต่ละตัวจะถูกทำในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นวิเคราะห์หา cycle of threshold (Ct) ของแต่ละปฏิกิริยา แล้วนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณหาการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเปรียบเทียบเชิงสัมพัทธ์กับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด 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 EF-2 เป็นยีนควบคุมทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะการทดลอง

ตารางที่ 3.1 primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ชื่อ primer	ลำดับเบส
MDR1 (F)	5'-TCCATGCTCAGACAGGATGT-3'

MDR1 (R)	5'-AACTTGAGCAGCATCATTGG-3'
c-Myc (F)	5'-GGCTCCTGGCAAAAGGTCA-3'
c-Myc (R)	5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'
cyclinD1 (F)	5-TGGAGCCCGTGAAAAAGAGC-3'
ชื่อ primer	ลำดับเบส
cyclinD1 (R)	5'-TCTCCTTCATCTTAGAGGCCAC-3'
Bcl-2 (F)	5'-TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG-3'
Bcl-2 (R)	5'-GGTGCCGGTTCAGGTA CT CAGTCA-3'
Bax (F)	5'-CCTGTGCACCAAGGTGCCGGA ACT-3'
Bax (R)	5'-CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC-3'
p21 (F)	5'-GACCAGCATGACAGATTTTC-3'
p21 (R)	5'-TGAGACTAAGGCAGAAGATG-3'
p53 (F)	5'-TGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGT-3'
p53 (R)	5'-TCGGAACATCTCGAAGCGCTCA-3'
p65 (F)	5'-CTGCAGTTTGATGATGAAGA-3'
p65 (R)	5'-TAGGCGAGTTATAGCCTCAG-3'
DDH-1 (F)	5'-GTAAAGCTTTAGAGGCCAC-3'
DDH-1 (R)	5'-ATAAGGTAGAGGTCAACATAA-3'
DDH-2 (F)	5'-AAGCCGGGTTCCACCATATT-3'
DDH-2 (R)	5'-TGACATTCCACCTGGTTGCA-3'
DDH-3 (F)	5'-AAGCTGGGTTCCGCCATATA-3'
DDH-3 (R)	5'-TGCCTGCGGTTGAAGTTTGA-3'

GAPDH (F)	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH (R)	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

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

ปริมาณโปรตีนของยีนเป้าหมายจะถูกตรวจสอบด้วยวิธี Western blot analysis โดยเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเช่นเดียวกันกับที่ใช้ตรวจสอบปริมาณ mRNA จากนั้นล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็น 2 ครั้ง ดูดเก็บเซลล์ที่ลอยอยู่ใน PBS แล้วใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำมาสกัดโปรตีนด้วย Pierce™ RIPA buffer (Thermo Scientific, USA) ซึ่งผสมสารละลาย 1X protease inhibitors (Amresco) ปริมาตร 50-100 µL ทำตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ ร่วมกับการดูด cell suspension ผ่านเข็มฉีดยาขนาดเข็ม 27G x1/2" (Nipro) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 7.5-15% separating gel และ 4% stacking gel ก่อนจะย้ายโปรตีนบนแผ่นเจลไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifloride (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) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายและ β-actin (primary antibody) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T แล้วนำไปบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีนเป้าหมายในเซลล์ที่สัมผัสสารสกัดเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่สัมผัสสารสกัด ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ ANOVA และ Tukey's Honestly Significant Difference โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทดสอบผลของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง

4.1.1 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับ mRNA ด้วยวิธี Real-time PCR

เซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยา MDA-MB-231/Dox^R และเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^R ได้ถูกนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น (MDA-MB-231 และ C33A ตามลำดับ) เพื่อให้ทราบถึงกลไกการดื้อยาในเบื้องต้นของเซลล์มะเร็งที่เราพัฒนาขึ้น โดยในการทดสอบนี้จะทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR และวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Relative quantification ด้วยสูตร $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ซึ่ง normalized การแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยการแสดงออกของ *GAPDH* พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาที่เราพัฒนาให้คือดื้อยา Doxorubicin นี้ มีการแสดงออกของยีน *MDR1* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น 2.54 เท่า (ตารางที่ 4.1) ซึ่งยีน *MDR1* หรือ *ABCB1* เป็นยีนที่มีรายงานมาแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เนื่องจากเป็นยีนที่สร้าง p-glycoprotein และเกี่ยวข้องกับการขับยาออกนอกเซลล์ที่จะนำไปสู่การดื้อยาของเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด (Yun et al., 2015) นอกจากนี้ ยังพบการลดลงของ *p21* mRNA ในเซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^R ซึ่ง *p21* นี้เกี่ยวข้องกับการหยุดวัฏจักรของเซลล์ (Abbas & Dutta, 2009) แสดงให้เห็นถึงการเติบโตของเซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^R ที่มากกว่าเซลล์มะเร็งตั้งต้นนั่นเอง สอดคล้องกับผลการสังเกตที่พบจากการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งพบว่า เซลล์มะเร็งดื้อยามีการเจริญที่ดีกว่าเซลล์มะเร็งตั้งต้นเมื่อเลี้ยงอยู่ในสภาวะเดียวกัน เช่นเดียวกับกับงานวิจัยอื่นที่พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม MCF ที่ดื้อยา paclitaxel หรือ มะเร็งช่องปากชนิด HSC2 และชนิด HSC4 ที่ดื้อยา 5-fluorouracil เจริญได้เร็วกว่าเซลล์มะเร็งตั้งต้น (Harada et al., 2014; Park et al., 2019) อย่างไรก็ตาม สำหรับยีน *p65* ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ NF- κ B ไม่พบการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์มะเร็งดื้อยา MDA-MB-231/Dox^R เมื่อเทียบกับเซลล์ตั้งต้น และเป็นที่น่าเสียดายที่ไม่ได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนอื่นเพิ่มเติมในเซลล์ MDA-MB-231/Dox^R เนื่องจากเกิด contamination ของเซลล์ดังที่ได้รายงานไปในรายงานความก้าวหน้าก่อนหน้า ซึ่งทำให้ต้องพัฒนาเซลล์ดื้อยาชนิดนี้ขึ้นใหม่ แต่หลังจากที่ทำการพัฒนาเสร็จสิ้นและนำมาทดสอบระดับ

