

ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านการติดยาของไดไฮโดรอาร์เทมิซินินในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อทาม็อกซิเฟน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTICANCER AND DRUG RESISTANT REVERSAL EFFECTS OF DIHYDROARTEMISININ ON T
AMOXIFEN RESISTANT BREAST CANCER CELLS

Miss Nisakorn Pornsomchai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านการตี้อยาของไดไฮโดรอาร์เทมิซินินในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อทาม็อกซิเฟน
โดย	นางสาวนิศากร พรสมชัย
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. แพทย์หญิงวรรณรศมี เกตุชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชร ลิมปนสิทธิกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนทร ชูตินทรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนาวรัตน์ สุธัมมาภรณ์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. แพทย์หญิงวรรณรศมี เกตุชาติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชร ลิมปนสิทธิกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สิริรัตน์ สุอำพัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์)

นิศากร พรสมชัย : ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านการดื้อยาของไดไฮโดรอาร์เทมิซินินในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาม็อกซิเฟน (ANTICANCER AND DRUG RESISTANT REVERSAL EFFECTS OF DIHYDROARTEMISININ ON TAMOXIFEN RESISTANT BREAST CANCER CELLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. พญ.ววรรณรัศมี เกตุชาติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.วัชร ธิมปนสิทธิกุล, 85 หน้า.

มะเร็งเต้านมจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของไทย ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการรักษาที่ดีขึ้น แต่กลับพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนในระยะลุกลาม ร้อยละ 40 มีการพัฒนาของโรคจนเกิดการดื้อต่อยาม็อกซิเฟนที่ใช้รักษา นำไปสู่การลุกลามและแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ไดไฮโดรอาร์เทมิซินินเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ได้จากพืช *Artemisia annua* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้จึงตรวจสอบผลของไดไฮโดรอาร์เทมิซินินในการยับยั้งการรอดชีวิต การเคลื่อนที่ การลุกลาม การเพิ่มความไวต่อยาม็อกซิเฟน และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน ผลการศึกษาพบว่าไดไฮโดรอาร์เทมิซินินมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อด้านฮอโมน MCF-7/LCC-2 โดยสัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับสาร และยังสามารถลดการแสดงออกของ *c-MYC* ซึ่งทำหน้าที่เป็น positive regulator ในวัฏจักรเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกับยาม็อกซิเฟน พบว่าไดไฮโดรอาร์เทมิซินินไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของการดื้อยาในเซลล์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง *NcoA3* ที่ทำหน้าที่เป็น co-activator ในกระบวนการถอดรหัสยีนเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสารที่ใช้ทดสอบมีความสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาม็อกซิเฟน โดยมีการแสดงออกของยีน *MMP-9* และ *CXCR4* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *Vimentin* และ *E-cadherin* แสดงว่าสารทดสอบไม่มีการออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านทางกระบวนการ epithelial-mesenchymal transition กล่าวโดยสรุป ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าไดไฮโดรอาร์เทมิซินินมีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิดที่ไม่ดื้อยาและชนิดที่ดื้อต่อยาม็อกซิเฟน และยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาม็อกซิเฟน ซึ่งอาจจะเป็นยาชนิดใหม่สำหรับใช้รักษาหรือใช้ร่วมกับยาม็อกซิเฟน ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อต่อยา

ด้านฮอโมนเอสโตรเจน
สาขาวิชา เกษตรวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5687130220 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: DIHYDROARTEMISININ / CYTOTOXIC / INVASION / METASTASIS / ENDOCRINE RESISTANCE BREAST CANCER CELL

NISAKORN PORNSOMCHAI: ANTICANCER AND DRUG RESISTANT REVERSAL EFFECTS OF DIHYDROARTEMISININ ON TAMOXIFEN RESISTANT BREAST CANCER CELLS. ADVISOR: DR.WANNARASMI KETCHART, CO-ADVISOR: DR.WACHAREE LIMPANASITHIKUL, 85 pp.

Approximately 40% of advanced stage estrogen receptor positive breast cancer patients developed tamoxifen resistance, resulted in tumor recurrence and metastasis. Dihydroartemisinin (DHA) is a semi-synthetic compound found in the traditional Chinese plant called *Artemisia annua*. DHA have been shown to inhibit cell proliferation of various cancer cells. This study examined the inhibitory effects of DHA on cancer cell proliferation, migration, invasion and enhancement of tamoxifen sensitivity. The results demonstrated DHA could inhibit cell proliferation of ER positive breast cancer cells and endocrine resistance breast cancer cells in dose dependent manner. DHA decrease mRNA expression of *c-MYC*, the positive regulator of cell proliferation in cell cycle. The combination of DHA and tamoxifen (TAM) did not increase tamoxifen sensitivity of tamoxifen resistant cells and had no effect on important ER co-activator, *NcoA3* involved in tamoxifen resistance. Moreover, DHA could inhibit cell migration and invasion of tamoxifen resistant cells by significantly decreasing *MMP-9* and *CXCR4* mRNA expression which are the invasive factors. On the contrary, DHA had no effect on epithelial-mesenchymal transition process. In summary, DHA had anticancer effects in the estrogen receptor positive breast cancer and endocrine resistance breast cancer cells and inhibited cell invasion. DHA has potential to be developed as a novel therapy for treatment in estrogen receptor positive breast cancer.

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ดังรายนามต่อไปนี้

อ.พญ.ดร.วรรณรัศมี เกตุชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.วัชร ธิมปน สิทธิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ที่ถึงแม้ในบางครั้งข้าพเจ้าจะทำผิดพลาดก็มีอาจารย์คอยช่วยชี้แนะ ให้กำลังใจและให้อภัยเสมอในทุกๆ ด้าน

อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ แนวคิดต่างๆ ทั้งในตำราและนอกตำรา ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า

ดร. โรเบิร์ต คลาร์ค แห่งมหาวิทยาลัยจอร์จทาวน์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ช่วยกรุณาเอื้อเพื่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7/LCC-2 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต” บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พี่ๆ และเพื่อนๆ ที่หน่วยปฏิบัติการเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และเพื่อนร่วมศึกษาในสหสาขาวิชาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและกำลังใจต่างในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่ได้ให้ความสนับสนุนในทุกๆ เรื่องเป็นอย่างดี ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	1
สารบัญตาราง.....	1
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.4 สมมติฐาน	3
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	4
1.6 คำสำคัญ	5
1.7 รูปแบบงานวิจัย	5
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 มะเร็งเต้านม (Breast cancer).....	6
2.2 บทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อมะเร็งเต้านม	8
2.3 ขบวนการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (invasion and Metastasis).....	14
2.4 แนวทางการรักษามะเร็งเต้านม (Treatment of breast cancer)	17
2.5 กลไกการดื้อต่อยาด้านฮอร์โมน (mechanism of endocrine resistance).....	20
2.6 อาร์เทมิซินิน (ART) และไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (DHA).....	25

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	29
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	32
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture).....	32
3.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของ DHA ต่อเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 โดยวิธี MTT assay.....	32
3.2.3 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการ migration โดยวิธี scratch assay.....	33
3.2.4 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยวิธี matrigel invasion assay.....	34
3.2.5 การศึกษาผลของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยาทาม็อกซิเฟนโดยวิธี tamoxifen response assay.....	35
3.2.6 ศึกษาผลของ DHA ต่อการแสดงออกของยีนโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	36
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ.....	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง	42
4.1 การศึกษาผลของ DHA ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MCF-7/LCC-2.....	42
4.2. การศึกษาผลของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยาทาม็อกซิเฟน.....	45
4.3 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี scratch assay.....	47
4.4 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยวิธี matrigel invasion.....	49
4.5 การศึกษาผลของ DHA ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การลุกลามของเซลล์ และการดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน.....	51
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย.....	65

อภิปรายผลการทดลอง	65
สรุปผลการวิจัย.....	69
รายการอ้างอิง	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	85



สารบัญรูป

รูปที่ 1	การสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน.....	9
รูปที่ 2	แสดงโครงสร้างของ estrogen receptor	10
รูปที่ 3	การทำงานในระดับโมเลกุลของฮอร์โมนเอสโตรเจน	12
รูปที่ 4	การทำงานของยาค้านฮอร์โมนเอสโตรเจน	13
รูปที่ 5	การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมผ่านกระบวนการ EMT.....	16
รูปที่ 6	แสดงกลไกการทำงานของ Artemisinin	26
รูปที่ 7	DHA มีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์	43
รูปที่ 8	DHA เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม	46
รูปที่ 9	DHA ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง	48
รูปที่ 10	DHA ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง	50
รูปที่ 11	DHA ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งโดยเปลี่ยนแปลงการ แสดงออกในระดับ mRNA ของ c-MYC.....	52
รูปที่ 12	DHA ยับยั้งการลุกลามของเซลล์ที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งโดยเปลี่ยนแปลงการแสดงออก ในระดับ mRNA ของ CXCR4 และ MMP-9	55
รูปที่ 13	DHA ไม่มีผลยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง (MCF- 7/LCC-2) ผ่านทางกระบวนการ EMT	58
รูปที่ 14	DHA ไม่มีผลต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของ NcoA3 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อ ต่อยาต้านมะเร็ง.....	60
รูปที่ 15	แสดง basal level ของยีน MACROD2	62
รูปที่ 16	DHA ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ mRNA ของ MACROD2 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง (MCF-7/LCC-2).....	64
รูปที่ 17	แสดงกลไกการทำงานของ DHA	70

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา tamoxifen และการ ลุกลามแพร่กระจายของเซลล์.....	25
ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของยีนที่ใช้ในการศึกษา	39
ตารางที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์.....	44



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งเต้านม (breast cancer) เป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบมากทั่วโลก จัดเป็นปัญหาสาธารณสุขหลักที่สำคัญ จากการรายงานของสถาบันวิจัยมะเร็งประเทศอังกฤษในปี พ.ศ. 2554 พบโรคมะเร็งเต้านมมากเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งที่พบทั่วโลก โดยมีอัตราการเสียชีวิตของผู้หญิงทั่วโลกอยู่ที่ร้อยละ 14 (Jemal et al., 2011) จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติพบผู้หญิงไทยป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมมากเป็นอันดับ 1 และมีอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งที่ 20.5 คนต่อประชากร 100,000 คน และพบว่ากว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมจัดอยู่ในชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor positive) (Al Saleh, Sharaf, & Luqmani, 2011; Anderson, Chatterjee, Ershler, & Brawley, 2002)

องค์กร US national institutes of Health (NIH) แนะนำว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนหลังจากได้รับการผ่าตัดควรได้รับการรักษาด้วยยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 ปี (Yang et al., 2010) ปัจจุบันยาที่นิยมนำมาใช้รักษาเป็นยาตัวแรกคือยาทาโมซิเฟน (tamoxifen) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม selective estrogen receptor modulators (SERMs) เป็นยาที่ไปออกฤทธิ์จับกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor หรือ ER) ยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน ไม่ให้เกิดการเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Brauch & Jordan, 2009) ซึ่งปัญหาที่พบหลังจากให้การรักษาด้วยยา tamoxifen ในช่วงระยะเวลา 1-3 ปี คือผู้ป่วยมะเร็งเต้านมประมาณ 40% มีการพัฒนาของโรคมะเร็งเกิดการดื้อต่อยา (resistance) (Ring & Dowsett, 2004) ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีความสามารถในการอยู่รอด (survival) เจริญเติบโต มีการลุกลาม (invasion) ไปยังเนื้อเยื่อบริเวณอื่นและสุดท้ายเกิดการแพร่กระจาย (metastasis) ไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย เช่นปอดและสมอง นำไปสู่การเสียชีวิตในที่สุด จากสาเหตุดังกล่าวซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข จึงมีการค้นคว้ายาใหม่ที่จะนำมาช่วยในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมในผู้ป่วยที่ดื้อต่อยา tamoxifen เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยาวนานขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Mohseni และคณะในปี พ.ศ. 2557 พบการแสดงออกของยีน *MACROD2* ที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยา tamoxifen เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ไม่มีการดื้อต่อยา และเมื่อทำการศึกษาต่อโดยการลดการแสดงออกของยีน *MACROD2* พบว่าสามารถลดการดื้อต่อยาของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดดื้อต่อยา tamoxifen ได้ (Mohseni et al., 2014) *MACROD2* จึงเป็นยีนใหม่ที่มีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดการดื้อต่อยาและการพยากรณ์โรครวมทั้งอาจเป็นเป้าหมายในการคิดค้นยาที่จะนำมารักษาต่อไป

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอาร์เทมิซินิน (artemisinin หรือ ART) เป็นสารกึ่งสังเคราะห์จากพืช *Artemisia annua* ซึ่งมีโครงสร้างเป็น sesquiterpene lactone ปัจจุบันมีการนำอนุพันธ์ของสารนี้มาใช้เป็นยาต้านมาลาเรียและยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด โดยออกฤทธิ์ทำลายสถานะออกซิเดชัน เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด ขัดขวางการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านทางระบบต่อมน้ำเหลือง และช่วยเพิ่มความไวต่อรังสีรักษาเป็นต้น (Y. Y. Lu et al., 2009; Nakase et al., 2009; Nakase, Lai, Singh, & Sasaki, 2008; Oh, Kim, Singh, Lai, & Sasaki, 2009; Z. Wang et al., 2012; Youns et al., 2009) จากการศึกษาพบว่าสาร metabolite หลักของ ART ได้แก่ ไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (dihydroartemisinin หรือ DHA) มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียและฤทธิ์ต้านมะเร็งที่สูงกว่าอนุพันธ์ชนิดอื่นๆ ของ ART โดย DHA ละลายตัวได้ดีในน้ำ มีการดูดซึม การคงตัวสูงในการทดสอบทางคลินิก และมีฤทธิ์ลดการเจริญเติบโต การลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่แสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (ER negative) ได้ดี (Zhang et al., 2014) จากการศึกษาของ Chen และคณะพบว่า DHA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยมีการลดลงของระดับ *c-MYC* และ *Cyclin-D* (Chen, Sun, Pan, Jiang, & Sun, 2009) นอกจากนี้ทั้งสองมีคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนของเซลล์แล้ว ยังเป็น ER target gene อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า *NF- κ B* มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านมะเร็งของ DHA โดยการ DHA ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ *NF- κ B* ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งปอด (Crespo-Ortiz & Wei, 2012) ลดการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม (Hwang et al., 2010) และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกการดื้อยาต้านฮอร์โมนนั้นเกิดจากการส่งสัญญาณการทำงานผ่าน pathway ของ *NF- κ B* ได้เช่นกัน เมื่อทดสอบโดยการให้ยาทาโมอกซิเฟน ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจน พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของ *NF- κ B* ให้เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์นำไปสู่การพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนในที่สุด (Sas et al., 2012) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *NF- κ B* มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาต้านฮอร์โมนและขณะเดียวกัน DHA สามารถยับยั้งการทำงานของ *NF- κ B* ได้เช่นกัน ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า DHA จึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาโมอกซิเฟนได้

อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่า DHA ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของ DHA ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ซึ่งเป็นปัญหาหลักที่สำคัญของสาธารณสุขทั่วโลก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ DHA ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองต่อการรักษาและลดฤทธิ์การดื้อยาต้านฮอร์โมนในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยา tamoxifen รวมถึงการศึกษากลไกของ DHA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

การลุกลามและการแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของผู้ป่วยมะเร็ง

1.2 คำถามของการวิจัย

- 1 DHA มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจนหรือไม่
- 2 DHA สามารถเพิ่มความไวต่อยา tamoxifen ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจนที่ต่อยา tamoxifen ได้หรือไม่

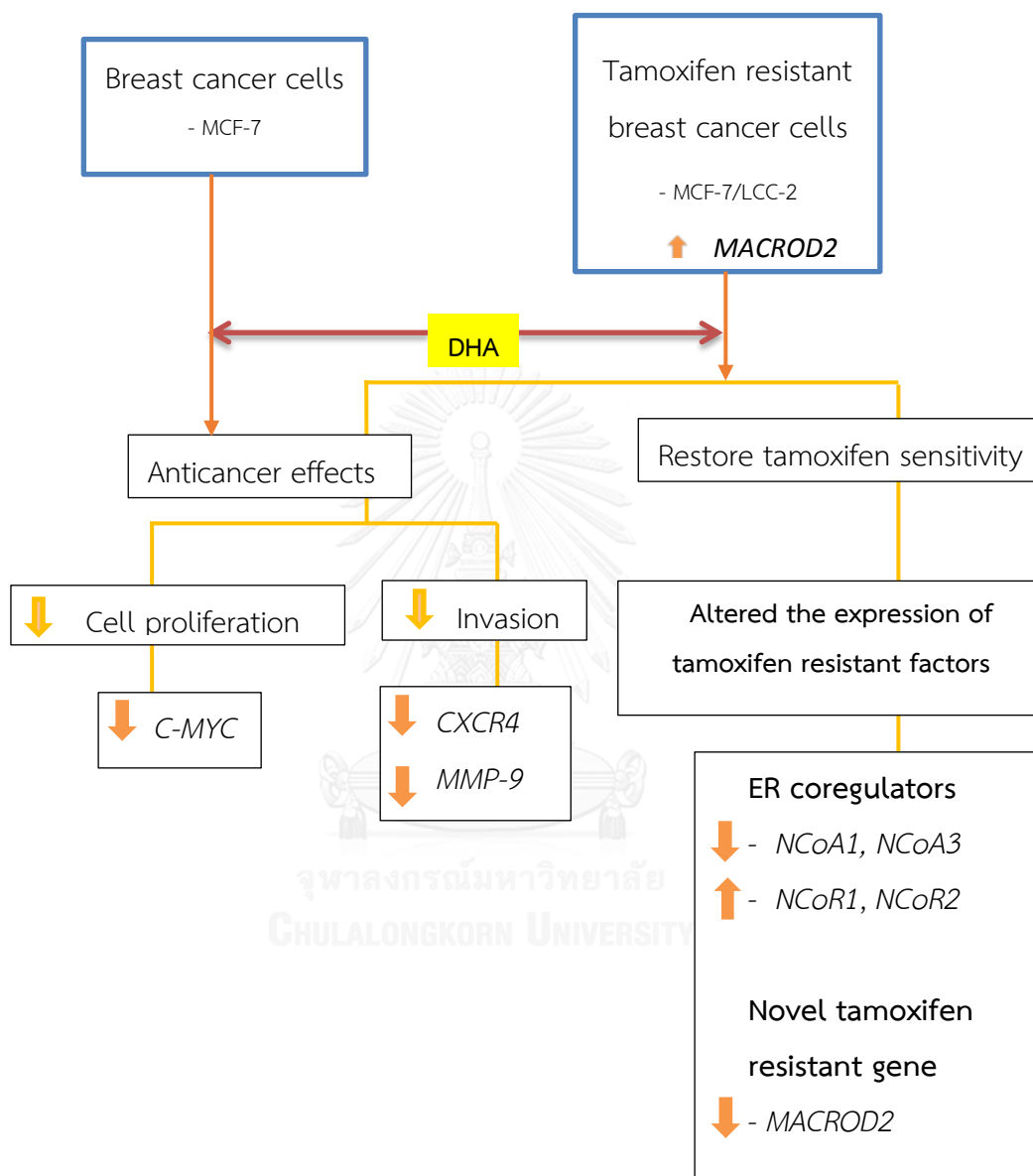
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ DHA ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจน
- 2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยา tamoxifen ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจนที่ต่อยา tamoxifen