ของ *MDR* พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ *MDR* mRNA เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น (1.06 เท่า) จึงไม่ได้นำเซลล์มะเร็งเต้านมตัวนี้อาخذมาใช้ในการทดสอบต่อไป เนื่องจากต้องทำการพัฒนาใหม่หรือปรับตัวยายาเพิ่มเพื่อให้เกิดการดื้อยามากขึ้นก่อน

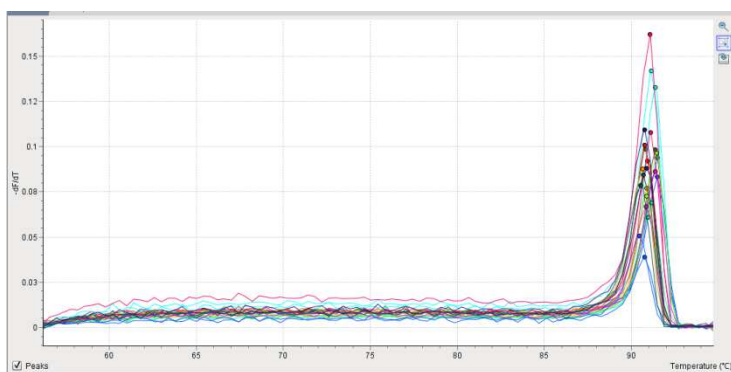
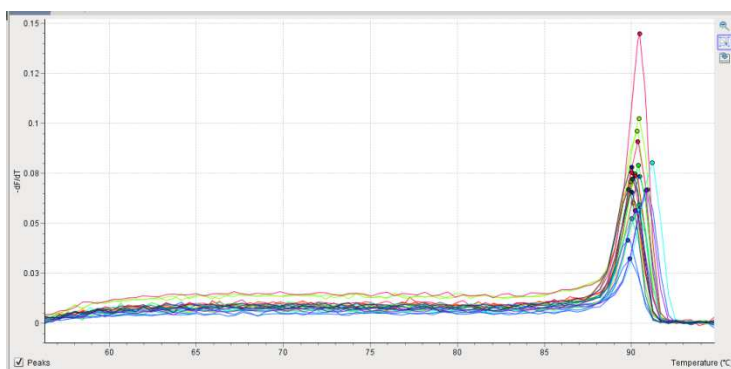
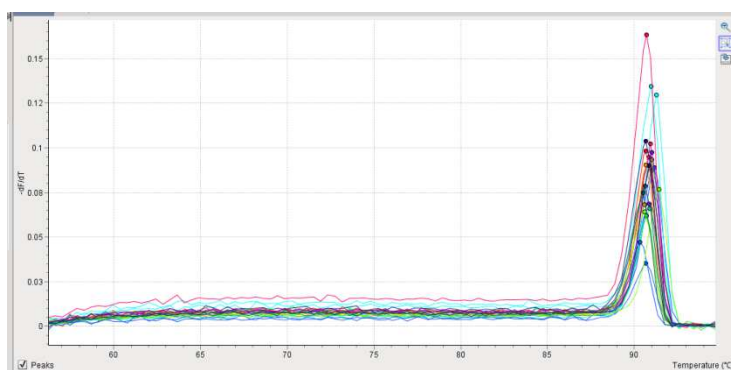
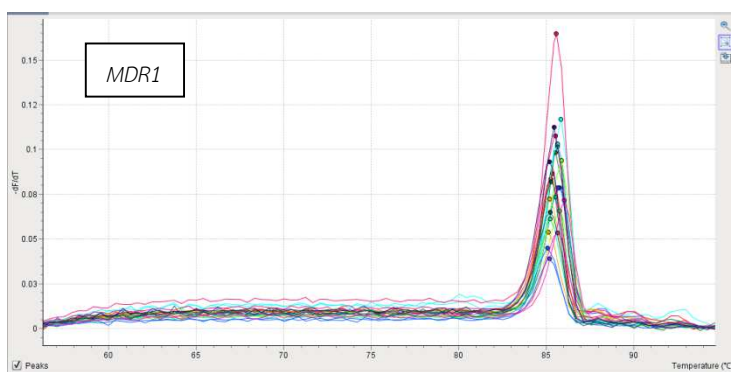
สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เรากำลังพัฒนาให้ดื้อต่อยา cisplatin ($C33A/Cis^R$) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น ดังตารางที่ 4.1 คือ มีการเพิ่มของยีน *MDR1* เช่นเดียวกับกับเซลล์มะเร็งเต้านมตัวยา 2.98 เท่า อีกทั้งยังพบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในยีนกลุ่ม *DDH* (ประมาณ 13-21 เท่า) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant system และเคยมีรายงานว่าในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยามักจะมียีนกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นเสมอ (Chen et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของ p21 ด้วย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในบริบทของเซลล์นี้ p21 อาจทำหน้าที่เป็น anti-apoptosis protein เพื่อเพิ่มการอยู่รอดให้กับเซลล์มะเร็งดื้อยา ดังที่เคยมีรายงานไว้ใน Liu และคณะ (2013)

และเนื่องจากการวัดระดับผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยสีย้อมชนิด SYBR green จะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลทดสอบได้หากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มีความไม่จำเพาะเจาะจง เช่น เกิดผลิตภัณฑ์จาก primer dimer ร่วมด้วย หรือเกิดผลิตภัณฑ์จากการที่ primer ไปจับตรงบริเวณ DNA อื่นนอกเหนือจาก cDNA ของยีนเป้าหมายที่เราต้องการ ดังนั้น ในการทดสอบนี้จึงได้มีการตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก primer ทุกคู่ด้วยการทำ melting curve analysis ผลการทดสอบพบว่า ได้กราฟที่มีจุดยอดสูงสุด (peak) เพียง 1 จุด และแต่ละเส้นได้จุด peak ตรงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียวที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ไม่มี non-specific product เกิดขึ้น จึงสรุปได้ว่า ค่าสัญญาณที่ได้จากการทดสอบนี้มาจากผลิตภัณฑ์ของยีนที่เราต้องการเท่านั้น (ภาพที่ 4.1)

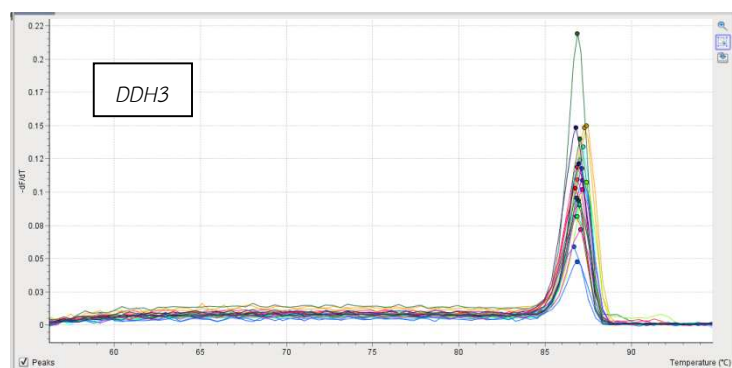
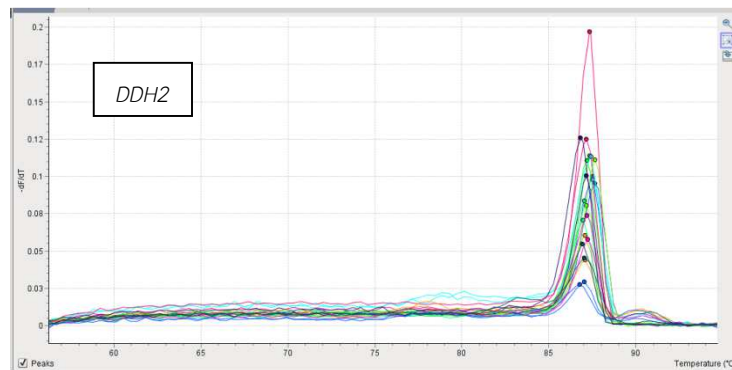
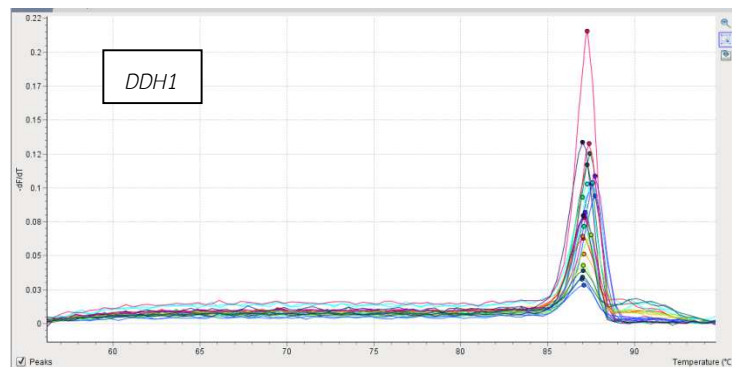
ตารางที่ 4.1 การแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับ mRNA ที่วัดด้วยเทคนิค Real-time PCR ในเซลล์มะเร็งตั้งต้นและเซลล์มะเร็งดื้อยา