1.4 สมมติฐาน

- 1 DHA มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจน
- 2 DHA มีฤทธิ์ในการเพิ่มความไวต่อยา tamoxifen ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด ที่มีตัวรับเอสโตรเจนที่ต่อยา tamoxifen

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย



ในงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer) และฤทธิ์ในการเพิ่มความไวต่อ ยา tamoxifen ของ DHA ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, MCF-7/LCC-2 ในส่วนของฤทธิ์การต้านมะเร็งนั้นจะทำการทดสอบผลของ DHA ในการยับยั้งการรอดชีวิต การลุกล้ำ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการข้างต้น และจะทำการทดสอบเพื่อศึกษาฤทธิ์ในการเพิ่มความไวต่อยา tamoxifen เมื่อให้ร่วมกับ DHA และตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการการตอบสนองต่อยา tamoxifen หลังจากได้รับ DHA

1.6 คำสำคัญ

Dihydroartemisinin, tamoxifen, drug resistance, breast cancer cells, *MACROD2*

1.7 รูปแบบงานวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (laboratory experimental research)

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงฤทธิ์ของ DHA ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน tamoxifen โดยสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนารักษา มะเร็งเต้านมและเพื่อใช้ศึกษาต่อในกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลเพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมชนิดที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเร็งเต้านม (Breast cancer)

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของประชากรทั่วโลก โดยพบอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งเต้านมสูงที่สุดถึงร้อยละ 15-20 ในประชากรหญิงทั่วโลก (Noori & Hassan, 2012) แม้ว่าอัตราการตายของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมลดลงถึงร้อยละ 25 ในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาเนื่องจากการวินิจฉัยได้เร็วและรักษาได้อย่างถูกต้อง แต่อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งเต้านมยังคงเพิ่มขึ้นสูงในประชากรหญิง (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2012)

มะเร็งเต้านมเกิดจากความผิดปกติของเซลล์ที่อยู่ภายในท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำนม เซลล์เหล่านี้จะมีการแบ่งตัวผิดปกติไม่สามารถควบคุมได้ และมักจะมีการแพร่กระจายไปตามทางเดินน้ำเหลืองไปสู่อวัยวะที่ใกล้เคียงเช่น ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ หรือแพร่กระจายไปสู่อวัยวะที่อยู่ห่างไกล เช่น กระดูก ปอด ตับ และสมอง เช่นเดียวกับมะเร็งชนิดอื่นๆ เมื่อเซลล์มะเร็งมีจำนวนมากขึ้นก็จะมีอาการแสบอาหารและปล่อยสารบางอย่างที่เป็นอันตรายและทำลายอวัยวะต่างๆ จนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด (Head neck and breast surgery Siriraj hospital, 2012)

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม

- การได้รับเอสโตรเจนเป็นระยะเวลานานสามารถเพิ่มความเสี่ยงการเกิดมะเร็งเต้านมในประชากรที่มีประจำเดือนก่อนอายุ 12 ปี (menarche) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยที่เริ่มมีประจำเดือนช้ากว่าปกติ 2 ปี จะมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นถึง 10% (Brinton, Schairer, Hoover, & Fraumeni, 1988) อายุในช่วงวัยหมดประจำเดือน (menopause) มากกว่า 55 ปีมีผลต่อการเกิดมะเร็งเต้านมเช่นกัน โดยระยะเวลา 5 ปีที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมถึง 17% (Hsieh, Trichopoulos, Katsouyanni, & Yuasa, 1990) เนื่องจากมีการเพิ่มระยะเวลาที่สัมผัสกับเอสโตรเจนมากขึ้น
- ผู้หญิงที่ไม่เคยผ่านการคลอดบุตรและผู้หญิงที่ตั้งครรภ์ในช่วงอายุหลัง 30 ปีขึ้นไป เหล่านี้พบว่าทำให้เพิ่มความสามารถการแบ่งตัวของเซลล์ (mitotic activity) สูงขึ้น
- ผู้ป่วยวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนทั้งเอสโตรเจน และเอสโตรเจนร่วมกับโปรเจสติน พบมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งเต้านมสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนทดแทนถึง 2.2% ต่อปี (Pike, Spicer, Dahmouh, & Press, 1993)

- ผู้ป่วยที่มีระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูง จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนสูงกว่าผู้ป่วยที่มีระดับฮอร์โมนต่ำประมาณ 4-5 เท่า และเพิ่มโอกาสในการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนถึง 2% ในระยะเวลา 5 ปี เนื่องจากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจะถูกเอนไซม์อโรมาเทสเปลี่ยนแปลงให้เป็นเอสตราไดโอล (estradiol) เข้าจับกับ ER เข้าสู่กระบวนการ transcription ของยีนและเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามมา (Cummings et al., 2005)
- การกลายพันธุ์ของยีน *BRCA1* และ *BRCA2* ซึ่งเป็น tumor suppressor gene ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการ transcription เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จึงไม่สามารถควบคุมการทำงานให้เป็นปกติ เซลล์มีการแบ่งตัวที่เพิ่มสูงมากขึ้นตามมา พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเต้านมในวัยก่อนหมดประจำเดือนเช่นกัน
- โรคอ้วนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งเต้านมในผู้ป่วยวัยหมดประจำเดือน โดยจะมีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ได้สูงมากกว่าผู้ป่วยที่น้ำหนักตัวปกติ จึงมีการทำงานของเอสโตรเจนที่เพิ่มสูงขึ้น (Pike et al., 1993)

ชนิดของมะเร็งเต้านม (Type of breast cancer)

ชนิดของมะเร็งเต้านมแบ่งตามโมเลกุลของเซลล์ (molecular classification) ได้เป็น 4 ประเภท (Selvi et al., 2015) เพื่อสะดวกต่อการจำแนกวิธีและชนิดของยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย

1. luminal A ชนิดนี้จะมีการแสดงออกของที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและ ยีนต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับ ER ในระดับที่สูง แต่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ proliferation ต่ำ มีการพยากรณ์โรคที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่น
2. luminal B ชนิดนี้จะมีการแสดงออกของ ER ที่ต่ำ แต่มีการแสดงออกของ ER-related gene และ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการ proliferation ที่สูง มีการพยากรณ์โรคที่ด้อยกว่า luminal A
3. *HER2+* related ชนิดนี้จะไม่มีการแสดงออกของ ER แต่มีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *HER2+* ที่มากกว่าปกติ ได้แก่ *GRB7* และ *TOP2A* มีการเกิด proliferation ที่สูง มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี มีอาการทางคลินิกที่ค่อนข้างรุนแรง
4. basal-like ชนิดนี้มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีเช่นกัน โดยอาจเรียกได้อีกชื่อคือ triple negative คือไม่มีการแสดงออกของ ER, progesterone receptor (PR) และ *HER2*

ระยะของมะเร็งเต้านมแบ่งตามลักษณะทางคลินิก (Clinical staging of breast cancer)

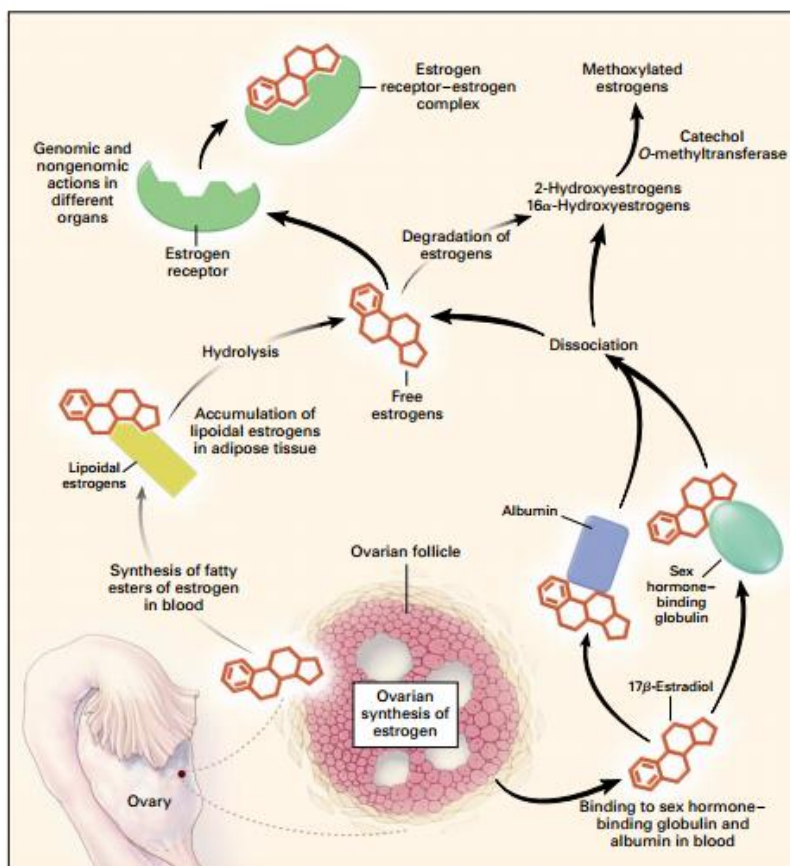
มะเร็งเต้านมสามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

- | | |
|-----------|--|
| ระยะที่ 1 | ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 2 ซม. และยังไม่มีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ |
| ระยะที่ 2 | ก้อนมะเร็งมีขนาดระหว่าง 2 - 5 ซม. และ/หรือมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ข้างเดียวกัน |
| ระยะที่ 3 | ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 ซม. แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ข้างเดียวกันอย่างมาก จนทำให้ต่อมน้ำเหลืองเหล่านั้นมารวมติดกันเป็นก้อนใหญ่หรือติดแน่นกับอวัยวะข้างเคียง |
| ระยะที่ 4 | ก้อนมะเร็งมีขนาดโตเท่าไรก็ได้ แต่พบว่าการแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นของร่างกายที่อยู่ไกลออกไป เช่น กระดูก ปอด ตับ หรือสมอง เป็นต้น |

2.2 บทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อมะเร็งเต้านม

ฮอร์โมนเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจน

เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนเพศหญิงที่สร้างจากรังไข่ มีความสำคัญต่อพัฒนาการทางเพศที่ปกติในผู้หญิง และการสร้างรอบประจำเดือนที่ปกติ เมื่อมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งมักจะพบในรูปของ 17 β -estradiol (E2) จะถูกหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด เข้าจับกับ sex-hormone-binding globulin และ albumin ส่วนเอสโตรเจนที่เป็นอิสระจะมีการแพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ เข้าจับกับตัวรับเอสโตรเจนส่งผลให้เกิดการทำงานผ่านทาง genomic หรือ nongenomic ตามมา (ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อต่อไป) นอกจากนี้ยังมี lipoidal estrogens ที่ถูกสังเคราะห์ในเลือดหรือเนื้อเยื่ออื่นๆ และเก็บสะสมอยู่ที่บริเวณไขมันในร่างกาย (Gruber, Tschugguel, Schneeberger, & Huber, 2002)



รูปที่ 1 การสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Gruber et al., 2002)

เนื่องจากในการศึกษานี้มุ่งเน้นถึงการเกิดโรคมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ดังนั้นเอสโตรเจนจึงมีบทบาทที่สำคัญในการก่อโรคมะเร็งเต้านมชนิดนี้

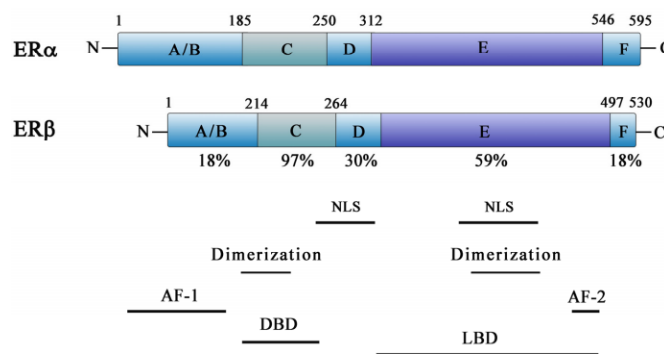
การทำงานของเอสโตรเจนเริ่มจากการเข้าจับกับ ER แล้วเกิดการกระตุ้นทั้งทางตรงและทางอ้อมให้มีการเพิ่มขึ้นของ growth factor ต่างๆ ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมตามมา (Russo, Ao, Grill, & Russo, 1999) โดยการทำงานของเอสโตรเจนต้องมีการเข้าจับกับตัวรับ (receptor) ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

ตัวรับเอสโตรเจน (Estrogen receptor : ER)

ER เป็นตัวรับในกลุ่ม superfamily of nuclear receptors ทำหน้าที่เป็น transcription factors แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ER α และ ER β สร้างจากยีนที่อยู่บนตำแหน่งโครโมโซมที่ 6 และ 14 ตามลำดับ (Green, Walter, Kumar, et al., 1986; Osborne & Schiff, 2005) พบการแสดงออกของ ER อยู่บนเนื้อเยื่อเต้านมปกติ แต่จะมีเฉพาะ ER α ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด

โรคมะเร็งเต้านมและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ในขณะที่หน้าที่การทำงานของ ER β ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Osborne, Schiff, Fuqua, & Shou, 2001)

โครงสร้างของตัวรับทั้ง 2 นี้ประกอบไปด้วย 6 domain เป็น A-F ฝั่ง n-terminal หรือ A/B domain จะประกอบไปด้วย activation function 1 (AF1) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการตอบสนองต่อการเกิด transcriptional activity ของ ER ในกรณีที่ไม่มี ligand (Tora et al., 1989) ตำแหน่ง C domain หรือที่เรียกว่า DNA-binding domain (DBD) จะประกอบไปด้วย 2 โครงสร้าง zinc-finger ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิด dimerization และการเข้าสู่ของ receptor ต่อ specific DNA sequences (Green, Walter, Greene, et al., 1986; Kumar et al., 1987) ส่วน D domain เป็น hinge region อยู่ระหว่าง C และ E domains ที่ประกอบไปด้วย nuclear localization signal (Norris, Fan, Kerner, & McDonnell, 1997) โดย E domain เป็น ligand-binding domain (LBD) ที่ประกอบด้วย second nuclear localization signal ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิด dimerization และเป็นตำแหน่งที่มี helix 12 มีความเกี่ยวข้องกับ ligand binding (Webster, Green, Tasset, Ponglikitmongkol, & Chambon, 1989) E domain ยังเป็นที่อยู่ของ activation function 2 (AF2) ที่มีการตอบสนองต่อ ligand-dependent activation ของ ER (Berry, Metzger, & Chambon, 1990; Tzukerman et al., 1994) ส่วน F domain จะตั้งอยู่บน C-terminal เป็นส่วนที่เล็กที่สุดทำหน้าที่ควบคุมทั้ง AF1 และ AF2 แต่ไม่มีความสำคัญในการ transcriptional แต่อย่างใด (Tora et al., 1989)



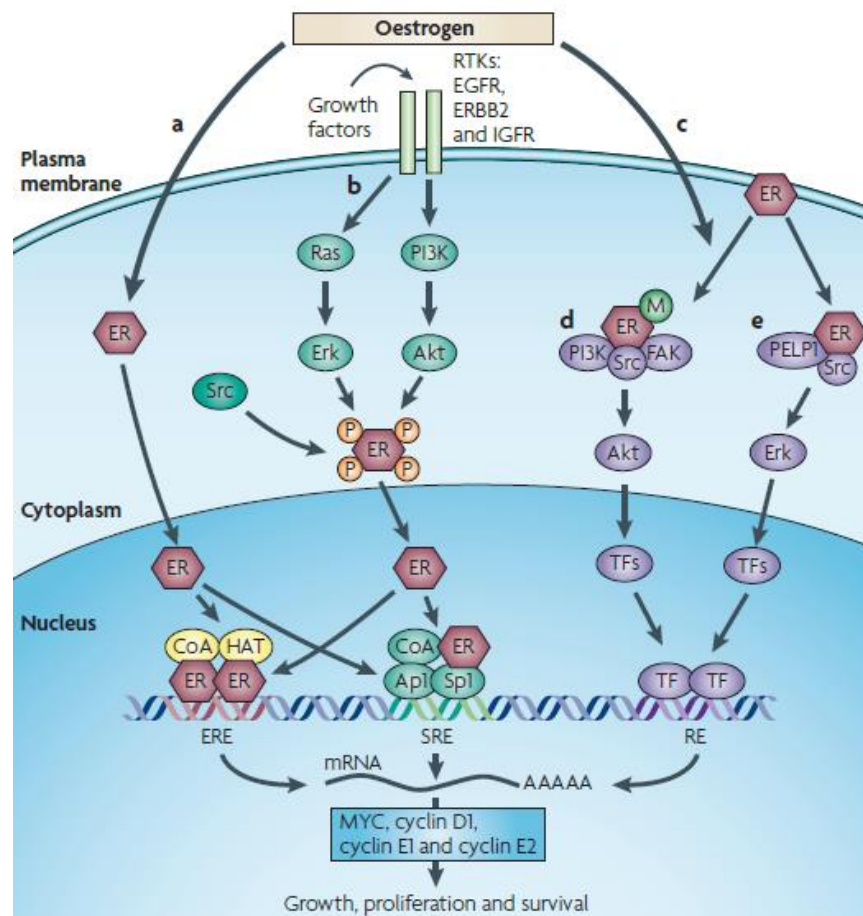
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ estrogen receptor (Rocio et al., 2012)

ER α มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์ ผ่านทาง 2 กลไก คือ ทาง genomic และ non-genomic signaling pathway

1. genomic pathway โดยจะพบการแสดงของออก ER signaling pathway ส่วนใหญ่ผ่านทาง pathway นี้ เริ่มต้นจาก ligand เข้าจับกับ receptor เหนี่ยวนำให้เกิด conformational change และเกิดการแยก chaperon proteins จากนั้นจึงเกิดการ

dimerization และ translocation เข้าสู่ nucleus (Osborne et al., 2001) โดย ligand-ER complex นี้จะเข้าจับกับ consensus sequence ที่เรียกว่า estrogen response element (ERE) เกิดการทำงานทั้งทางตรงและทางอ้อมผ่านทางโปรตีนคู่โปรตีนด้วย activator protein 1 (AP1) หรือผ่านทางตำแหน่ง SP 1 ใน promoter region ของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการ ทำงานของ coregulatory proteins (coactivators หรือ corepressors) ที่สามารถไปเพิ่ม หรือลดการเกิด ER transcriptional activity ขึ้นอยู่กับความจำเพาะต่อ ligand นั้นๆ (Deroo & Korach, 2006; McKenna, Lanz, & O'Malley, 1999) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี microarray พบว่าประมาณ 70% ของ estrogen-responsive genes จะถูก downregulation โดย estradiol ใน MCF-7 cells ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น transcriptional repressors หรือ anti-proliferative และ pro-apoptotic (Frasor et al., 2003)

2. non-genomic pathway เกิดการทำงานโดย 1) มีการเหนี่ยวนำผ่าน ER ที่อยู่ใน caveolar rafts บริเวณ plasma membrane (Marino & Ascenzi, 2008; Razandi, Oh, Pedram, Schnitzer, & Levin, 2002) plasma membrane ER สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ G-proteins, *Src*, growth factor receptors (*EGFR*, *IGFR1*, *HER2*), cytoplasmic kinases (*MAPKs*, *PI3K*, *AKT*) และ signaling enzymes (adenyl cyclase, nitric-oxide synthase) เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการทำงานของ transcription factor (TF) เพิ่มการแสดงออกของยีน *MYC*, *CyclinD1* (Kahlert et al., 2000; Migliaccio et al., 1996) 2) การเกิด phosphorylation ของ ER โดย *Erk* หรือ *Akt* ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ ER เคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียส จับกับ serum response element (SRE) และกระตุ้นการ transcription ของยีน *MYC* และ *CyclinD1* ซึ่งการเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ตัวนี้ส่งผลให้เพิ่มการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนของเซลล์ และควมมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตามมา ดังแสดงในรูปที่ 3