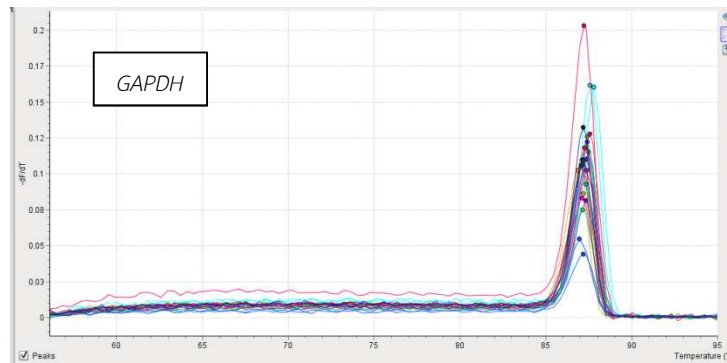
Gene	Annealing Temperature	จำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบกับเซลล์ตั้งต้น	
		MDA-MB-231/Dox ^R	C33A/Cis ^R
<i>MDR1</i>	60 °C	2.54	2.98 ± 1.12
<i>P65</i>	58 °C	1.39	1.21 ± 0.57
<i>P21</i>	55 °C	0.20	1.57 ± 0.09
<i>TP53</i>	55 °C	-	1.06 ± 0.46
<i>c-myc</i>	58 °C	-	1.19 ± 0.57

<i>CCND1</i>	60 °C	-	1.21±0.59
<i>DDH-1</i>	62 °C	-	13.24±5.11
<i>DDH-2</i>	60 °C	-	10.55±12.04
<i>DDH-3</i>	60 °C	-	21.83±12.08



ภาพที่ 4.1 Melting curve ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ real-time PCR ด้วย primer ของยีน *MDR1* *p65 p21* และ *TP53* จาก cDNA ของเซลล์ C33A และ C33A/Cis^R





ภาพที่ 4.1 (ต่อ) Melting curve ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ real-time PCR ด้วย primer ของยีน *DDH-1* *DDH-2* *DDH-3* และ *GAPDH* จาก cDNA ของเซลล์ C33A และ C33A/Cis^R

ตารางที่ 4.2 การแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับ mRNA ที่วัดด้วยเทคนิค Real-time PCR ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้รับความเสียหาย 4-MCA เทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ไม่ได้รับความเสียหาย

Gene	จำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน
	4-MCA treated C33A/Cis ^R : untreated cells
<i>MDR1</i>	0.52 ± 0.33
<i>P65</i>	1.07 ± 0.03
<i>P21</i>	1.23 ± 0.14
<i>TP53</i>	1.06 ± 0.15
<i>c-myc</i>	1.02 ± 0.10
<i>CCND1</i>	0.80 ± 0.10
<i>DDH-1</i>	0.75 ± 0.01
<i>DDH-2</i>	0.65 ± 0.00
<i>DDH-3</i>	0.94 ± 0.34

หลังจากทำการทรีทเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกดื้อยา C33A/Cis^R ด้วยสารทดสอบ 4-MCA พบว่ายีนเป้าหมายที่ทดสอบส่วนใหญ่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้รับความเสียหาย ในขณะที่จะมียีน 2 ชนิด คือ *MDR1* และ *DDH-2* ที่พบว่าการลดระดับการ

แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลนี้ ชี้ให้เห็นว่า สาร 4-MCA น่าจะมีความสามารถในการลดการ ต่อยาในเซลล์มะเร็งได้ อย่างไรก็ตาม ยังต้องยืนยันผลด้วยการทดสอบอื่นเพิ่มเติม

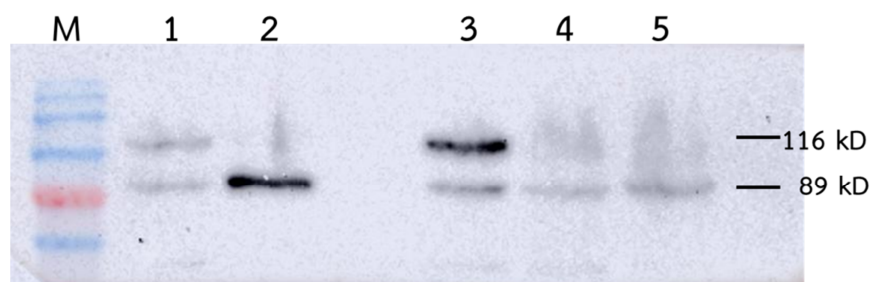
4.1.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับโปรตีนด้วย Western blot analysis

เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ได้รับสาร 4-MCA 100 μ M และเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อยา cisplatin (C33A/Cis^R) ที่ได้รับสาร 4-MCA ที่ความเข้มข้น 150 กับ 300 μ M หรือได้รับยา cisplatin 25 μ M เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จะถูกนำมาสกัดโปรตีนด้วย RIPA buffer ผสม 1X protease inhibitor cocktail จากนั้น โปรตีนรวมจำนวน 100 μ g จะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับของโปรตีน เป้าหมายด้วย Western blot analysis

เนื่องจากในกระบวนการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis นั้น จะมีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม caspase หลายชนิดเกิดขึ้น และจะเกิดการย่อยโปรตีนที่เป็น substrate ของโปรตีน caspase เหล่านี้ หนึ่งในนั้นคือ โปรตีน poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) ซึ่ง การถูกตัดของ PARP-1 (PARP-1 cleavage) ด้วย caspase นี้ จะจัดเป็นตัวบ่งชี้ถึงการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ได้ (Chaitanya et al., 2010)

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า เมื่อให้สาร 4-MCA กับเซลล์ทดสอบ จะพบ การตัดของโปรตีน PARP-1 โดยในภาพจะแสดงแถบโปรตีนขนาด 116 kD ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีน PARP-1 full-length ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 89 kD คือ ขนาดของชิ้น PARP-1 ที่ถูกตัด (catalytic fragment) ผลนี้สอดคล้องกับแถบโปรตีนที่พบในเซลล์ที่ได้รับยา Cisplatin ซึ่งถูกใช้เป็น positive control (ภาพที่ 4.2, เลนที่ 2) แสดงให้เห็นถึงกลไกที่สาร 4-MCA ใช้ในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis

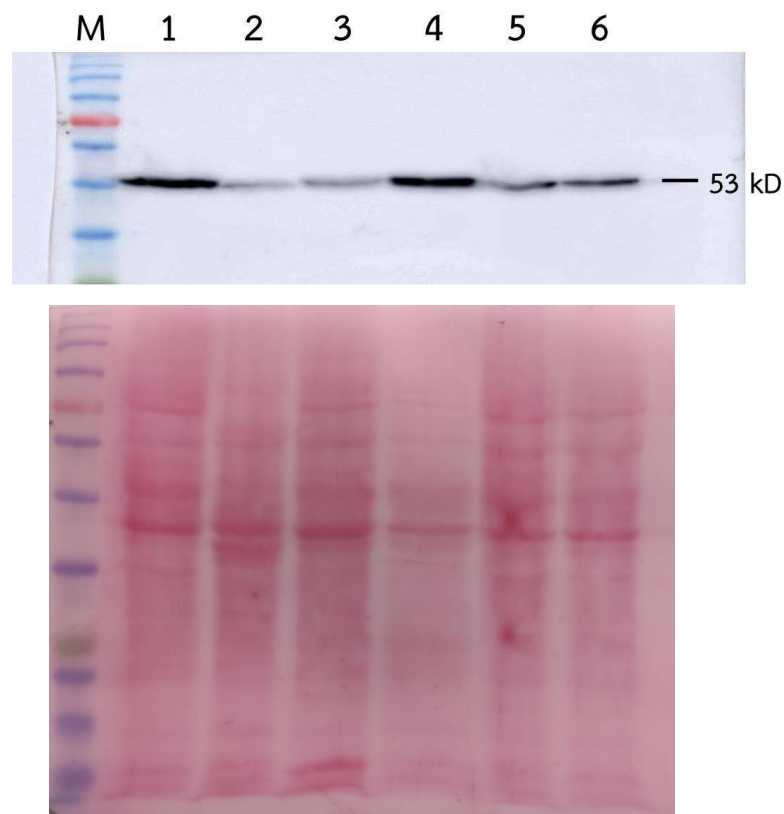
อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้พยายามศึกษาระดับของโปรตีน caspase 3 และการกระตุ้นการ ทำงานของ caspase 3 จากการตัด pro-caspase3 ด้วยเทคนิค western blot analysis ซึ่งผลที่ได้ คือ ยังไม่สามารถตรวจพบการตัดของ pro-caspase3 พบเพียงแถบโปรตีนของ pro-caspase 3 เท่านั้น ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสภาวะในการย้ายโปรตีนลงแผ่นเมมเบรนยังไม่เหมาะสม (เนื่องจาก cleaved caspase3 มีขนาดเพียง 17-19 kD เท่านั้น) หรืออาจเป็นเพราะการตัดของ PARP-1 ที่พบ นั้นไม่ได้เป็นผลมาจากการทำงานของ caspase 3 อาจเป็น caspase ชนิดอื่น ซึ่งต้องทำการทดสอบ เพิ่มเติมต่อไป



ภาพที่ 4.2 แถบโปรตีนที่ได้จากการบ่มเมมเบรนด้วย anti-PARP antibody และตรวจสอบด้วย ECL reagent ตรวจวัดสัญญาณและถ่ายภาพผ่านเครื่อง Gel Documentation (M= protein marker,

1= C33A, 2= cisplatin treated C33A, 3= C33A/Cis^R, 4= 150 μ M 4-MCA treated C33A/Cis^R, 5= 300 μ M 4-MCA treated C33A/Cis^R