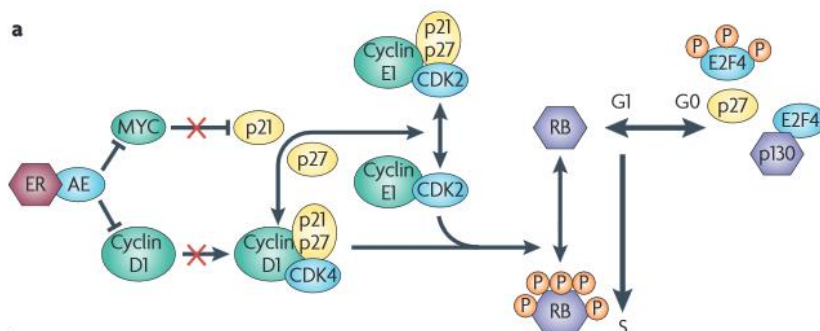
รูปที่ 3 การเข้าทำงานในระดับโมเลกุลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Musgrove & Sutherland, 2009)

ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนและมะเร็งเต้านม

ฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนเพศที่มีบทบาทสำคัญต่อความสมบูรณ์และการเจริญของเนื้อเยื่อเต้านม การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นระยะเวลาสั้น เช่นในกลุ่มผู้ที่มีประจำเดือนก่อนวัยปกติ และผู้ที่หมดประจำเดือนช้า หรือผู้ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนเป็นเวลานาน พบว่าจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม โดยฮอร์โมนเอสโตรเจนจะเข้าไปจับกับตัวรับเอสโตรเจน กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มากยิ่งขึ้น (Musgrove & Sutherland, 2009)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายาในกลุ่มต้านฮอร์โมนเอสโตรเจนเช่น tamoxifen มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (cytostatic) และยังมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) (Dowsett et al., 2006) โดยจะทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงและหยุดการทำงานของเซลล์ในระยะ G1 (G1 phase-specific cell cycle arrest) ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง

(Doisneau-Sixou et al., 2003) ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 3 ซึ่งยาต้านฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้นจะไปมีผลต่อการส่งสัญญาณ downstream ของเซลล์ หากมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะตัวรับของเอสโตรเจนก็อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อยา และอาจจะทำให้ผู้ป่วยมีการตอบสนองเมื่อรักษาด้วยยาที่มีออกซิเฟนลดลงเช่นกัน การเกิด overexpression ของยีน *MYC*, *Cyclin E1*, *Cyclin D1* หรือการยับยั้งการทำงานของ RB tumour suppressor ซึ่งมีบทบาทสำคัญใน cyclin-dependent kinases (CDKs) pathway ที่มีการทำงานในระยะ G1 จะไปทำให้เกิดการลดการแสดงออกของ CDK inhibitors p21 หรือ p27 ทำให้ฤทธิ์ของยาต้านฮอร์โมนลดลงด้วย และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ MCF-7 มีผลทำให้ *Cyclin D1* เพิ่มสูงขึ้น (Bosco et al., 2007; Cariou et al., 2000; Carroll, Prall, Musgrove, & Sutherland, 2000; Dhillon & Mudryj, 2002; Hui et al., 2002; Prall, Rogan, Musgrove, Watts, & Sutherland, 1998; Varma, Skildum, & Conrad, 2007; Venditti, Iwasow, Orr, & Shiu, 2002; Y. Wang et al., 2008)



รูปที่ 4 การทำงานของยาต้านฮอร์โมนเอสโตรเจน (Musgrove & Sutherland, 2009)

การทำงานของยาต้านฮอร์โมนเอสโตรเจนในวัฏจักรของเซลล์และกระบวนการ apoptosis พบว่าเมื่อยาเข้าจับกับตัวรับเอสโตรเจนจะทำให้การแสดงออกของ *MYC* และ *CyclinD1* ลดลง ซึ่งการลดลงของ *MYC* นี้จะทำให้การทำงานของ *CDKN1A* (เป็นตัวควบคุมการทำงานของ p21) เพิ่มมากขึ้น เกิดการ transcription ตามมา เมื่อมีการลดลงของ cyclin D1-CDK4 ก็จะไม่มีการยับยั้งการทำงานของ p21 และ p27 ทำให้ *CyclinE1* เข้าจับกับ CDK2 และเกิดการกระตุ้นการทำงานได้ โดยการลดลงของ CDK2 และ CDK4 จะป้องกันการเกิดกระบวนการ phosphorylation (P) ของ RB ทำให้ขัดขวางการทำงานของวัฏจักรเซลล์ไม่ให้เข้าสู่ระยะ S ตามมา เป็นผลให้เซลล์ไม่เกิดการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตต่อไป (Musgrove & Sutherland, 2009)

2.3 ขบวนการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (invasion and Metastasis)

การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง โดยมีการทำลาย basement membrane และ extracellular matrix (ECM) เป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการนี้ (Zhang et al., 2014) เซลล์มะเร็งจะมีการทำงานเป็นหลายขั้นตอน เรียกว่าการเกิด invasion-metastasis cascade เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงในระดับของยีนภายในเซลล์เกิดเป็นเซลล์มะเร็งจากนั้นมีการลุกลามผ่าน ECM และ stromal cell layers แพร่กระจายเข้าสู่หลอดเลือด (intravasation) มีการขนส่งผ่านทางหลอดเลือดกระจายไปยังบริเวณต่างๆของร่างกาย แล้วแพร่กระจายผ่านออกจากหลอดเลือด (extravasation) เข้าสู่เนื้อเยื่อและอวัยวะนั้น ไปอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมใหม่ มีการพัฒนาเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดในบริเวณที่อยู่ใหม่ และเริ่มขยายขนาดของเซลล์อีกครั้ง (Fidler, 2003)

กระบวนการลุกลามและการแพร่กระจายนั้นเป็นคุณสมบัติที่สำคัญชนิดหนึ่งของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมกระบวนการเหล่านี้ได้จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วย ดังนั้นการควบคุมการลุกลามและการแพร่กระจายจึงถือเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาโรคมะเร็ง (Yang et al., 2010)

การลุกลามเนื้อเยื่อและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะต้องมีการแสดงออกของ matrix metalloproteinases (MMPs) (Stamenkovic, 2000) MMPs นั้นจะทำให้เซลล์และ ECM ขาดการเชื่อมต่อกันของ intercellular adhesion เป็นผลทำให้เกิดการสลาย (degradation) ของ ECM จึงเกิดการลุกลามของเซลล์มะเร็งไปยังระบบหลอดเลือดและต่อมน้ำเหลือง จะเห็นได้ว่าปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตามมา (Deryugina, Luo, Reisfeld, Bourdon, & Strongin, 1997; Johnson, Dyer, & Hupe, 1998; Liotta, Steeg, & Stetler-Stevenson, 1991)

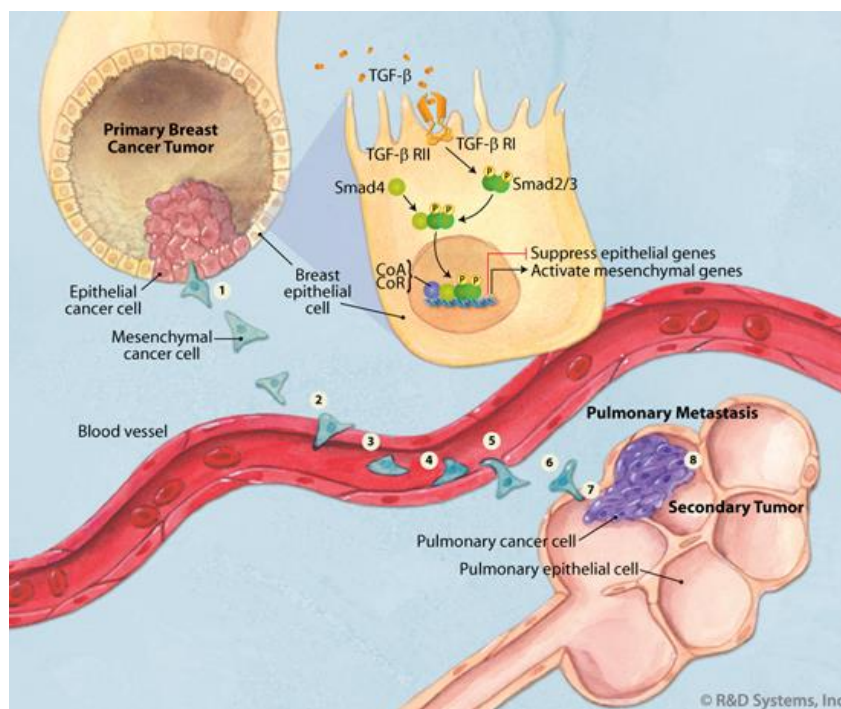
MMPs ถูกสังเคราะห์ออกมาในรูปของ proenzymes และเมื่อหลั่งออกจาก cell จะอยู่ในรูป proenzymes โดยมี MMP-2 และ MMP-9 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลาย collagen ทั้งชนิดที่ 1 ชนิดที่ 4 และ ECM (Johnson et al., 1998; Salo, Makela, Kylmaniemi, Autio-Harmainen, & Larjava, 1994; Westermarck & Kahari, 1999) และพบการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์มะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด เป็นตัวสนับสนุนให้เกิดการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยปกติแล้วมักจะพบการแสดงออกของ MMP-2 ที่มากขึ้นในเซลล์มะเร็งที่มีอัตราการแพร่กระจายสูง (highly metastasis tumor) ในขณะที่ MMP-9 นั้นนอกจากจะพบในเซลล์มะเร็งยังสามารถถูกกระตุ้นได้จาก inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)- α และ epidermal growth factor อีกด้วย (Liabakk, Talbot, Smith, Wilkinson, & Balkwill, 1996) เมื่อได้รับการกระตุ้นแล้ว จะเกิดการทำลาย ECM และเกิดการ

ลูกกลมของเซลล์ผ่านทาง basement membrane เข้าสู่หลอดเลือดและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ต่อไป

หลังจากที่ basement membrane ถูกย่อยสลายด้วย MMPs แล้ว เซลล์มะเร็งสามารถลูกกลมเข้าสู่หลอดเลือดและหลอดน้ำเหลืองแล้วไปยังอวัยวะอื่น (distant metastatic site) โดยอาศัยการจับกันของ C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) กับ ligand ซึ่งพบว่า CXCR4 มีกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์มะเร็งและในอวัยวะที่เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายออกไป (Mukherjee & Zhao, 2013) โดย CXCR4 เป็น chemokine receptor ชนิด G-protein couple receptor (GPCR) ที่ประกอบไปด้วย 7 transmembrane domain พบอยู่บนผิวเซลล์หลายชนิดได้แก่ เซลล์ในระบบต่อมน้ำเหลือง ระบบเลือด เยื่อบุเซลล์ และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น การทำงานของ CXCR4 นั้นจะมี ligand ที่เข้าจับกับ receptor ชื่อว่า CXCL12 ทำหน้าที่เหมือน chemo-attractant ในการชักนำเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ CXCR4 receptor เคลื่อนที่ไปยังอวัยวะต่างๆ นำไปสู่การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การจับกันระหว่าง CXCL12 และ CXCR-4 จะเหนี่ยวนำให้เกิดการส่งสัญญาณ downstream ภายในเซลล์ผ่านหลาย pathway เช่น PI3K และ MEK1/2 ส่งผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการลูกกลมและแพร่กระจายของเซลล์ตามมา (Busillo & Benovic, 2007) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการ overexpression ของ CXCR-4 จำนวนมากในเซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งกระดุกอีกด้วย (Muller et al., 2001)

นอกจากนี้กระบวนการลูกกลมและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ยังเกิดได้จากการเปลี่ยนแปลงเยื่อบุผิวที่เรียกว่ากระบวนการ epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Kalluri & Weinberg, 2009) คือกระบวนการพัฒนาของเซลล์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะขนาด รูปร่าง การเรียงตัวและโครงสร้างของเซลล์ รวมถึงการยึดต่อระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ และเซลล์ต่อเมทริกซ์ ขบวนการ EMT เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยกระบวนการดังกล่าวจะมีความเกี่ยวข้องโดยการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากเซลล์มะเร็งที่เป็นชนิด epithelial cell ที่มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบบริเวณเยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มะเร็งชนิด mesenchymal cell ซึ่งมีลักษณะรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle shape) ที่บริเวณ cytoplasm มีแขนงบางๆ จำนวนมาก โดยเซลล์จะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ออกจากอวัยวะนั้น นำไปสู่การลูกกลมแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งออกจากหลอดเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย กระบวนการ EMT เกิดขึ้นจากการลดลงของ epithelial marker เช่น *E-cadherin* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ หรือมีการแสดงออกของ mesenchymal marker ที่มากขึ้น ได้แก่ *Vimentin* ซึ่งทำหน้าที่เป็น intermediate filament ถ้าหากมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น จะไปกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโต การลูกกลม และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Xu, Lamouille,

& Derynck, 2009) ปัจจุบันพบว่า EMT เข้ามามีบทบาทมากในขบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งนำไปสู่สาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญ โดยกระบวนการ EMT ยังส่งเสริมให้เซลล์หลีกเลี่ยงการเกิดขบวนการ apoptosis และขบวนการ senescence ของเซลล์ได้อีกด้วย



รูปที่ 5 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมผ่านกระบวนการ EMT (Deng et al., 2010)

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมผ่านกระบวนการ EMT เริ่มจาก epithelial cell บริเวณเต้านมมีการเปลี่ยนแปลงเป็น mesenchymal cell ทำให้มีความสามารถในการเคลื่อนที่ ขบวนการ EMT จะถูกเหนี่ยวนำโดยมีฮัยน TGF- β ไปกุดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง epithelium และไปส่งเสริมให้เกิดการสร้างเซลล์ที่มีลักษณะเป็น mesenchymal cell มากขึ้น เกิดเป็น mesenchymal cell ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์มะเร็งเต้านม (mesenchymal-like breast cancer cells) ลูกกลมไปยังปอด และมีการเจริญเติบโตเป็นก้อนมะเร็งภายในปอดตามมา โดยมี ขั้นตอนดังนี้คือ 1) เซลล์เกิดขบวนการ EMT 2) mesenchymal cell มีการแพร่กระจายเข้าไปยัง หลอดเลือด 3) เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ไปตามหลอดเลือด 4) เซลล์ยึดติดกับหลอดเลือดบริเวณ ตำแหน่งใหม่ 5) มีการแพร่กระจายของเซลล์ออกจากหลอดเลือด 6) มีการลูกกลมของเซลล์ไปยัง อวัยวะใหม่ 7) เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก mesenchymal cell ไปเป็นเซลล์ epithelial cell 8) เกิด

การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่อวัยวะใหม่ (Deng et al., 2010; Santibanez, Kocic, Fabra, Cano, & Quintanilla, 2010)

2.4 แนวทางการรักษามะเร็งเต้านม (Treatment of breast cancer)

มะเร็งเต้านมเริ่มรักษาโดยการผ่าตัดเป็นอันดับแรก และส่วนมากต้องการการการรักษาวิธีอื่นร่วมด้วยเพื่อเสริมให้ผลการรักษาดีขึ้น เช่น เริ่มการรักษาโดยการผ่าตัด เมื่อแผลหายจึงให้ยาเคมีบำบัดและการฉายแสงรวมกับการให้ยาด้านฮอร์โมน ทั้งนี้ขึ้นกับระยะของโรค คุณสมบัติของมะเร็งรวมถึงวิธีการผ่าตัด (Head neck and breast surgery siriraj hospital, 2012)

วิธีการรักษามะเร็งเต้านมที่ได้ผลดีและเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบันมีอยู่ 5 วิธีคือ

1. การรักษาโดยการผ่าตัด (surgery)

เป็นวิธีการรักษาหลักสำหรับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะเริ่มแรก ซึ่งมีประโยชน์ในการควบคุมโรคและสามารถนำชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดไปตรวจทางพยาธิวิทยา ทำให้ทราบระยะที่แท้จริงของโรค ช่วยวางแผนการรักษาที่เหมาะสมและสามารถพยากรณ์โรคได้แม่นยำมากขึ้น

2. การรักษาโดยการฉายแสง (radiotherapy)

เป็นวิธีการรักษาเสริม (adjuvant therapy) จากการผ่าตัด เป็นการใช้เครื่องมือพิเศษที่สามารถปล่อยอนุภาครังสีที่มีพลังงานสูงเพื่อไปหยุดยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งรังสีนี้จะไปทำลายทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วมาก ดังนั้นจึงจะถูกทำลายมากกว่า และนอกจากนั้นเซลล์ปกติยังมีคุณสมบัติที่จะสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลายไปแล้วได้ จึงทำให้เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ยังคงรูปร่างและทำงานได้ตามปกติ

3. การรักษาโดยใช้ยาด้านฮอร์โมน (endocrine therapy)

การรักษาโดยใช้ยาด้านฮอร์โมนนี้ จะมุ่งเน้นการรักษาไปที่ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ที่พบการแสดงออกของ ER ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมถึงร้อยละ 70 ยาที่ใช้ในการรักษาจะถูกพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยลดระดับของเอสโตรเจน และยับยั้งการส่งสัญญาณผ่านทาง ER ในเซลล์มะเร็งเต้านม ยาด้านฮอร์โมนแบ่งประเภทได้ดังนี้

- selective estrogen modulators (SERMs)

SERMs เป็นกลุ่มของยาที่ออกฤทธิ์เป็น agonist และ antagonist ต่อเอสโตรเจนในเนื้อเยื่อ บางตำแหน่ง โดยออกฤทธิ์ antagonist ต่อเต้านม ยากลุ่มนี้ได้แก่ tamoxifen และ raloxifene โดย ยากลุ่ม SERMs จะออกฤทธิ์แข่งขันกับเอสโตรเจนในการเข้าจับกับ ER และไปยับยั้งการทำงานของ ER เมื่อยา tamoxifen เข้าจับกับ ER จะเหนี่ยวนำให้เกิดการ dimerization เปลี่ยนตำแหน่งของ helix 12 ทำให้ co-activator binding groove เปลี่ยนไป เกิดการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง AF2-dependent กับ co-activator และไปส่งเสริมการทำงานของ co-repressors กล่าวได้ว่า tamoxifen ไปยับยั้งการทำงานของ AF2 และการ transcription ของยีนต่างๆ ที่ต้องทำงานผ่านทาง AF2 (Kumar et al., 1987) ทำให้เซลล์มะเร็งไม่เกิดการเจริญเติบโต

- aromatase inhibitor (AIs)

เอนไซม์อโรมาเทสทำหน้าที่ในการเปลี่ยน androstenedione และ testosterone ให้เป็น estrone และ estradiol ตามลำดับ เมื่อได้รับยากลุ่ม AIs ยาจะไปยับยั้งเอนไซม์อโรมาเทส ทำให้ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง การส่งสัญญาณผ่านทาง ER ในเซลล์มะเร็งเต้านมก็จะลดลงไปด้วย ยกตัวอย่างเช่น anastrozole เป็นต้น

- selective ER down-regulators (SERDs)