และเนื่องจากโปรตีน p53 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ แต่ในเซลล์มะเร็ง C33A นี้ จะมีโปรตีน p53 ที่กลายพันธุ์ไป แบบ missense โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 273 จากเดิมเป็น Arginine ไปเป็น Cysteine (R273C) ซึ่งเคยมีรายงานว่า การกลายพันธุ์ของโปรตีน p53 ในเซลล์มะเร็งนี้ จะทำให้โปรตีน p53 เปลี่ยนบทบาทไป กล่าวคือ โปรตีน p53 จากเดิมจะส่งเสริมให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ในขณะที่โปรตีน p53 กลายพันธุ์จะเป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็งและการพัฒนาระยะของมะเร็ง (Lim et al., 2009; Bargonetti & Prives, 2019) ซึ่งเมื่อตรวจสอบระดับโปรตีน p53 กลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A และเซลล์มะเร็งต่อม้ายา C33A/Cis^R หลังได้รับสาร 4-MCA แล้ว พบว่า เซลล์มีระดับโปรตีน p53 กลายพันธุ์ที่ลดลง เช่นเดียวกับกับผลที่ได้จากยา cisplatin (ภาพที่ 4.3) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงกลไกที่สาร 4-MCA ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อม้ายา เกิดขึ้นผ่านทาง การที่สารไปลดระดับของโปรตีน p53 กลายพันธุ์นั่นเอง

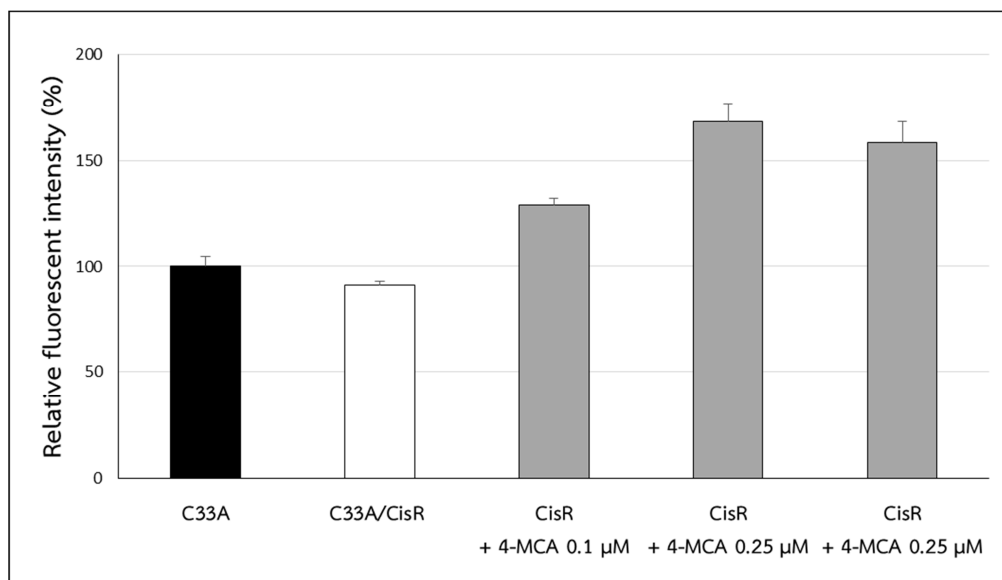


ภาพที่ 4.3 (บน) แลบบรตีนที่ได้จากการบ่มเมมเบรนด้วย anti-p53 antibody และตรวจสอบด้วย ECL reagent ตรวจวัดสัญญาณและถ่ายภาพผ่านเครื่อง Gel Documentation (ล่าง) แลบบรตีนที่ได้จากการ

ย้อมเมมเบรนหลังทดสอบโปรตีน p53 ด้วย Ponceau S เพื่อแสดงปริมาณโปรตีนรวมในแต่ละเลน (M= protein marker, 1= C33A, 2= cisplatin treated C33A, 3= 4-MCA treated C33A, 4=C33A/Cis^R, 5= 150 μ M 4-MCA treated C33A/Cis^R, 6= 300 μ M 4-MCA treated C33A/Cis^R)

และจากความสัมพันธ์แบบผกผันของโปรตีน DDH กับระดับ Reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ ที่ Chen และคณะ (2008) เคยรายงานไว้ว่า การแสดงออกของยีน *DDH1* *DDH2* และ *DDH3* จะมีเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา cisplatin (2008/C13*) และส่งผลให้ระดับ ROS ภายในเซลล์มะเร็งนั้นลดลง ทำให้ผู้วิจัยได้สนใจทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงระดับ ROS ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^R ที่ได้รับสาร 4-MCA ซึ่งมีการลดลงของระดับการแสดงออกในยีนกลุ่ม *DDH* ดังที่รายงานไว้ข้างต้นในตาราง 4.2

ผลจากการทดสอบด้วย DCHDA staining พบว่า เซลล์มะเร็งปากมดลูกดื้อยา C33A/Cis^R ที่ได้รับสาร 4-MCA มีระดับ ROS ในเซลล์ที่สูงขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (ภาพที่ 4.4) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงกลไกการทำงานของสาร 4-MCA นี้ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายผ่านทาง การเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จาก 2', 7' -dichlorofluorescein (DCF) จากการตรวจวัดด้วย fluorescence spectroscopy ที่ excitation 485 นาโนเมตร และ emission ที่ 535 นาโนเมตร โดยกำหนดให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตั้งต้น C33A มีค่าเท่ากับ 100%

ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้มีการทดสอบระดับของโปรตีน MDR1 ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น รวมทั้งเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ 4-MCA แต่ยังไม่สามารถตรวจพบโปรตีน MDR1 ได้ อาจเนื่องจากโปรตีนนี้มีขนาดใหญ่ ประมาณ 170 kD ซึ่งไม่สามารถใช้สภาวะเช่นเดียวกัน

กับการตรวจหาโปรตีนชนิดทั่วไปใด อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้พยายามเปลี่ยนสถานะหลากหลายรูปแบบ ทั้งการแยกโปรตีนและการย้ายโปรตีนลงแผ่นเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ในสูตรต่างๆ รวมทั้งการใช้ primary antibody จาก 2 บริษัทที่มีชื่อเสียง แต่ก็ยังไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนของ MDR1 ได้ ดังนั้น ในงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยจึงสามารถรายงานได้เพียงระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่ระดับของ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR เท่านั้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปผลได้ ดังนี้

1. เซลล์มะเร็งเต้านมคือยา Doxorubicin (*MDA-MB-231/Dox^R*) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกคือยา cisplatin (*C33A/Cis^R*) มีการแสดงออกของยีน *MDR1* เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น 2.54 เท่า และ 2.98 เท่า ตามลำดับ
2. เซลล์มะเร็งปากมดลูกคือยา *C33A/Cis^R* มีระดับ mRNA ของยีน *DDH-1* *DDH-2* และ *DDH-3* เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น 13.24 10.55 และ 21.83 เท่า ตามลำดับ
3. เซลล์มะเร็งปากมดลูกคือยา *C33A/Cis^R* ที่ได้รับสาร 4-MCA มีระดับ mRNA ของยีน *MDR1* และยีนในกลุ่ม *DDH* ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร
4. เซลล์มะเร็งปากมดลูกคือยา *C33A/Cis^R* ที่ได้รับสาร 4-MCA ตรวจพบการถูกตัดของโปรตีน PARP-1 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเหนี่ยวนำวิถีการตายแบบ apoptosis
5. เมื่อตรวจสอบระดับโปรตีน p53 กลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก *C33A* และเซลล์มะเร็งคือยา *C33A/Cis^R* หลังได้รับสาร 4-MCA แล้ว พบว่า เซลล์มีระดับโปรตีน p53 กลายพันธุ์ที่ลดลง เช่นเดียวกันกับผลที่ได้จากยา cisplatin
6. เซลล์มะเร็งปากมดลูกคือยา *C33A/Cis^R* ที่ได้รับสาร 4-MCA มีระดับ ROS ในเซลล์ที่สูงขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ซึ่งสื่อถึงกลไกที่สารนี้ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งคือยา

ผลผลิต (Output)

Manuscript เรื่อง *trans*-4-methoxycinnamaldehyde induces apoptosis in drug resistance cervical cancer cell through increased intracellular ROS production อยู่ในระหว่างเตรียมเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติ

บรรณานุกรม

- คณินทร์ รังสาดทอง. 2014. โปรตีน ABC transporter และการดื้อยาในโรคมะเร็ง. *Thammasat Medical Journal*. 14(3):431-42.
- พงศศักดิ์ พลเสนา. 2550a. พิษสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศศักดิ์ พลเสนา. 2550b. เระวหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเระวหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- ผาดตา เอี้ยวชีโป, เอกรัฐ ศรีสุข, มจรุส พงษ์ลิขิตมงคล และอนันต์ อธิพรชัย. 2559. การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเระวหอม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สถิติสาธารณสุข. 2556. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. 2554. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเระวหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. 2555. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเระวหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer*, 9(6), 400–414. doi:10.1038/nrc2657
- Bargonetti, J. & Prives C. (2019). Gain-of-function mutant p53: history and speculation, *Journal of Molecular Cell Biology*. 11(7): 605–609. doi:10.1093/jmcb/mjz067
- Broxterman, H.J., Gotink, K.J. & Verheul, H.M. (2009). Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. *Drug Resist Updat*. 12(4-5):114-26.