ยาในกลุ่ม SERDs มีลักษณะโครงสร้างของยาคู่คล้ายกับ 17β -estradiol ยากลุ่มนี้ได้แก่ fulvestrant ออกฤทธิ์เป็น antagonist เข้าจับกับตัวรับเอสโตรเจน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ยา fulvestrant ทำให้ตัวรับเอสโตรเจนถูกทำลายเพิ่มมากขึ้นผ่านทาง ubiquitin-proteasome pathway อีกด้วย ซึ่งทั้งหมดดังกล่าวนี้ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ตามมา

การรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนนั้น จะมียา tamoxifen เป็นยาพื้นฐานที่นิยมใช้ในการรักษาทั้งในระยะเริ่มต้นและระยะที่มีการลุกลาม (advanced breast cancer) (Osborne, 1998) อย่างไรก็ตามพบว่าเกือบ 50% ของผู้ป่วยระยะลุกลามที่เริ่มต้นรักษาด้วยยา tamoxifen เป็นยาชนิดแรก ไม่มีการตอบสนองต่อยาตั้งแต่เริ่มต้นรักษา (de novo resistance) และยังมีผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่เริ่มต้นรักษาด้วยยา tamoxifen และเกิดการดื้อต่อยาในภายหลัง (acquired resistance) (Gradishar, 2004; Ring & Dowsett, 2004) การตอบสนองที่แตกต่างกันของผู้ป่วยเกิดจากการแสดงออกของโมเลกุลที่ส่งสัญญาณไปตาม pathway นั้นต่างกัน ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้ใช้เป็น biomarker ที่จะทำนายการเกิดการดื้อต่อยาได้ (Beelen,

Zwart, & Linn, 2012) มีการนำยาในกลุ่ม Als มาใช้รักษาโรคมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น หรือหลังจากผู้ป่วยได้รับยา tamoxifen ไประยะหนึ่งแล้ว โดยฤทธิ์การรักษาเมื่อให้ยา tamoxifen และกลุ่ม Als ร่วมกันพบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าการให้ยา tamoxifen เพียงชนิดเดียวในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดต่อยา tamoxifen แต่อย่างไรก็ดีการตอบสนองของผู้ป่วยมีมากกว่าเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยยา tamoxifen เพียงชนิดเดียวในผู้ป่วยระยะลุกลามที่พบมีการติดต่อยา (Arimidex et al., 2008; Brodie & Sabnis, 2011; Strasser-Weippl & Goss, 2005) เมื่อไม่นานมานี้จึงมีการนำยา fulvestrant (SERD) มาใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดต่อยา tamoxifen และยา กลุ่ม Als พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในทางคลินิก (Howell et al., 2004; Robertson et al., 2003) แต่ก็ยังมีผู้ป่วยบางส่วนที่ไม่ตอบสนองต่อยา fulvestrant

เนื่องจากยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ยังมีอยู่น้อยและไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดติดต่อยาต้านฮอร์โมนและในระยะที่ลุกลาม ดังนั้นการค้นหาคำใหม่เพื่อที่จะมาช่วยยับยั้งการติดต่อยาต้านฮอร์โมนจึงเป็นสิ่งสำคัญ

4. การรักษาโดยยาเคมีบำบัด (chemotherapy)

คือการใช้ยาที่มีคุณสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ยากลุ่มนี้จะใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนเป็นหลัก โดยยาดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ได้ทั่วร่างกาย ต่างจากการผ่าตัดที่ได้ผลเฉพาะบริเวณที่ผ่าตัดเท่านั้น ยาเคมีบำบัดนี้นอกจากจะทำลายเซลล์มะเร็งแล้ว ยังอาจมีผลต่อเซลล์ปกติของร่างกายที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เช่น ไขกระดูก (ซึ่งจะเป็นตัวสร้างเม็ดเลือดและเกล็ดเลือด) เยื่อบุทางเดินอาหาร ผมหงอก และระบบสืบพันธุ์ (รังไข่) เซลล์ดังกล่าวบางส่วนจะถูกทำลายไปด้วยทำให้เกิดผลข้างเคียงตามมา แต่เนื่องจากเซลล์ปกติมีคุณสมบัติที่สามารถสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนได้ ดังนั้นผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นก็มักจะเกิดเพียงชั่วคราว เมื่อเสร็จสิ้นการรักษาแล้วทุกอย่างก็จะกลับมาใกล้เคียงปกติ โดยยาเคมีบำบัดที่นิยมใช้ ในปัจจุบันได้แก่ doxorubicin, taxane (paclitaxel, docetaxel), capecitabine, gemcitabine เป็นต้น (The national comprehensive cancer network, 2014)

5. การรักษาโดยยาที่มีการออกฤทธิ์จำเพาะ (targeted Therapy)

ยาในกลุ่มนี้จัดเป็นยากลุ่มใหม่ เช่น ยาด้าน HER-2 ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากยากลุ่มที่ผ่านมา กล่าวคือเซลล์มะเร็งเต้านมบางชนิดจะมีตัวรับสัญญาณ HER-2 อยู่ที่ผิวเซลล์ ทำให้สามารถใช้ยาดังกล่าวเพื่อจับกับตัวรับสัญญาณเหล่านี้และให้ยาออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ ดังนั้นเซลล์อื่นๆที่ไม่มีตัวรับสัญญาณก็จะไม่ได้รับผลกระทบจากยากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายาใน

กลุ่มนี้จะเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดี รักษาได้ค่อนข้างเฉพาะเจาะจง มีผลข้างเคียงน้อย แต่ก็มีข้อจำกัดที่สามารถใช้ได้กับผู้ป่วยบางรายที่มีการแสดงออกของ *HER-2* เท่านั้น (*HER-2* positive) นอกจากนี้ยายังมีราคาแพงมาก ทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับการเลือกใช้ในกลุ่มนี้ (Zilli et al., 2009)

2.5 กลไกการดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน (mechanism of endocrine resistance)

ปัญหาที่พบหลังจากให้การรักษาด้วยยากลับด้านฮอร์โมนเป็นระยะเวลานาน คือผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีการพัฒนาของโรคจนเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้รักษา ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีความสามารถในการอยู่รอด เจริญเติบโต มีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณอื่น และสุดท้ายเกิดการแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยการดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนที่ใช้รักษานั้นพบได้จากการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมนทั้ง 3 กลุ่ม โดยกลไกสามารถแบ่งออกได้เป็นดังนี้ (Zilli et al., 2009)

2.5.1 การเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีผู้ป่วยที่ดื้อต่อยา tamoxifen เพียง 17%-28% เท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจนเกิดขึ้น (Zilli et al., 2009) การเปลี่ยนแปลงนี้ได้แก่

2.5.1.1 ลดการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา ($ER\alpha$)

2.5.1.2 เกิดการกลายพันธุ์ของตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา เช่นการเกิด point mutation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีนจาก tyrosine เป็น aspartate ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 351 (D351Y) ทำให้เซลล์ MCF-7 เกิดการดื้อต่อยา tamoxifen ที่ใช้รักษา

2.5.1.3 การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบต้า ($ER\beta$) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบต้า มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม อีกทั้งการแสดงออกนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อของยาในกลุ่ม SERMs อีกด้วย เช่น การแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบต้า ในปริมาณที่สูงนั้นจะพบในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อต่อยา tamoxifen

2.5.2 เกิดจากสภาพแวดล้อมภายในเซลล์

2.5.2.1 การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ co-regulators เป็นที่ทราบว่า โปรตีน co-regulators นั้นมีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำให้เกิดการ transcription ของตัวรับเอสโตรเจน หากมีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกหรือการทำงาน จะมีผลต่อการส่งสัญญาณของตัวรับเอสโตรเจน เช่น การเกิด overexpression ของ co-activators และ/หรือ การ down-regulation ของ co-repressors จะไปลดฤทธิ์ของการรักษา

ตัวยาคต้านฮอร์โมน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยากลุ่ม SERMs ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อบทบาทของเอสโตรเจนต่อมะเร็งเต้านม

ER coregulator proteins

ทาม็อกซิเฟนทำหน้าที่เป็น ER antagonist ในมะเร็งเต้านม แต่เป็น agonist ต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ในกระดูก ระบบหลอดเลือดและหัวใจ ฤทธิ์ที่แตกต่างของทาม็อกซิเฟนนี้สามารถอธิบายได้จากหลายๆ กลไกด้วยกัน หนึ่งในกลไกที่กล่าวมานี้ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ coregulatory proteins (coactivators และ corepressors) ที่สามารถควบคุมการ transcription ของ ER ได้ (Jordan & O'Malley, 2007; Smith, Nawaz, & O'Malley, 1997)

2.5.2.1.1 the nuclear receptor activator (*NcoA*) เป็นหนึ่งใน proto-oncogene ที่พบว่ามี การ overexpression มากกว่า 30% และมี genetically amplified ใน 5%–10% ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Anzick et al., 1997; Lydon & O'Malley, 2011; Murphy et al., 2000) โดย ER co-activators ในระดับสูงสามารถเพิ่มฤทธิ์ estrogen-agonist ใน tamoxifen และสามารถทำให้เกิดการดื้อต่อยา tamoxifen ได้ (Kressler, Hock, & Kralli, 2007) การแสดงออกของ nuclear receptor coactivator 3 (*NcoA3*) มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลงในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Harigopal et al., 2009) กล่าวได้ว่าการลดระดับ *NcoA3* หรือการขัดขวางการเข้าจับกันของ *NcoA3* และ ER จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการ restore sensitivity ของเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน (L. H. Wang et al., 2006) จากการศึกษาในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนที่ได้รับยา tamoxifen พบว่ามี การ expression ของโปรตีน *NcoA1*, *NcoA2* และ *NcoA3* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในผู้ป่วยที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมปกติ (Redmond et al., 2009)

จากการศึกษาของ Han และคณะในปี 2007 พบว่ายีน *MACROD2* มีการทำงานคล้ายกับ ER co-activator ในเซลล์ MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน) เมื่อเกิดการ overexpression ของยีน *MACROD2* จึงเสมือนเป็นการเพิ่มการทำงานของ co-activator ทำ

ให้เกิดการ transcription ของยีน และเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Han et al., 2007) Mohseni และคณะในปี 2014 ได้ทำการศึกษาทางคลินิกโดย นำเซลล์มะเร็งเต้านมของผู้ป่วยมาทดสอบการแสดงออกของยีน *MACROD2* พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นมากในเซลล์มะเร็งเต้านมของผู้ป่วยที่ดื้อต่อ ยา tamoxifen และมีผลไปเหนี่ยวนำให้เกิด estrogen independent growth แม้แต่ในผู้ป่วยที่ยังไม่มีการลุกลามของมะเร็งเต้านม ก็พบการแสดงออกของยีน *MACROD2* เช่นกัน ซึ่งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี อัตราการรอดชีวิตต่ำ และได้ทำการศึกษาโดย overexpression ยีน *MACROD2* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยา tamoxifen พบว่าเมื่อได้รับยา tamoxifen เซลล์ถูกกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตมากยิ่งขึ้น และเมื่อทำการ knock down ยีน *MACROD2* พบว่ามีการลดฤทธิ์การดื้อต่อยา tamoxifen (reverse tamoxifen resistant) (Mohseni et al., 2014) จากข้อมูลการวิจัยดังกล่าว จึงเป็นปัจจัยใหม่ที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาถึงบทบาทการเกิดการดื้อยา อันนำไปสู่การคิดค้นยาใหม่สำหรับการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

2.5.2.1.2 **the nuclear receptor corepressor (*NcoR*)** เป็นปัจจัยสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาทาม็อกซิเฟน (Cottone, Orso, Biglia, Sismondi, & De Bortoli, 2001; Girault et al., 2003) ยีนที่อยู่ในกลุ่ม co-repressor ได้แก่ *NcoR1* และ *NcoR2* เป็นต้น ซึ่งเป็น transcriptional co-repressor ทำงานโดยการเข้าจับกับ ER ที่ตำแหน่ง target promoter ลดการ transcription และการแสดงออกของยีนที่จะนำไปสู่การเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยจะพบการแสดงออกของ *NcoR1* ที่ลดลงในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด acquired resistance tamoxifen (Lavinsky et al., 1998) จากการวิจัยทางคลินิกพบว่าผู้ป่วยที่มีการพยากรณ์โรคดีจะมีการแสดงออกของ *NcoR1* ในระดับสูง (Kurokawa et al., 2000) การเพิ่มการส่งสัญญาณของ estrogen independent growth factor เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาเป็นเวลานานนั้น ร่างกายจะได้รับเอสโตรเจนน้อยลง ส่งผลให้เกิด negative feedback ตามมาเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ร่างกายจึงมีการตอบสนองโดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีความไวต่อตัวรับเอสโตรเจนมากขึ้น เพื่อที่จะคงสภาพให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ตามปกติ การ overexpression และการ

กระตุ้นการทำงานของ growth factor receptor เช่น *EGFR*, *HER2* และ *IGF1R* นั้น จะทำให้เกิดการ proliferation และมีการอยู่รอดของเซลล์ผ่านทาง การส่งสัญญาณ *MAPK* และ *PI3K/AKT* signaling pathways ในผู้ป่วย มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน (Nicholson et al., 2007)

ปัจจัยอื่นๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาต้านฮอร์โมน เช่น การกระตุ้น *MEK* และ *ERK* ผ่านทาง *MAPK* signaling (Musgrove & Sutherland, 2009) จาก การศึกษาของ Bergqvist และคณะอธิบายว่า *MAPKs* เป็น signal transducers downstream ของ *HER2* และมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen ผ่านทาง กระบวนการ crosstalk ระหว่าง growth factor signaling และ estrogen receptor α (*ER α*) โดยมีการทำงานผ่าน extracellular signal-regulated kinase (*ERK1/2*) และพบว่าเมื่อกระตุ้นการ phosphorylation *ERK1/2* สัมพันธ์กับการเพิ่มอัตราการรอดของชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการรักษาด้วยยา tamoxifen อีกด้วย (Bergqvist et al., 2006)

นอกจากนี้ยังพบการส่งสัญญาณผ่านทาง pathway ของ nuclear factor κ B (*NF- κ B*), *KGF*, *PDGF/Abl* (Al Saleh et al., 2011; Weigel et al., 2012; Zhou et al., 2007) โดย *NF- κ B* จะมีการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยการเหนี่ยวนำยีน เช่น *Cyclin D1* และ *uPA* (Nakshatri, Bhat-Nakshatri, Martin, Goulet, & Sledge, 1997) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการ แสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน เมื่อได้รับทาม็อกซิเฟนจะสามารถกระตุ้นการทำงานของ *NF- κ B* เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์และเพิ่มความมีชีวิตอยู่รอด นำไปสู่การพัฒนา เป็นเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนในที่สุด (Biswas, Singh, Shi, Pardee, & Iglehart, 2005; Sas et al., 2012)

2.5.2.2 การเปลี่ยนแปลงของ cell cycle signaling molecule โดยการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่ มีบทบาทในการควบคุม cell cycle ในระยะ G1 phase ภายในเซลล์ เช่นการเพิ่มขึ้น ของ positive regulator และการลดลงของ negative regulator อาจเป็นสาเหตุหนึ่ง ที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านฮอร์โมน โดยมีผลต่อการยับยั้ง anti-proliferative effect ของ endocrine therapy จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *Cyclin D1* ซึ่งเป็น positive

regulator มีบทบาทสำคัญในการทำงานของวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G1 phase และ *c-MYC* ที่เป็น transcription factor มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ p21 ซึ่งมีหน้าที่ในการเป็น negative regulator ของ cell cycle เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา tamoxifen ลดลง (Mukherjee & Zhao, 2013; Osborne, 1998; Schiff et al., 2004; Varma et al., 2007) นอกจากนี้ *Cyclin D1* และ *c-MYC* ยังเป็นสมาชิกของ ER target gene ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีนทั้งสองชนิด จะมีผลทำให้เกิดการกระตุ้น cell cycle การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการรอดของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นหากมีการยับยั้งการทำงานของทั้ง 2 ยีนนี้ จึงเป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมได้

2.5.3 การเปลี่ยนแปลงทาง metabolism ของฮอร์โมน

การเปลี่ยนแปลงทาง pharmacogenomics เช่นการมี CYP2D6 ที่ต่ำหรือไม่มีจะทำให้การรักษาด้วยยาทาโมอกซิเฟนเปลี่ยนไป

จากการศึกษาที่ผ่านมา สามารถสรุปบทบาทการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการดื้อยาทาโมอกซิเฟน และการเกิดการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์ได้ดังนี้

Genes related to tamoxifen resistance	Expression in tamoxifen resistance	Mechanism of tamoxifen resistance
<i>NcoA1</i> <i>NcoA3</i>	↑	Up-regulation of co-activator in ER transcription
<i>NcoR1</i> <i>NcoR2</i>	↓	Down-regulation of co-repressor in ER transcription
<i>MACROD2</i>	↑	Increased ER independent growth factor
<i>MMP-9</i>	↑	Increased invasion and metastasis
<i>CXCR4</i>	↑	Increased invasion and metastasis

<i>E-cadherin</i>	↑	Increased invasion and metastasis
<i>Vimentin</i>	↑	Increased invasion and metastasis
<i>c-MYC</i>	↑	Increased cell proliferation

ตารางที่ 1 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา tamoxifen และการลุกลามแพร่กระจายของเซลล์ (Zilli et al., 2009)

2.6 อาร์เทมิซินิน (ART) และไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (DHA)

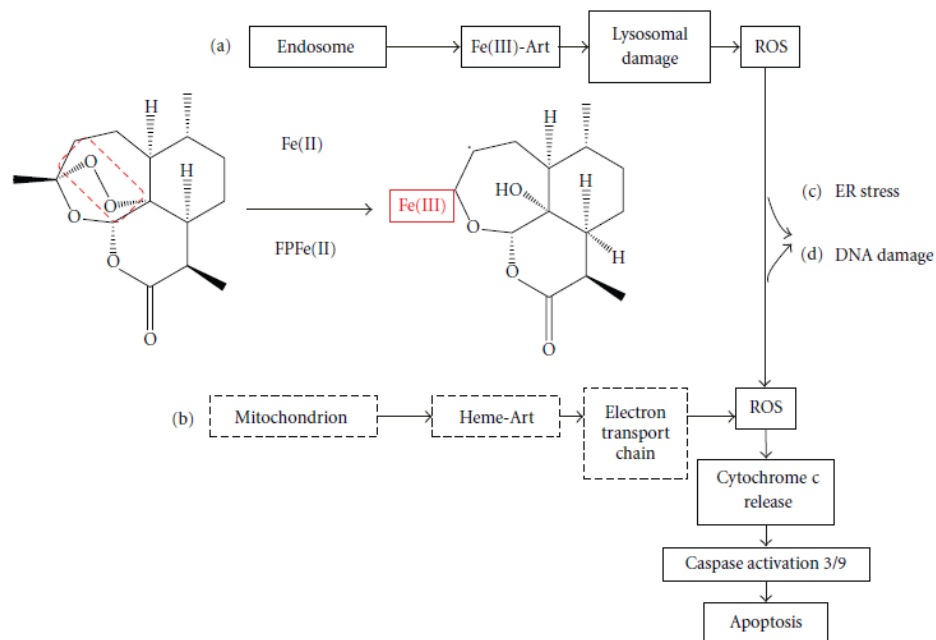
อาร์เทมิซินิน (artemisinin หรือ ART) เป็นสารกึ่งสังเคราะห์จากพืช *Artemisia annua* L. มีโครงสร้างเป็น sesquiterpene lactone มีการใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคมาลาเรีย โดยจะออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบว่าดื้อต่อยารักษามาลาเรียในปัจจุบัน (Dhingra, Vishweshwar Rao, & Lakshmi Narasu, 2000; Meshnick, 2002; O'Neill, 2004; White, 2004) อนุพันธ์ของ ART ได้แก่ dihydroartemisinin, artemether, artesunate และ arteether เป็นต้น โดยสารทุกตัวมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียเช่นกัน และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งรังไข่และเซลล์มะเร็งตับ (Efferth et al., 2004; Lai & Singh, 1995, 2006; Wu, Zhou, & Wu, 2004) กลไกการออกฤทธิ์ของ ART ต่อเซลล์มะเร็งคือสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดย ART ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติในร่างกายของมนุษย์