- Chaitanya, G. V., Steven, A. J., & Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell communication and signaling : CCS*, 8, 31. doi: 10.1186/1478-811X-8-31
- Chen, C., Shen, H.L., Yang, J., Chen, Q.Y. & Xu, W.L. (2011). Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137(1):9-17.
- Chen, J., Adikari, M., Pallai, R., Parekh, H.K. & Simpkins, H. (2008). Dihydrodiol dehydrogenases regulate the generation of reactive oxygen species and the development of cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61(6):979-87.
- Chuang, S.E., Yeh, P.Y., Lu, Y.S., Lai, G.M., Liao, C.M., 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, S.Y., Han, A.R., Sung, M.K., Jung, H.J., Nam, J.W., Seo, E.K., et al. (2009). Potent modulation of P-glycoprotein activity by naturally occurring phenylbutenoids from *Zingiber cassumunar*. *Phytother Res.* 23(4):472-6.
- Coley, H.M. (2008). Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 34(4):378-90.
- Das, K.C. & White, C.W. (1997). Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem.* 272(23):14914-20.
- Debata, P.R., Castellanos, M.R., Fata, J.E., 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, K.M., Mahesh, V.B., Brann & D.W. (2007). Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *J Neurochem.* 102(2):522-38.
- Elkady, A.I., Abuzinadah, O.A., Baeshen, N.A. & Rahmy, T.R. (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, A.M., Heavey, S., Barr, M.P., O'Byrne, K.J. & Gately, K. (2013). Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol.* 3:120.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., et al. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 118(3):285-96.

- Harada, K., Ferdous, T., & Ueyama, Y. (2014). Establishment of 5-fluorouracil-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines with epithelial to mesenchymal transition changes. *International Journal of Oncology*, 44, 1302-1308. doi:10.3892/ijo.2014.2270
- http://osthailand.nic.go.th/files/social_sector/SDP_health291057-new6.pdf
- <http://www.cancer.org>
- <http://www.chulacancer.net>
- <http://www.kehakaset.com>
- <http://www.thaibreastcancer.com>
- Kim, H.R., Nam, J.W., Lee, H.J., Seo, E.K., Chung, S.Y., Jeong, Y.H., 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, P.Y., Yeboah, S.O., Mbaveng, A.T., Mapitse, R., Kapche, G.D., 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.
- Lim, L.Y., Vidnovic, N., Ellisen, L.W. & Leong, C.O. (2009). Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Br J Cancer*. 101(9): 1606-12. doi: 10.1038/sj.bjc.6605335.
- Lin, Y.G., Kunnumakara, A.B., Nair, A., Merritt, W.M., Han, L.Y., Armaiz-Pena, G.N., 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., Phisalpong, C., & Ambudkar, S.V. (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, R., Wettersten, H. I., Park, S. H. & Weiss, R. H. (2013). Small-molecule inhibitors of p21 as novel therapeutics for chemotherapy-resistant kidney cancer. *Future medicinal chemistry*, 5(9), 991–994. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.56>
- Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., 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, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G. & Reeves, W.B. (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- κ B 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.
- Park, S., Kim, H., Ji, H.W., Kim, H.W., Yun, S.H., Choi, E.H. & Kim, S.J. (2019). Cold Atmospheric Plasma Restores Paclitaxel Sensitivity to Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cells by Reversing Expression of Resistance-Related Genes. *Cancers* (Basel). 11(12). pii: E2011. doi: 10.3390/cancers11122011.
- 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, M.F. (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 NF- κ B and Akt/mTOR Signaling Pathways. *J Oncol.* 2012:461562.
- Samarghandian, S., Hadjzadeh, M.A., Afshari, J.T. & 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.
- Sinha, D., Biswas, J., Sung, B., Aggarwal, B.B. & Bishayee, A. (2012). Chemopreventive and chemotherapeutic potential of curcumin in breast cancer. *Curr Drug Targets.* 13(14):1799-819.
- Smith, L., Watson, M.B., O'Kane, S.L., Drew, P.J., Lind, M.J. & Cawkwell, L. (2006). The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther.* 5(8):2115-20.
- Syed Abdul Rahman, S.N., Abdul Wahab, N. & Abd Malek, S.N. (2013). In vitro morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:257108. doi: 10.1155/2013/257108.
- 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, R.J., Nair, A., Varghese, M. & Karunakaran, 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, C.Y., Cusack, J.C. Jr, Liu, R. & Baldwin, A.S. 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*1 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 *Etilingera 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, C.B., Burow, M.E., Rolfe, K.W., Clayton, J.L., Jaffe, B.M. & Beckman, B.S. (2001). NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery*. 130(2):143-50.
- Wright, J.C. (1985). Update on cancer chemotherapy: general considerations and breast cancer. Part II. *J Natl Med Assoc*. 77(9):691-703.
- Yang, C.R., Hsieh, S.L., Ho, F.M. & Lin, W.W. (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.
- Yen, W.C. & Lamph, W.W. (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., & Garcia, A.A. (2015). Advancements in recurrent and metastatic cervical cancer. *Am J Hematol Oncol*. 11(1):26-31
- Yun, M., Lee, D., Park, M.N., Kim, E.O., Sohn, E.J., Kwon, B.M., & Kim, S.H. (2015). Cinnamaldehyde derivative (CB-PIC) sensitizes chemo-resistant cancer cells to drug-induced apoptosis via suppression of MDR1 and its upstream STAT3 and AKT signalling. *Cell Physiol Biochem*. 35(5): 1821-30. doi: 10.1159/000373993