อนุพันธ์ของ ART จะถูก hydrolyzed เปลี่ยนแปลงเป็น active metabolite ที่มีชื่อว่า ไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (dihydroartemisinin หรือ DHA) เป็นสารออกฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย โดยพบว่า DHA เป็นสาร metabolite หลักของ ART มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียและฤทธิ์ต้านมะเร็งที่สูงกว่าอนุพันธ์ชนิดอื่นๆ ของ ART โดยมีการกระจายตัวได้ดีในน้ำ มีการดูดซึม และคงตัวสูงในการทดสอบทางคลินิกเมื่อเปรียบเทียบกับ artesunate, arteether และ artemether (Whirl-Carrillo et al., 2012)

2.6.1 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer effects)

กลไกการทำงานของ ART ในการต้านเซลล์มะเร็งโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis นั้น เริ่มจาก serum iron เข้าจับกับ transferrin เกิดเป็น complex ระหว่าง transferrin และ receptor จากนั้นเคลื่อนตัวเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis มีการสร้าง

ตัวเป็น vesicle ที่เรียกว่า endosome โดยค่า pH ภายใน endosome นั้นจะลดต่ำลงและมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.5 การเป็นกรดนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่าง (conformational change) ของ transferrin และเกิดการหลั่งของ Fe(III) (Lai & Singh, 1995) iron activated-artemisinin สร้าง carbon-centered radicals ที่ไปเหนี่ยวนำให้เกิด lysosomal disruption และสร้าง ROS ทำให้เกิดความเสียหายต่อ mitochondria เกิดการกระตุ้นการทำงานของ caspases และทำให้เกิดการตายของเซลล์ตามมา ระดับการแสดงออกของ transferrin receptor นั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์ เซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัว (Non-dividing cells) จะพบมีการแสดงออกของ transferrin receptor ต่ำ ในขณะที่เซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วจะมีการแสดงออกของ transferrin receptors มากถึง 100,000 receptor ต่อเซลล์ (Gomme, McCann, & Bertolini, 2005) การเข้าทำงานของ ART นั้นยังสามารถเกิดได้จากการมี heme หรือ heme bound protein สร้าง cytotoxic carbon-centered radicals ใน mitochondria การดึงเข้าหากันนี้จะไปรบกวนการทำงานของ electron transfer chain (ETC) โดยเกิดปฏิกิริยากับ heme หรือ heme-bound proteins นำไปสู่การสร้าง ROS และเกิดการตายแบบ apoptosis ตามมา และ ROS นี้จะเป็นตัวไปเหนี่ยวนำให้เกิด endoplasmic reticulum stress และ genotoxicity ตามมาในภายหลัง



รูปที่ 6 แสดงกลไกการทำงานของ Artemisinin ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis (Crespo-Ortiz & Wei, 2012)

ในการศึกษาเซลล์ HTB 27 cells ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อการรักษาด้วยวิธีฉายรังสี พบว่าหลังจากได้รับ DHA ความเข้มข้น 200 μM ร่วมกับ holo-transferrin ปริมาณ 12 μM เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง 2% เมื่อทดสอบด้วยวิธีการเดิมเปรียบเทียบกับเซลล์ HTB 125 ซึ่งเป็นเซลล์เต้านมปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดสอบด้วยสาร DHA เพียงชนิดเดียว การเกิดความเป็นพิษน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (Lai & Singh, 2006)

การศึกษาของ Moore และคณะในปี 1995 เมื่อให้ DHA และ ferrous sulfate ทางปากในหนูขาวที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งชนิด fibrosarcoma ไว้ พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งชนิด fibrosarcoma โดยมีขนาดลดลงถึง 30% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Moore et al., 1995) Lai และ Singh ในปี 2006 ได้รายงานถึงผลของ ART ในการป้องกันมะเร็งเต้านมในหนูขาวที่ได้รับ 7,12-dimethylbenz [a]anthracene (DMBA) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งเต้านม ผลการทดสอบพบว่าหนูที่ได้รับ ART เป็นเวลา 40 สัปดาห์ ไม่เกิดการพัฒนาเป็นมะเร็งเต้านม 43% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ในหนูที่ได้รับ DHA และมีการพัฒนาไปเป็นก้อน tumor นั้น ขนาดของก้อน tumor มีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Lai & Singh, 2006)

Weifeng และคณะในปี 2011 ศึกษาถึงฤทธิ์ของ ART ในการยับยั้งการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับ พบว่า ART มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์ได้ดีขึ้นเมื่อมีการเพิ่มเวลาจาก 24 ชั่วโมงไปเป็น 72 ชั่วโมง โดยมีการลดระดับการแสดงออกของ MMP2 metalloproteinase และ TIMP2 และยังมีฤทธิ์กระตุ้น Cdc42 ทำให้เกิดการเพิ่มการทำงานของ E-cadherin จึงทำให้เกิด cell-cell adhesion มากขึ้น และลดการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ (Weifeng et al., 2011)

การศึกษาของ Wei Hu และคณะในปี 2014 แสดงให้เห็นว่า DHA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด autophagy ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ผ่านทางการ repression ของ *NF- κ B* โดยการยับยั้ง *NF- κ B* เป็นผลให้เกิดการเกาะกลุ่มของ reactive oxygen species (ROS) และเกิด autophagy ตามมา นำไปสู่หลักฐานที่ว่า DHA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดได้ (Hu, Chen, Zhang, Lou, & Zhou, 2014)

Jin-Jian Lu และคณะในปี 2010 ทำการศึกษาถึงการทำลาย (degradation) และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของ *c-MYC* oncoprotein ของเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ *c-MYC* พบว่า DHA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ HL-60 (human promyelocytic leukemia cells) และ HCT-116 (human colon carcinoma) ที่มีการแสดงออกของ *c-MYC* ในปริมาณที่สูง ในขณะที่เดียวกันเมื่อทำการ knockdown *c-MYC* กลับพบว่าฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ HCT-116 หายไป แสดง

ให้ให้เห็นว่า *c-MYC* มีผลต่อการเกิด apoptosis และเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการทำนายฤทธิ์ของ antitumor (J. J. Lu et al., 2010)

จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Shuqun Z. และคณะในปี 2014 ถึงผลของ DHA ต่อขบวนการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (ชนิด ER negative, highly invasive breast cancer cell line) เริ่มจากศึกษาการ expression ของ urokinase-type plasminogen activator (*uPA*) ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่มีการแสดงออกในกระบวนการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์และการเกิด hydrolysis ของ basement membrane และ ECM เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 พบว่าเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตตามความเข้มข้นของยา โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA การออกฤทธิ์ของ DHA จะเพิ่มมากขึ้น จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการเกิด migration โดยการใช้วิธี cell scratch migration assay พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น เซลล์มีการเคลื่อนตัวได้ระยะทางที่สั้นลง แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดแพร่กระจาย (MDA-MB-231) (Zhang et al., 2014)



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารทดสอบ

- ไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (Dihydroartemisinin, Sigma, USA)

3.1.2 สารเคมี และชุดทดสอบ

- อาหารเลี้ยงเซลล์เอ็มอีเอ็ม (Minimum essential medium eagle; MEM, Gibco, USA)
- อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM, Gibco, USA)
- อาหารเลี้ยงเซลล์ไอเอ็มอีเอ็ม (Phenol red-free improved minimum essential medium eagle; IMEM, Gibco, USA)
- เพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซิน (Penicillin/Streptomycin, Gibco, USA)
- แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B, Gibco, USA)
- ซีรัมจากฟetusวัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)
- ซีรัมจากฟetusวัวชนิดชาโคลเด็กซ์แทรนสตริป (Charcoal-dextran stripped FBS, Gibco, USA)
- สารละลายอินซูลิน (Recombinant human insulin zinc solution, Gibco, USA)
- ทริปซิน (0.25% Trypsin/EDTA, Gibco, USA)
- สารละลายทริปแพนบลู (0.4% Trypan blue solution, Sigma, USA)
- ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO, Sigma, USA)
- เอ็มทีที (Thiazolyl blue tetrazolium bromide; MTT, Sigma, USA)
- แมทริเจลชนิดลดโกรทแฟคเตอร์ (Growth factor reduced Matrigel® basement membrane matrix, BD Biosciences, USA)
- สารละลายฟอมาลดีไฮด์ 37% (Formaldehyde solution, Sigma, USA)
- คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet dye, Sigma, USA)
- ไตรซอล (TRIZOL® Reagent, Invitrogen, USA)
- ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate; DEPC, Molekula, UK)
- เอทานอล (Ethanol, Merck, Germany)

- คลอโรฟอร์ม (Chloroform, Merck, Germany)
- ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, Merck, Germany)
- ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (Improm-II™ reverse transcription system, Promega, USA)
- เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq DNA Polymerase, Invitrogen, USA)
- สารละลายดีเอ็นเอทีพี (Deoxynucleotide (dNTP) solution mix, Vivantis, Malaysia)
- โอลิโกไพรเมอร์ (Oligo (dT) 15 primer, Vivantis, Malaysia)
- ตัวยับยั้งอาร์เอ็นเอส (Recombinant RNasin® RNase inhibitor, Vivantis, Malaysia)
- โหลดดี้ง ดายน์ (6X loading dye, Vivantis, Malaysia)
- ไพร์เมอร์สำหรับยีน *GAPDH*, *MMP-9*, *CXCR4*, *uPA*, *MACROD2*, *Nc0A3*, *VIMENTIN*, *E-cadherin* (Primer, Wardmedic, THAILAND)
- แลตเตอร์ (VC 100 bp plus DNA ladder, Vivantis, Malaysia)
- ผงอะกาโรส (Agarose LE grade, Vivantis, Malaysia)
- เอทีเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide (ErBr) solution, Sigma, USA)
- ยาพาม็อกซิเฟน (4-hydroxytamoxifen, Sigma, USA)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ย่นที่ปราศจากเชื้อ (Sterile phosphate buffer saline; PBS)
- น้ำกลั่น (distilled water)

3.1.3 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์

- ตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator, Thermo Scientific, USA)
- ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar flow hood, Labconco, USA)
- เครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลท (Microplate reader, MTX Lab Systems, USA)
- เครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรม (Nanodrop, Thermo electron corporation, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Alc, UK)
- เครื่องเขย่าไฟฟ้า (Vortex, Scientific Industries, USA)
- ไปเปตต์ (pipette, Gilson, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge, Hettich zentrifugen, Germany)

- เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer, Hausser Scientific, Germany)
- แผ่นปิดนับจำนวนเซลล์ (Coverslips, Menzel Glaser, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง (Light Microscope, Carl Zeiss, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงแบบเฟส คอนทราสต์ (Phase contrast light microscope, Nikon, Japan)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction; PCR, PCR system, Biometra, Germany)
- เครื่องแยกปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน (Horizontal Electrophoresis apparatus, BioRad, USA)
- เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (Real-time Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR, BIO-RAD, Singapore)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ของสาร (pH-meter, Knick, Germany)
- จานเลี้ยงเซลล์ชนิดทรานส์เวลล์ (Transwell 24-well plates, Corning, USA)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette, Bio lab, USA)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tubes, Corning, USA)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube, Corning, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube, Corning, USA)
- ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับไปเปตต์ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (disposable pipette tip, Corning, USA)
- จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6, 24 และ 96 หลุม (6, 24 and 96-wells plate, Corning, USA)
- จานเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 25 (T25 tissue culture flasks, Corning, USA)
- ขวดแก้วขนาด 100, 250, 500, 1000, 2000 มิลลิลิตร (Glass bottle, Brand, USA)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Estrogen receptor positive breast cancer cell line) จาก ATCC (Cat. #HTB-22™) และเซลล์ MCF-7/LCC-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.โรเบิร์ต คลาก (Dr. Robert Clarke) ศูนย์การแพทย์มหาวิทยาลัยจอร์จทาวน์ รัฐวอชิงตันดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย Minimum essential medium eagle (MEM) ที่มี 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด T25 เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยงประมาณ 80-90% จึงทำการ subculture

3.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของ DHA ต่อเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 โดยวิธี MTT assay

การศึกษาความเป็นพิษของ DHA ต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay เพื่อทดสอบ cell viability โดยการวัดความสามารถของ mitochondrial enzyme ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) ที่มีสีเหลืองให้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีน้ำเงินอมม่วง และละลายผลิตภัณฑ์ด้วย DMSO และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

วิธีการทดสอบ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 ที่ความหนาแน่น 5,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 96-well plate จากนั้นนำไปบ่มใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติม DHA ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ M ตามลำดับ โดยมี 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นนำไปบ่มใน CO₂ incubator ต่อเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาจึงเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ในสารละลาย PBS ปริมาตร 10 μ l ลงในแต่ละหลุม
4. บ่มไว้ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาจึงดูดสารละลายทั้งหมดออกจาก 96-well plate และเติม DMSO จำนวน หลุมละ 100 μ l เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ formazan

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหาค่า % cell viability จากสูตร

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

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการ treatment ด้วย complete MEM

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการ treatment ด้วย DHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นคำนวณหาค่า IC50 เพื่อเลือกความเข้มข้นของ DHA ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.3 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการ migration โดยวิธี scratch assay

การศึกษานี้ใช้เพื่อศึกษาการเกิด migration ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC-2 ในลักษณะ monolayer หลังจากทำให้เกิดบาดแผล โดยการเกิด migration ของเซลล์นี้จะทำให้ทราบถึงบทบาทการ metastasis ของเซลล์มะเร็งเต้านมในเบื้องต้นอีกด้วย แต่อย่างไรก็ดีการทำ การทดลองนี้เป็นเพียงการคัดกรองเบื้องต้นว่าสารมีผลต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์หรือไม่ เมื่อพบว่า DHA สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้จึงนำไปศึกษาโดยวิธี matrigel invasion assay ต่อไป

วิธีการทดสอบ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น 500,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 6-well plate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ จนกระทั่งเซลล์เจริญเป็น monolayer และมีความหนาแน่นประมาณ 80%
2. ใช้ pipette tip ขนาด 200 μ l ชีตลงไปในบริเวณก้นหลุมของ well เพื่อทำให้เกิดบาดแผลเป็นเส้นตรง
3. ล้างด้วย serum-free medium จำนวน 2 ครั้ง
4. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DHA ในความเข้มข้น 10, 20, 40 μ M ตามลำดับ และใช้ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม
5. วัดความกว้างของบาดแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200 เท่า โดยวัดที่เวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับ DHA และถ่ายภาพการเคลื่อนที่ของเซลล์
6. คำนวณค่า % cell migration ที่ชั่วโมงต่างๆ จากสูตร

$$\% \text{ cell migration} = (\text{migrated cell surface area} / \text{total surface area}) \times 100$$

3.2.4 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยวิธี matrigel invasion assay

Matrigel invasion assay เป็นการทดสอบที่ใช้เพื่อศึกษาการ invasion ของเซลล์มะเร็ง ในการประเมินการเกิด metastasis หลังจากให้ DHA โดย invasion chambers จะเคลือบด้วย matrigel ที่มีลักษณะเหมือน basement membrane ซึ่งจะอุดปิดรูของ membrane และป้องกันเซลล์ที่มีลักษณะเป็น non-invasive ไม่ให้มีการ migration ผ่าน membrane กล่าวคือเซลล์ที่มีคุณสมบัติ invasive จะมีการหลั่งเอนไซม์ protease มาทำลาย matrigel และเกิดการ invasion ผ่าน membrane pore ได้

วิธีการทดสอบ

1. เจือจาง matrigel ในสัดส่วนที่เหมาะสม จากนั้นใส่ลงไป invasion chamber ที่ตั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ทำ rehydration matrigel โดยการเติม serum free media ที่ตั้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง
3. จากนั้นเติม MEM medium with serum ลงใน 24-well plate (lower chamber) แล้วนำ invasion chamber มาวางทับบน 24-well plate
4. ใส่เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7/LCC2 ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุมที่มี serum free MEM medium ลงใน upper chamber
5. เติมสารทดสอบ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 μM ตามลำดับ โดยมี 0.2 % DMSO เป็นกลุ่มควบคุมและบ่มเซลล์ใน incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. นำส่วน supernatant ออกและล้าง upper chamber ด้วยสารละลาย PBS
7. ทำการ fix cells ด้วย 3.7% formaldehyde ในสารละลาย PBS ที่มีค่า PH 7.4
8. ดูดสารละลาย formaldehyde ออกแล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS
9. ทำการ permeabilization ด้วย absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง 25°C เป็นเวลา 20 นาที
10. ดูด absolute methanol ออก แล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer อีกครั้ง
11. ย้อมเซลล์ด้วย 0.1% crystal violet และปิดด้วยกระดาษฟอยล์ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 15 นาที จึงดูด 0.1% crystal violet ออก
12. ล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer จนกว่าสารละลายจะมีสีใส
13. เซ็ตเซลล์ที่ไม่มีการ invasion ออกด้วยก้านพันสำลี

14. นับจำนวนเซลล์ที่บุกรุกไปยังด้านล่างของ upper chamber ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง
15. คำนวณหาค่า % cell invasion จากสูตร

$$\% \text{ cell invasion} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่าน matrigel ในกลุ่ม DHA}}{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่าน matrigel ในกลุ่ม control}} \times 100$$

3.2.5 การศึกษาผลของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยาทาม็อกซิเฟนโดยวิธี tamoxifen response assay

ศึกษาฤทธิ์ของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยาทาม็อกซิเฟน ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 โดยวิธี tamoxifen response assay

วิธีการทดสอบ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิดใน MEM medium ที่มี 5% Fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin และ 100 U/ml streptomycin ในจานเพาะเลี้ยงชนิด T25 เป็นเวลา 2 วัน
2. เริ่มทำการ wean cells เพื่อเลี้ยง hormonal effect จาก FBS โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM medium ที่มี 5% Fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin และ 100 U/ml streptomycin บ่มไว้ใน incubator เป็นเวลา 2 วัน
3. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อใน phenol red-free IMEM ที่มี 5% charcoal dextran-stripped FBS, insulin 10^{-6} M และ non-essential amino acid ใน incubator เป็นเวลา 2 วัน
4. ทำการ subculture cells และเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิด ที่ความหนาแน่น 5,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 96-well plate ที่มี phenol red-free IMEM และ 5% charcoal dextran-stripped FBS ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาแล้วทำการดูด media ออกและเติมสารทดสอบ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 μM ตามลำดับ ร่วมกับ 4-hydroxytamoxifen ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μM โดยมี 0.2% DMSO และ 0.1% เอทานอลเป็นกลุ่มควบคุม และทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6. เมื่อครบเวลาจึงดูดส่วนที่เป็น supernatant ที่ทิ้ง และเลี้ยงเซลล์ต่อด้วย 4-hydroxytamoxifen ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง
7. จากนั้นวัดความมีชีวิตของเซลล์โดยใช้วิธี MTT โดยเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 μl ลงใน 96-well plate บ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง
8. ดูด supernatant ที่ทิ้ง และเติม DMSO ปริมาตร 100 μl ลงใน 96-well plate
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm
10. คำนวณ % cell viability โดยใช้สูตร

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

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการ treatment ด้วย complete MEM

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการ treatment ด้วย DHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.2.6 ศึกษาผลของ DHA ต่อการแสดงออกของยีนโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

วิธีการทดสอบ :

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2 ที่ความหนาแน่น 500,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 6-well plate โดยมีอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 3 mL ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ดูด media ออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DHA ในความเข้มข้น 10, 20, 40 μM ตามลำดับปริมาณหลุมละ 3 mL โดยมี 0.2 % DMSO เป็นกลุ่มควบคุม และบ่มเซลล์ใน incubator ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. นำเซลล์มาสกัด RNA โดยดูดสารทั้งหมดออกและเติม trizol จำนวน 1 mL ต่อหลุม ไปเปิดตั้งขึ้นลงจนเซลล์หลุดออกมาและมองเห็นก้นหลุมใส
4. นำ trizol ที่มีเซลล์ปนอยู่ด้วยใส่ในหลอด eppendorf และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

5. เติมคอลโรฟอร์มจำนวน 0.2 mL ลงใน eppendorf เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
6. นำ eppendorf ไปเข้าเครื่อง centrifuged ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จะเห็นสารละลายแบ่งชั้นเป็นชั้นใสด้านบน และชั้นขุ่นอยู่ด้านล่าง
7. ดูดชั้นใสออกมาใส่ eppendorf ใหม่ โดยระมัดระวังการปนเปื้อนจากชั้นขุ่นติดขึ้นมาด้วย
8. เติม isopropanol 0.5 mL ลงใน eppendorf ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง centrifuged ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จะพบ RNA เกาะกลุ่มเป็นแผ่นสีขาวที่บริเวณก้นของ eppendorf
9. เทส่วนของ supernatant ออก คงเหลือไว้เฉพาะแผ่น RNA สีขาวและล้างด้วย 75% เอทานอลจำนวน 1 mL
10. นำไปเข้าเครื่องเขย่า vortex เป็นเวลา 10 วินาที และตามด้วยเครื่อง centrifuged ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
11. เทส่วนที่เป็น 75% เอทานอลออก คั่วหลอด eppendorf ไว้บนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที เพื่อให้ส่วนแผ่น RNA สีขาวแห้ง แต่ไม่แห้งสนิท
12. เติม RNase free water ปริมาณ 10 μL ผสมให้เข้ากันกับแผ่น RNA โดยใช้ไปเปิดดูดขึ้นและลง
13. วัดปริมาณ RNA โดยใช้เครื่อง Nanodrop และตรวจสอบดูการปนเปื้อนจาก phenol โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm
14. นำ RNA ที่ได้เก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอการสกัด cDNA ในขั้นตอนต่อไป
15. ในขั้นตอนการสกัด cDNA นั้น เริ่มจากการเตรียม RNA จำนวน 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ผสมกับ Oilgo(dT) 1 μL และ DEPC-treated water จนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 μL ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermocycler (PCR machine) ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที
16. นำ RNA ที่ได้มาทำ reverse transcription เพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยใช้ ImProm-II TM reverse transcription system ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Nuclease-Free Water	7.3 μL
ImProm-II™ 5X Reaction Buffer	4.0 μL
25 mM MgCl_2	1.2 μL
dNTP Mix	1.0 μL
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitors	0.5 μL
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	1.0 μL
RNA + Oilgo(dT) + DEPC-treated water	5.0 μL
รวม	20 μL

17. นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน tube และนำไปเข้าเครื่อง thermocycler เพื่อจะสังเคราะห์ cDNA โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที
- ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 นาที
- ขั้นตอน inactivated Reverse Transcriptase ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที

18. เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะมีการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA

19. ทำการวิเคราะห์ mRNA โดยใช้วิธี RT-PCR ในขั้นตอนนี้ให้เตรียม PCR tube ขนาด 0.2 mL และเตรียมส่วนผสมดังนี้

Double distilled water	19.05 μL
10X PCR Buffer	2.5 μL
10 mM dNTP mixture	0.25 μL
50 mM MgCl_2	1.0 μL
Forward Primer	0.5 μL
Reverse Primer	0.5 μL
Platinum® Taq DNA Polymerase	0.2 μL
First stand cDNA Template	1.0 μL
รวม	25 μL

โดย primer ที่นำมาใช้จะมีลำดับเบสดังนี้

Genes	Primer sequences	Tm (°C)	Product (bp)
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GAG AAG GCT GGG GCT CAT TT-3' R: 5'-AGT GAT GGC ATG GAC TGT GG-3'	57	231
<i>MACDOR2</i>	F: 5'-TTG GCT CTG CTC TTC CAT TT-3' R: 5'-GCC AAG AAT CAC CAT GAG GT-3'	58	204
<i>CXCR4</i>	F: 5'-GAA CCC TGT TTC CGT GAA GA-3' R: 5'-CTT GTC CGT CAT GCT TCT CA-3'	57	150
<i>MMP-9</i>	F: 5'-CTG GCC ATG AAC TAC CTG GA-3' R: 5'-GTC ACA CTT GAT CAC TCT GG-3'	56	483
<i>E-CADHERIN</i>	F: 5'-CGC ATT GCC ACA TAC A-3' R: 5'-CGT TAG CCT CGT TCT CA-3'	57	502
<i>VIMENTIN</i>	F: 5'-CGC TTC GCC AAC TAC AT-3' R: 5'-AGG GCA TCC ACT TCACAG-3'	57	662
<i>NcoA3</i>	F: 5'-AGC CAT CAG TGA AGG TGT GG-3' R: 5'-ACT TGT GCA AAA TCC GGT GC-3'	57	482
<i>c-MYC</i>	F: 5'-GCT TCT CTG AAA GGC TCT CCT-3' R: 5'-CCA TTC CCG TTT TCC CTC TG-3'	56	295

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของยีนที่ใช้ในการศึกษา

20. เมื่อผสมให้เข้ากันจึงทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 วินาที และนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งเวลาดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำการ denature และกระตุ้นให้เกิดการ reverse transcriptase
- ขั้นตอนที่ 2 เลือก PCR amplifications โดยใช้ 35 cycle ภายใต้ง่อนไข
 1. ขบวนการ Denaturing ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที

2. ขบวนการ Annealing ที่อุณหภูมิตามค่า T_m ที่เหมาะสมเป็นเวลา 30 วินาที
 3. ขบวนการ Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
 - ขั้นตอนที่ 3 เลือกลงอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อคงสภาพ
 - ขั้นตอนที่ 4 เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วให้คงสภาพต่อที่ 4°C จนกว่าจะนำ PCR tube ออกจากเครื่อง เมื่อนำออกจากเครื่องแล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C
21. ขั้นตอนต่อมา นำ PCR product ที่ได้มาทำขบวนการ gel electrophoresis
 22. วิธีการเตรียมเจล
 - ใช้ผงอะกาโรส จำนวน 1.2 g ละลายใน TBE buffer ปริมาตร 80 mL อุณหภูมิ ความร้อนปานกลางเป็นเวลา 2 นาที จนกระทั่งผงละลายกลายเป็นน้ำใส
 - เทใส่ถาดเตรียมเจล พร้อมใส่หัวสำหรับเตรียมเจล รอจนเจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที
 - นำหัวออก จะได้เจลที่มีช่องและแข็งตัวสมบูรณ์พร้อมสำหรับการทำ gel electrophoresis
 23. นำเจลวางในเครื่อง gel electrophoresis โดยหันด้านที่เป็นช่องไปยังขั้วลบ และเติม TBE buffer จนน้ำท่วมเจล
 24. ตัดแผ่นพาราฟินสำหรับเตรียมผสมสารที่จะเตรียมเจลขนาดกว้าง 2 cm ยาว 4 cm หยอด loading dye จำนวน 2 μL จำนวนเท่ากับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ
 25. ใส่ PCR product ที่ได้จำนวน 6 μL ผสมกับ loading dye ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน และทำการไปเปิดดีสารจำนวน 7 μL ใส่ลงไปช่องของเจลที่เตรียมไว้ โดยใส่ VC DNA ladder เป็น marker ในช่องซ้ายสุด
 26. ปิดฝาเครื่อง gel electrophoresis ต่อขั้วกระแสไฟฟ้าขั้วลบเข้ากับสายสีดำ และขั้วบวกเข้ากับสายสีแดง และเปิดเครื่องโดยตั้งค่าที่ 100 volts (V) เป็นเวลา 50 นาที หรือเส้นสีฟ้าของ bromophenol blue มีการเคลื่อนที่ได้ระยะทางเป็น $\frac{3}{4}$ ของแผ่นเจล
 27. นำแผ่นเจลที่ได้ไปแช่ใน TBE buffer ปริมาตร 400 mL ที่มี 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แต่แช่ต่อด้วย TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที
 28. นำแผ่นเจลไปวัดค่า density โดยใช้เครื่อง gel cocumentation

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

ในการทดลองจะทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และรายงานในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of mean) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้อมูล จะใช้สถิติ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) ร่วมกับ LSD post hoc test เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดข้อมูล โดยจะพิจารณาว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

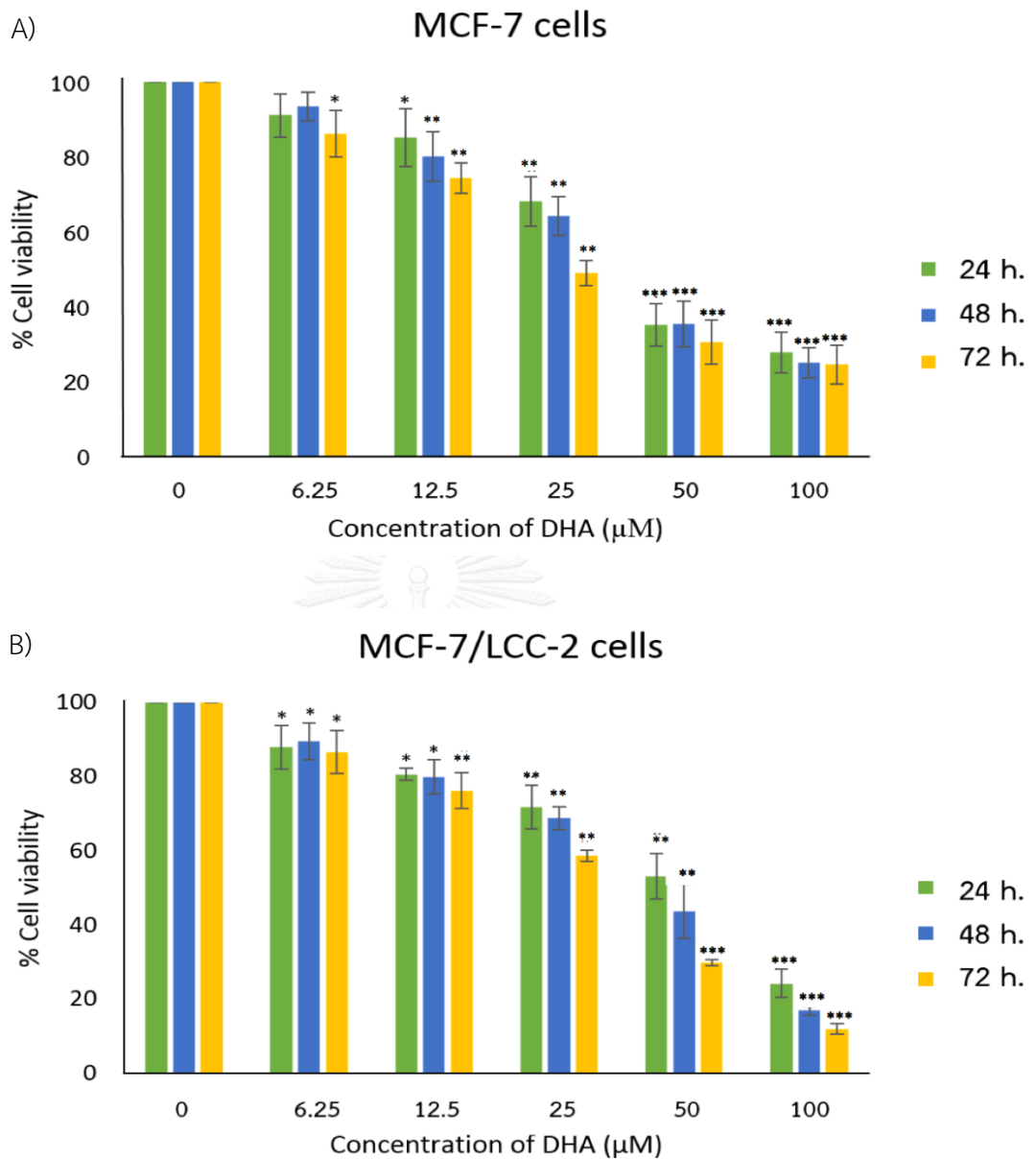


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของ DHA ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MCF-7/LCC-2

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ fibrosarcoma รวมถึงยับยั้งการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับ (Efferth et al., 2004) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ DHA ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 โดยใช้วิธี MTT (MTT colorimetric assay) เมื่อทดสอบโดยให้สาร DHA ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ โดยมี 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า DHA มีฤทธิ์ลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยผลที่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นที่ได้รับ DHA เพิ่มขึ้น (dose dependent manner) ดังรูปที่ 6 และนำค่าร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ร้อยละ 20 และร้อยละ 50 (IC_{20} และ IC_{50}) โดยมีค่า IC_{20} ของเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 17.21, 12.56, 9.42 μM และค่า IC_{50} เท่ากับ 33.37, 29.06, 26.89 μM ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ดังรูปที่ 6A และในเซลล์ MCF-7/LCC-2 มีค่า IC_{20} เท่ากับ 16.31, 13.08, 10.1 μM และค่า IC_{50} ของเซลล์เท่ากับ 51.81, 36.93, 31.74 μM ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ดังรูปที่ 6B จากนั้นนำค่า IC_{20} และ IC_{50} ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่จะใช้ทดสอบในการศึกษาต่อไป โดยเลือกทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของ DHA เท่ากับ 10, 20 และ 40 μM ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างช่วง IC_{20} และ IC_{50}



รูปที่ 7 DHA มีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ MCF-7 (A) และ MCF-7/LCC-2 (B) กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (*) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$, (**) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ และ (***) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2% DMSO)

Cells type	Time (h)	DHA (μM)	
		IC ₂₀	IC ₅₀
MCF-7	24	17.21 \pm 5.42	33.37 \pm 3.99
	48	12.56 \pm 1.60	29.06 \pm 2.63
	72	9.42 \pm 1.45	26.89 \pm 2.76
MCF-7/LCC-2	24	16.31 \pm 0.88	45.81 \pm 5.05
	48	13.08 \pm 0.56	36.93 \pm 1.27
	72	10.10 \pm 2.37	31.74 \pm 1.03

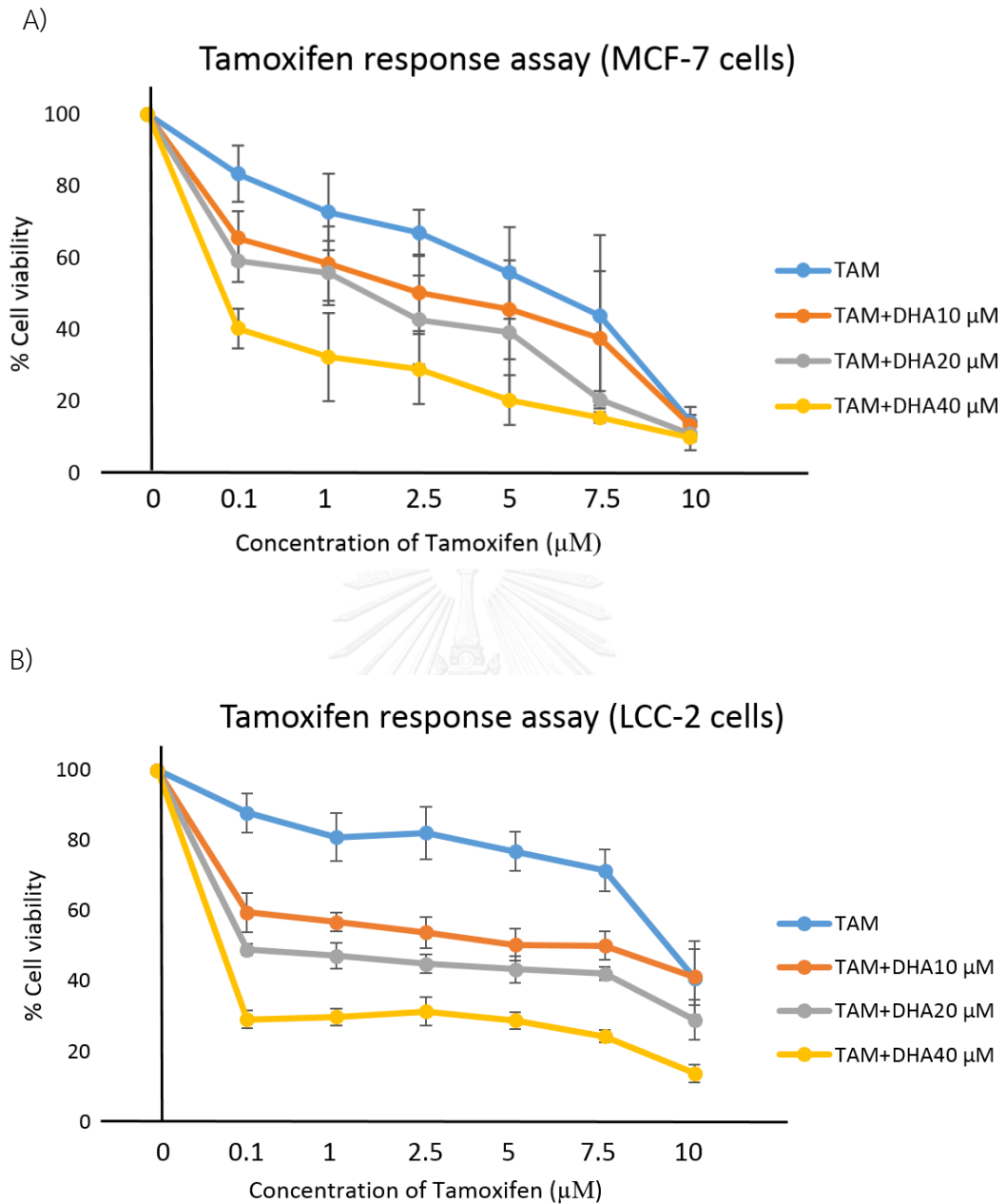
ตารางที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ร้อยละ 20 และร้อยละ 50 (IC₂₀ และ IC₅₀) ของเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 เมื่อได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2% DMSO) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

4.2. การศึกษาผลของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยาทาน็อกซิเฟน

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของ DHA ในเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 พบว่า DHA มีฤทธิ์ลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาน็อกซิเฟนอย่างมีนัยสำคัญ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถของ DHA ในการเพิ่มความไวต่อยาทาน็อกซิเฟนในเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 โดยการทดสอบนี้ทำให้สารทดสอบ DHA ร่วมกับยาทาน็อกซิเฟน ซึ่งเป็นยาชนิดแรกที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน เปรียบเทียบกับการให้ยาทาน็อกซิเฟนเพียงชนิดเดียว

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อให้สารทดสอบ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM ร่วมกับยาทาน็อกซิเฟนความเข้มข้น 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 μM ทั้งเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาทาน็อกซิเฟนเพียงชนิดเดียว ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าเซลล์ MCF-7 ที่เป็นเซลล์ชนิดที่ไม่ดื้อต่อยาทาน็อกซิเฟน จำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากที่ได้รับสารทดสอบทั้งสองกลุ่ม ซึ่งจะพบว่าลดลงมากกว่าเซลล์ MCF-7/LCC-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาน็อกซิเฟน

จากผลการทดลองนี้พบว่าจำนวนร้อยละของควมมีชีวิตของเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากความเป็นพิษของ DHA แต่ไม่ได้มีฤทธิ์ในการเพิ่มความไวต่อยาทาน็อกซิเฟน และฤทธิ์ลดการดื้อยาของเซลล์แต่อย่างใด จะเห็นได้จากเมื่อให้ความเข้มข้นของ DHA ในความเข้มข้นที่คงที่ ที่ 10, 20 และ 40 μM และเพิ่มความเข้มข้นของยาทาน็อกซิเฟนจาก 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5 ถึง 10 μM กราฟมีลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงในเซลล์ MCF-7/LCC-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาน็อกซิเฟน และไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของยาทาน็อกซิเฟนก็ตาม แต่ในทางกลับกันเซลล์ MCF-7 ที่ไม่ดื้อต่อยาทาน็อกซิเฟนนั้นจะพบกราฟร้อยละของควมมีชีวิตของเซลล์มีความชันมากยิ่งขึ้น แสดงให้เห็นถึงผลที่ดีขึ้นของการให้สารทดสอบร่วมกันระหว่าง DHA และยาทาน็อกซิเฟน



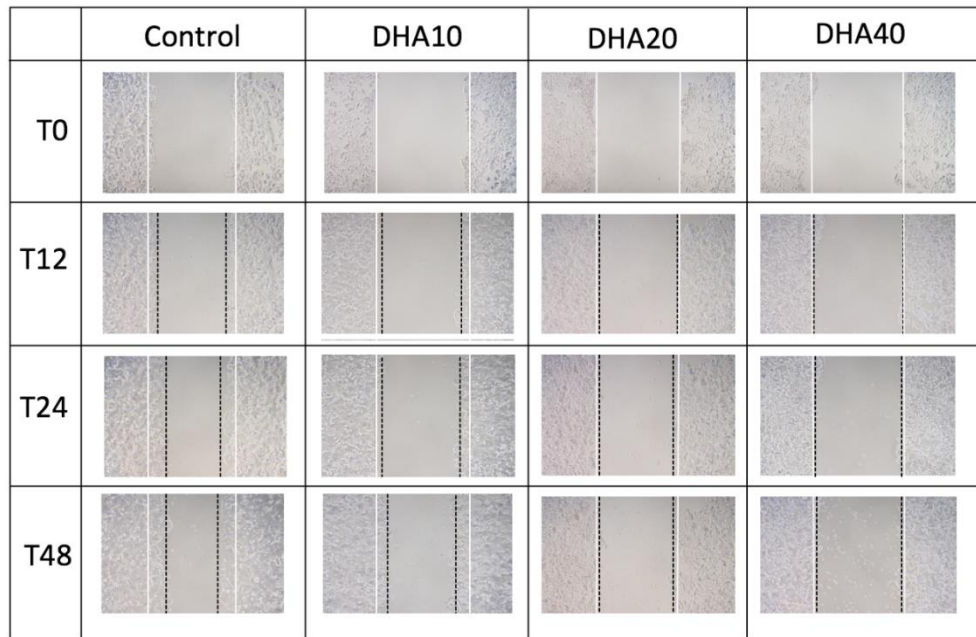
รูปที่ 8 DHA เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (A) และ MCF-7/LCC-2 (B) กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับยาทาโมกซิเฟนแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μM และได้รับร่วมกับ DHA ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 μM โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

4.3 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี scratch assay

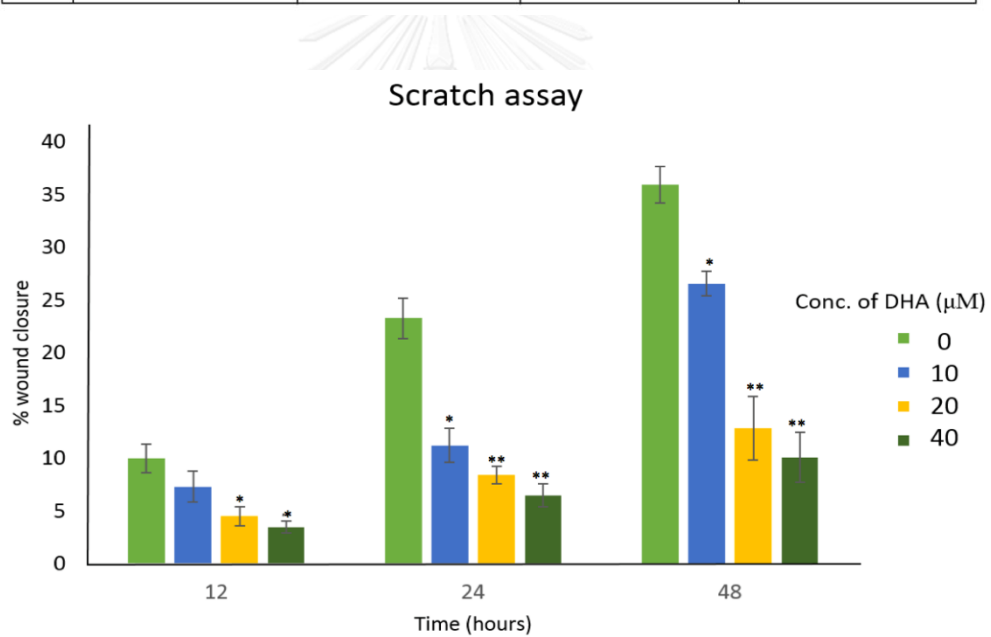
จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการ EMT มีบทบาทที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง ทำให้มีความสามารถในการแพร่กระจายและลุกลามไปยังอวัยวะต่างๆของร่างกาย เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมเสียชีวิต โดยกระบวนการ EMT ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จาก epithelial cell ไปเป็น mesenchymal cell เคลื่อนที่ออกจากอวัยวะตั้งต้นและกระจายไปยังอวัยวะอื่น เพื่อต้องการศึกษา DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมได้หรือไม่ จึงทำการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้วิธี scratch assay เพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่คือต่อยามีอ็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) ซึ่งเป็นชนิดที่พบมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ได้มาก แต่อย่างไรก็ดีได้เลือกทำการทดสอบในเซลล์ชนิด MCF-7/LCC-2 เพียงชนิดเดียว เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ชนิด MCF-7 เป็นชนิดที่พบมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้น้อยมาก (Soule, Vazquez, Long, Albert, & Brennan, 1973) ของร่างกายในอัตราที่ต่ำ การทดสอบนี้จะสังเกตการเคลื่อนที่ของเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการบันทึกภาพการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารทดสอบ DHA ที่ใช้ในการศึกษาเท่ากับ 10, 20 และ 40 μM โดยมีเซลล์ที่ให้ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 8 (A)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เซลล์จะมีการเคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณก้นจานเลี้ยงเซลล์ที่ถูกขูดไว้ด้วยปลายปิเปตต์มากยิ่งขึ้น แต่เมื่อได้รับสารทดสอบ DHA ในความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นลง โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA มากยิ่งขึ้น จากความเข้มข้น 10, 20 ไปจนถึง 40 μM จะมีความสัมพันธ์กับระยะทางการเคลื่อนที่ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2% DMSO) ที่ $p < 0.05$ โดยที่เวลา 12 ชั่วโมงพบร้อยละการปิดของรอยแยกเท่ากับ 7.30, 4.50 และ 3.49 ที่เวลา 24 ชั่วโมงพบร้อยละความกว้างของรอยแยกเท่ากับ 11.24, 8.39 และ 6.49 และที่เวลา 48 ชั่วโมงพบร้อยละการปิดของรอยแยกเท่ากับ 26.58, 12.85 และ 10.10 ตามลำดับแสดงในรูปที่ 8 (B)

A)



B)



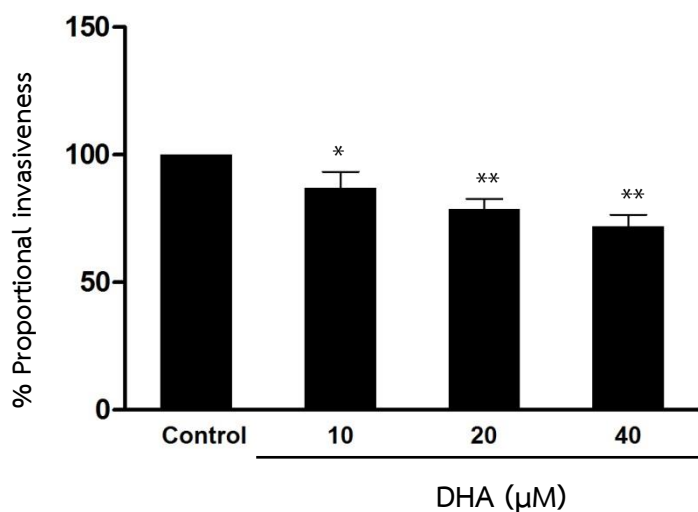
รูปที่ 9 DHA ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาพาทาม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2)

(A) รูปแสดงความกว้างของรอยแยกบริเวณกันงานเลี้ยงเมื่อได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบันทึกภาพที่เวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง (B) กราฟแสดงร้อยละของการปิดความกว้างรอยแยก เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.2% DMSO โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (*) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ และ (**) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$

4.4 การศึกษาผลของ DHA ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยวิธี matrigel invasion

เนื่องจากการศึกษาโดยวิธี scratch assay ใช้เพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC-2 ทำให้ทราบถึงผลของ DHA ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง แต่เป็นเพียงการคัดกรองเบื้องต้นว่าสารมีผลต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์หรือไม่ เมื่อพบว่า DHA สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ แต่ไม่สามารถแยกผลที่มาจากฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ จึงศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้วิธี matrigel invasion ซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อศึกษาการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง MCF-7/LCC-2 โดย invasion chamber ที่นำมาใช้ในการศึกษา จะถูกเคลือบด้วย matrigel ที่มีลักษณะเหมือน basement membrane โดยเซลล์ที่มีความสามารถในการลุกลาม จะมีการหลั่งเอนไซม์ protease มาทำลาย matrigel และเกิดการลุกลามผ่าน membrane pore ได้

ในการศึกษานี้จึงใช้ invasion chamber เพื่อศึกษาการลุกลามของเซลล์ MCF-7/LCC-2 เมื่อได้รับสารทดสอบ DHA เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้ 0.2% DMSO โดยคำนวณจำนวนเซลล์ที่สามารถแพร่ผ่าน matrigel ได้ เปรียบเทียบกันทั้งสองกลุ่มการทดลอง ผลการศึกษาที่ได้คือเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เซลล์สามารถแพร่ผ่าน matrigel ได้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแพร่ผ่าน matrigel เป็น 87.67, 78.63, 71.91 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารทดสอบ DHA มีความสามารถในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7/LCC-2 **รูปที่ 9**

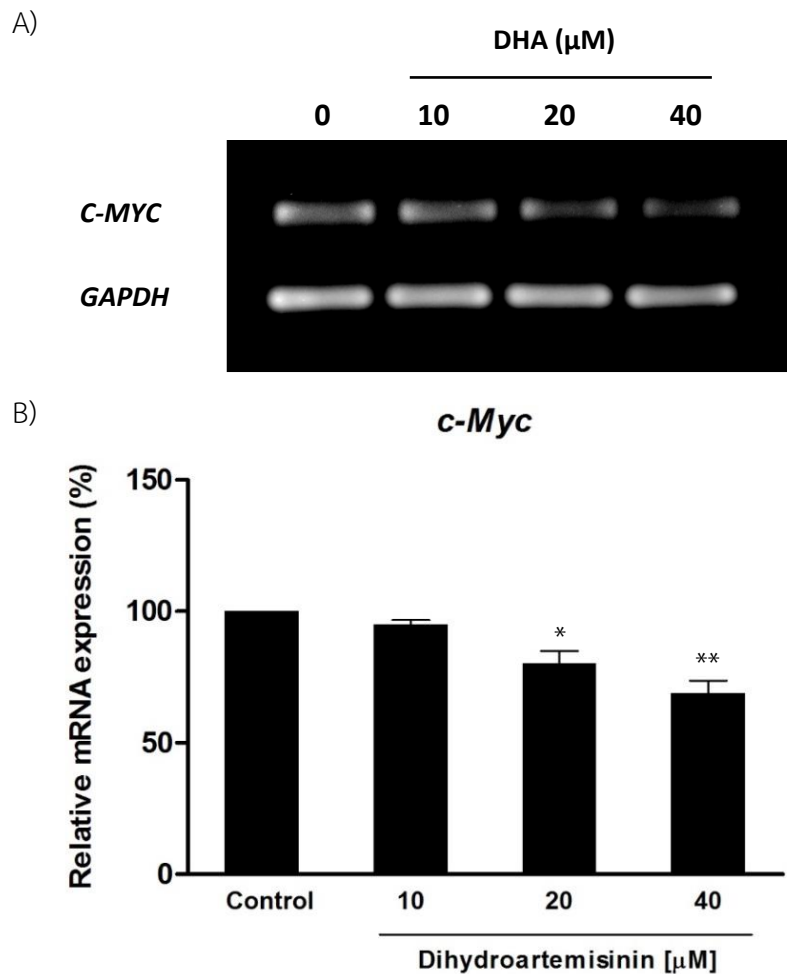


รูปที่ 10 DHA ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาโมซิเฟน (MCF-7/LCC-2) กราฟแสดงร้อยละการลุกลามของเซลล์เมื่อได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง พบว่าจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน invasion chamber จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA ค่าร้อยละการลุกลามของเซลล์จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (*) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$, (**) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

4.5 การศึกษาผลของ DHA ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การลุกลามของเซลล์ และการดื้อยาทาม็อกซิเฟน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เพิ่มความไวต่อยาทาม็อกซิเฟน และสามารถยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ เพื่อศึกษากลไกการทำงานของ DHA ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและยืนยันผลการทดสอบว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน MCF-7/LCC-2 เมื่อได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0.2% DMSO เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาพบว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ DHA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายีน *c-MYC* มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยในเซลล์มะเร็งเต้านมนั้นจะพบว่าการแสดงออกของยีน *c-MYC* สูงขึ้นมากกว่าปกติ และยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งเต้านมปัจจุบันคือทาม็อกซิเฟน มีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *c-MYC* ลดลงในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (Musgrove & Sutherland, 2009) จึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *c-MYC* ในเซลล์ MCF-7/LCC-2 เมื่อให้สารทดสอบ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM และมี 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าค่า relative mRNA expression ของยีน *c-MYC* แสดงเป็นร้อยละ เท่ากับ 95.12, 80.21 และ 68.63 ที่ความเข้มข้นของ DHA 10, 20 และ 40 μM ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ DHA ที่ 20 และ 40 μM มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *c-MYC* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2% DMSO) ดังรูปที่ 10

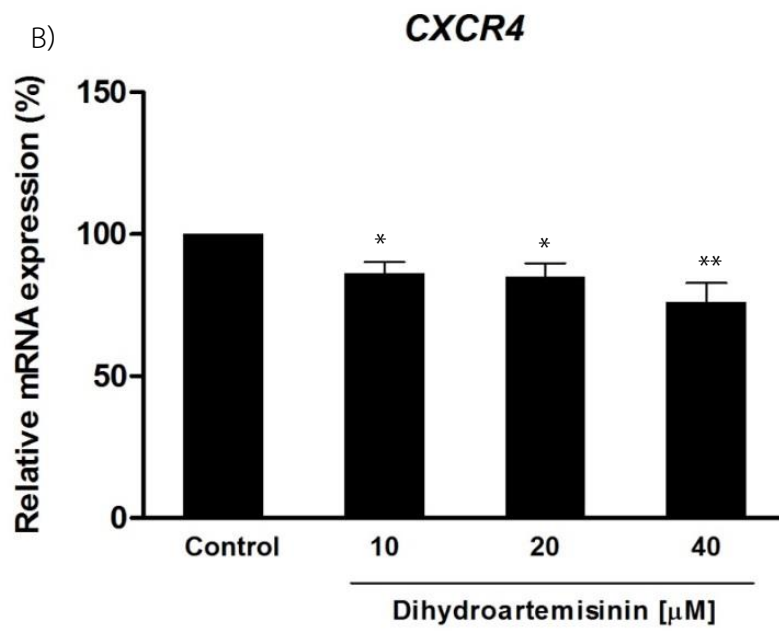
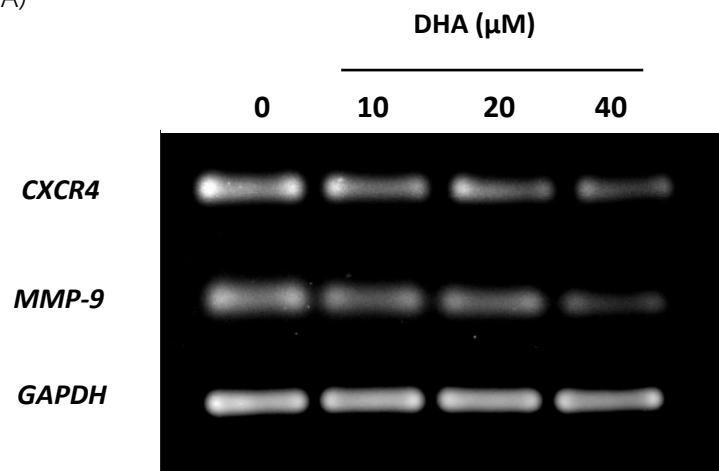


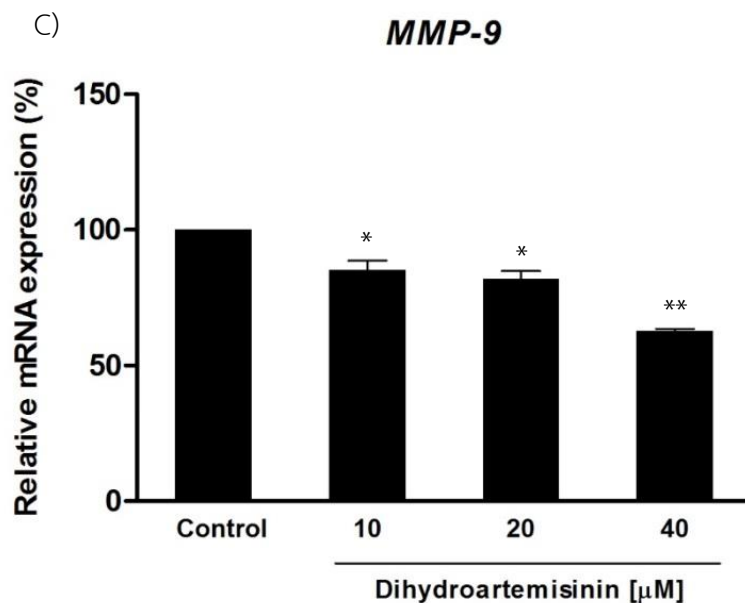
รูปที่ 11 DHA ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ต่อยาทาม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) โดยเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *c-MYC* (A) การแสดงออกของยีน *c-MYC* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR หลังได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี *GAPDH* เป็น internal control (B) ค่าร้อยละการแสดงออกของ mRNA ในยีน *c-MYC* โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (*) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$, (**) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกของ DHA ต่อการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์ โดยทำการศึกษาในระดับ mRNA ของ *MMP-9* และ *CXCR4* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ผลการศึกษาที่ได้แสดงในรูปที่ 11 พบว่า DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *CXCR4* และ *MMP-9* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกความเข้มข้น ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าร้อยละของ relative mRNA expression เท่ากับ 86.17, 85.03 และ 76.15 ใน *CXCR4* และ 85.30, 81.84 และ 62.68 ใน *MMP-9* แสดงให้เห็นว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์ผ่านทางกลไกการแสดงออกของยีน *MMP-9* และ *CXCR4*



A)



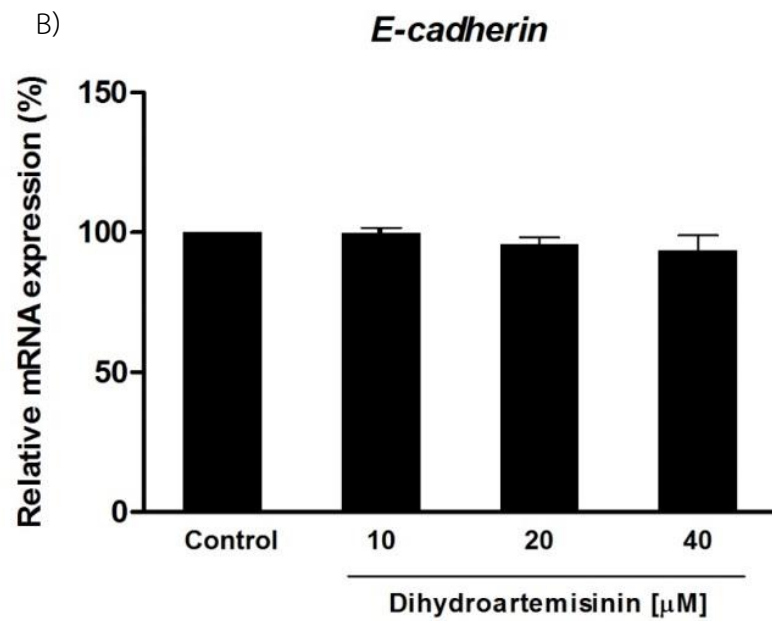
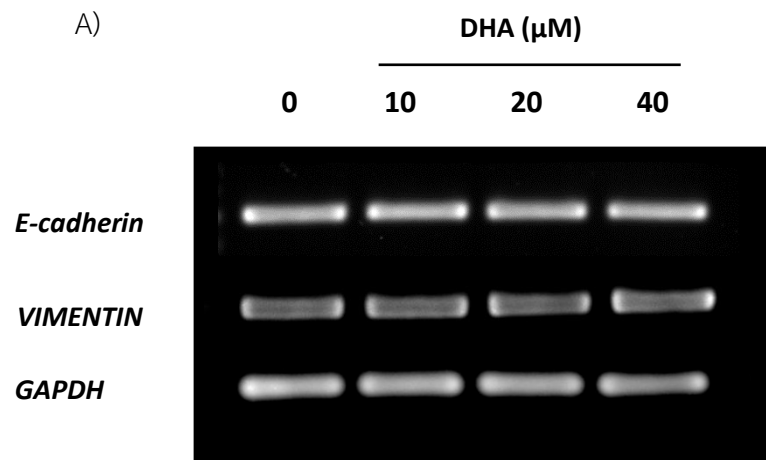


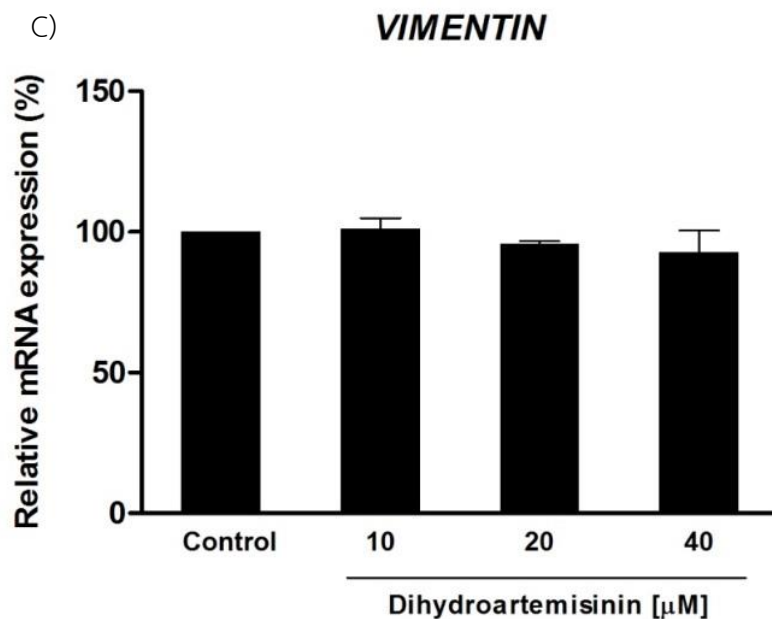
รูปที่ 12 DHA ยับยั้งการลุกลามของเซลล์ที่ดื้อต่อยาทานีม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) โดยเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *CXCR4* และ *MMP-9* (A) การแสดงออกของยีน *CXCR4* และ *MMP-9* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR หลังได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี *GAPDH* เป็น internal control (B) ค่าร้อยละการแสดงออกของ mRNA ในยีน *CXCR4* (C) ค่าร้อยละการแสดงออกของ mRNA ในยีน *MMP-9* โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (*) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$, (**) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ EMT ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จาก epithelial cell ไปเป็น mesenchymal cell ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์มะเร็งมีการเคลื่อนที่ออกจากอวัยวะนั้น แพร่กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากการลดลงของ epithelial marker ได้แก่ *E-cadherin* และการเพิ่มขึ้นของ mesenchymal marker ได้แก่ *vimentin* เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีน *E-cadherin* และ *vimentin* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน MCF-7/LCC-2 หลังจากให้สารทดสอบ DHA ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสาร DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2% DMSO) โดยมีค่าร้อยละของ relative mRNA expression เท่ากับ 99.91, 95.82 และ 93.56 ของ *E-cadherin* และ 101.19, 95.68 และ 95.82 ใน *Vimentin* แสดงให้เห็นว่า DHA ไม่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านทาง การเปลี่ยนแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ EMT ดังรูปที่

12

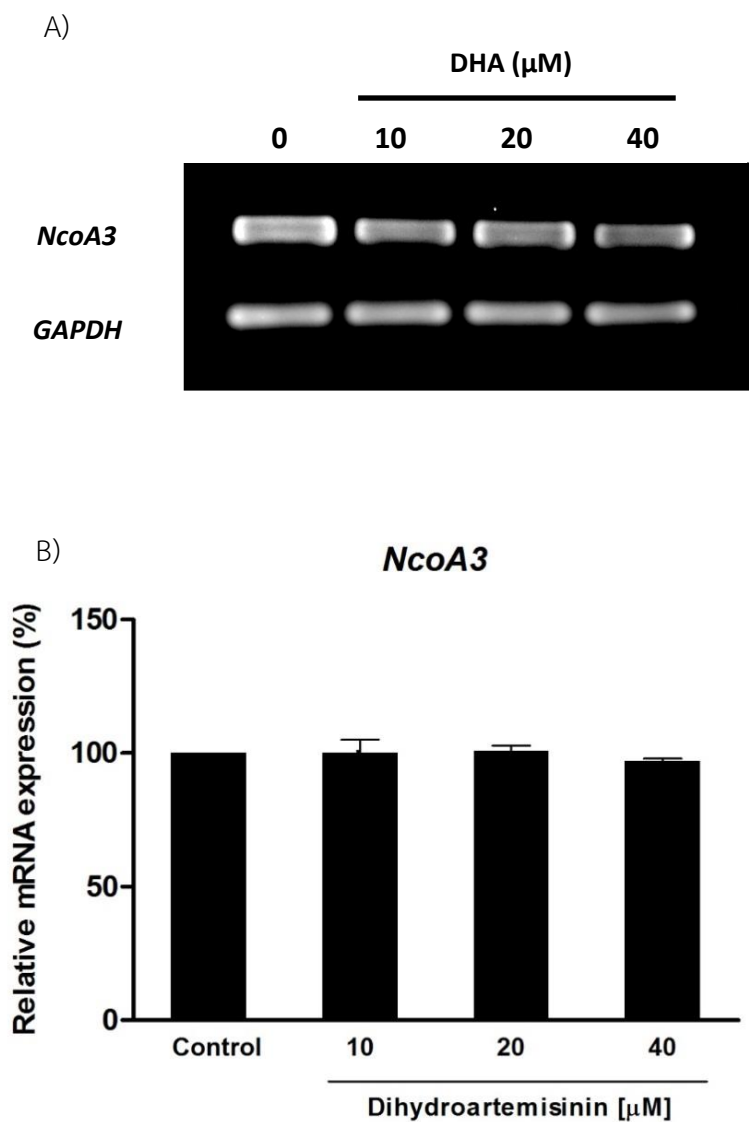






รูปที่ 13 DHA ไม่มีผลยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) ผ่านทางกระบวนการ EMT โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *E-cadherin* และ *Vimentin* (A) การแสดงออกของ *E-cadherin* และ *Vimentin* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR หลังได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี *GAPDH* เป็น internal control (B) ค่าร้อยละการแสดงออกของ mRNA ใน *E-cadherin* (C) ค่าร้อยละการแสดงออกของ mRNA ใน *Vimentin* โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

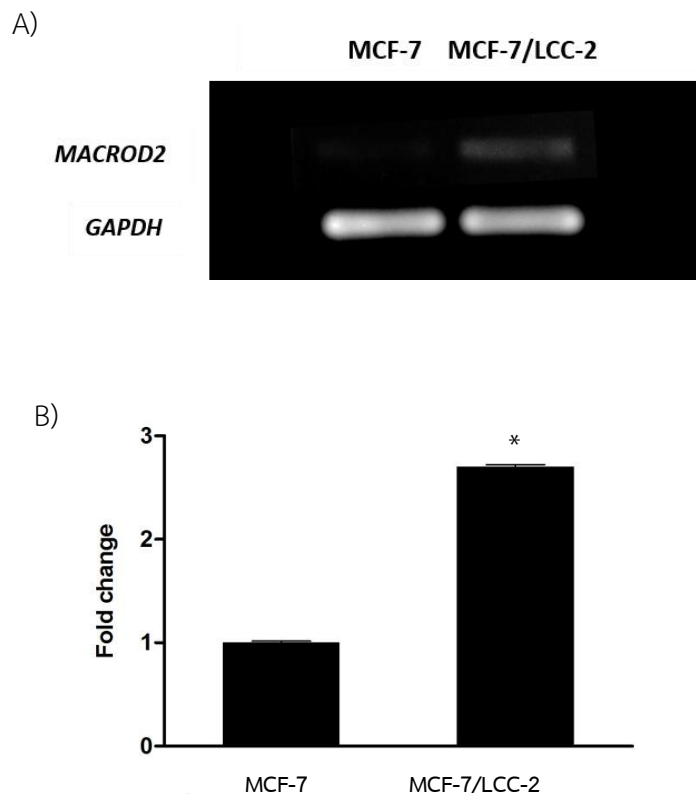
จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า DHA มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มความไวของยาต้านมะเร็ง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง *NcoA3* ซึ่งทำหน้าที่เป็น coactivator กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ transcription ของยีนและเกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมตามมา ในสถานะที่เซลล์มะเร็งเต้านมมีการเจริญเติบโตและมีการแพร่กระจายออกนอกเซลล์นั้น จะพบการแสดงออกของยีน *NcoA3* ที่เพิ่มสูงมากขึ้น และมีความสัมพันธ์กับสถานะที่เซลล์เกิดการดื้อต่อยาต้านมะเร็งด้วยเช่นกัน การแสดงออกของ *NcoA3* จึงเป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงถึงสถานะที่เซลล์มีการดื้อต่อยา (Carroll et al., 2000; Musgrove & Sutherland, 2009) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบฤทธิ์ของ DHA ว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวต่อการดื้อต่อยาต้านมะเร็งหรือไม่ โดยทดสอบการแสดงออกของยีน *NcoA3* พบว่ามีค่าร้อยละของ relative mRNA expression เท่ากับ 100.02, 100.80 และ 96.88 หลังจากให้สารทดสอบ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 μM ตามลำดับ ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2% DMSO) ดังรูปที่ 13 แสดงให้เห็นว่า DHA ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการการดื้อต่อยาต้านมะเร็งของเซลล์



รูปที่ 14 DHA ไม่มีผลต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *NcoA3* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) (A) การแสดงออกของยีน *NcoA3* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR หลังได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี *GAPDH* เป็น internal control (B) ค่าร้อยละการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *NcoA3* ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

จากการศึกษาของ Mohseni และคณะในปี 2014 โดยการนำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมมาตรวจสอบการแสดงออกของ *MACROD2* พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA เพิ่มสูงขึ้นมากในเซลล์มะเร็งเต้านมของผู้ป่วยที่ดื้อต่อยา tamoxifen (Mohseni et al., 2014) ทางผู้ศึกษาจึงได้ทำการทดสอบถึงการแสดงออกของ mRNA ของ *MACROD2* ในเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 พบว่าเซลล์ MCF-7/LCC-2 มีการแสดงออกของยีน *MACROD2* เป็น 2.69 เท่าของเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาที่ผ่านมาของ Mohseni ที่กล่าวว่าเซลล์ที่ดื้อต่อยา TAMOXIFEN จะพบการแสดงออกของ *MACROD2* ที่เพิ่มสูงขึ้นมาก

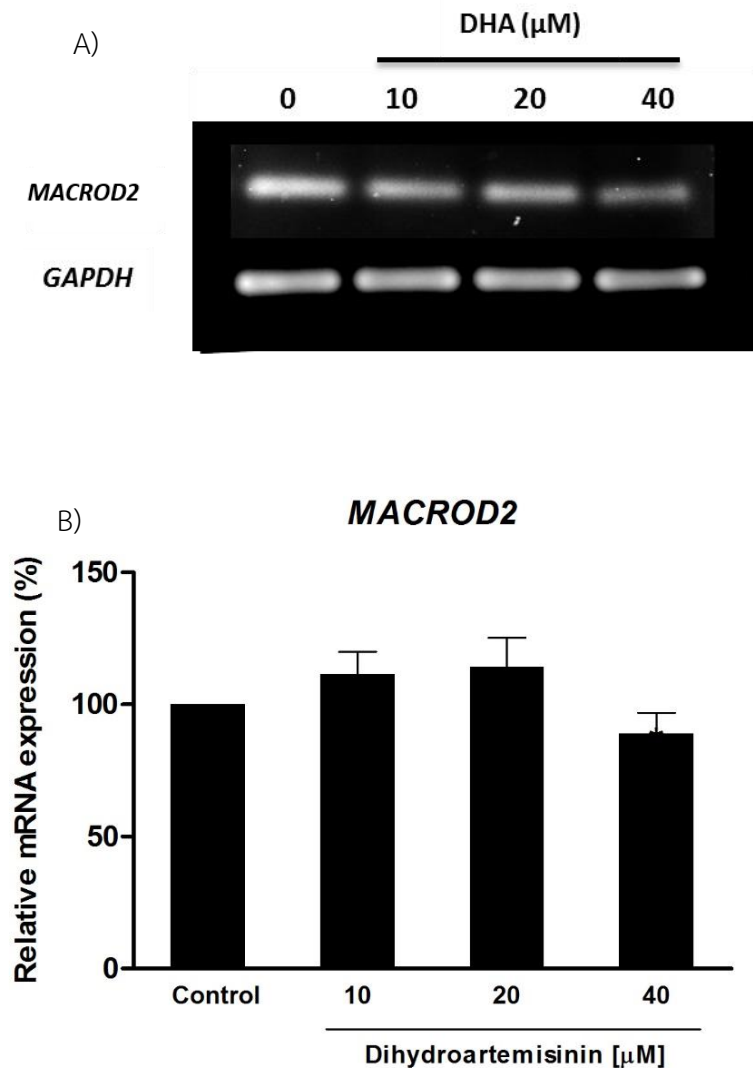




รูปที่ 15 แสดง basal level ของยีน *MACROD2* ในเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 (A) การแสดงออกของยีน *MACROD2* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR (B) ค่า fold change ของการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *MACROD2* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง และมี *GAPDH* เป็น internal control ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (*) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$

จากผลการทดลองพบว่ายีน *MACROD2* มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Mohseni และคณะ (Mohseni et al., 2014) จึงศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการทำงานของ DHA ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟนชนิด MCF-7/LCC-2 โดยทดสอบฤทธิ์ของ DHA ว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการดื้อยาทาม็อกซิเฟนหรือไม่ โดยทดสอบการแสดงออกของยีน *MACROD2* พบว่ามีค่าร้อยละของ relative mRNA expression เท่ากับ 121.41, 114.11 และ 88.99 หลังจากให้สารทดสอบ DHA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM ตามลำดับ ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่า DHA ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการการดื้อยาทาม็อกซิเฟนของเซลล์ สัมพันธ์กับการศึกษาการแสดงออกของยีน *NcoA3* ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดื้อยาของเซลล์เช่นกัน





รูปที่ 16 DHA ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ mRNA ของ MACROD2 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน (MCF-7/LCC-2) (A) การแสดงออกของยีน MACROD2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR หลังได้รับ DHA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี GAPDH เป็น internal control (B) ค่าร้อยละการแสดงออกของ mRNA ในยีน MACROD2 โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการทดลอง

ปัจจุบันการเกิดโรคมะเร็งเต้านมยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญของประชากรทั่วโลก ถึงแม้ว่าในการรักษามะเร็งเต้านมในปัจจุบันมีประสิทธิผลมากขึ้น แต่ยังคงพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเสียชีวิตเพิ่มขึ้นเป็นอันดับ 2 ของโรคมะเร็งทั้งหมด (Jemal et al., 2011) โดยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนเป็นชนิดที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วย (Al Saleh et al., 2011) และผู้ป่วยระยะลุกลามประมาณร้อยละ 40 มีการพัฒนาของโรคจนเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้รักษา ได้แก่ ยาฮอร์โมน ซึ่งเป็ยยาชนิดแรกที่ใช้ในผู้ป่วยทั้งวัยก่อนและหลังหมดประจำเดือน ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการลุกลามและแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย นำไปสู่การเสียชีวิต (Brauch & Jordan, 2009; Ring & Dowsett, 2004) การค้นหายาและการพัฒนายาชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ดื้อต่อยาจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น โดยยาที่จะนำมาใช้ควรมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดี แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์น้อยที่สุด

DHA เป็นอนุพันธ์ของ ART เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ได้จากพืช *Artemisia annua* L. มีโครงสร้างเป็น sesquiterpene lactone ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* (Dhingra et al., 2000; Meshnick, 2002; O'Neill, 2004; White, 2004) และยังพบว่า DHA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งรังไข่และเซลล์มะเร็งตับ (Lai and Singh, 1995; Efferth et al., 2004; Singh and Lai, 2001; Wu et al., 2004) กลไกการออกฤทธิ์หลักของ DHA ในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่มีรายงาน คือการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดยพบว่า ART ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติในร่างกายของมนุษย์ และถึงแม้ในปัจจุบันจะมีผู้ที่สนใจทำการศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของ DHA แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ของ DHA ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนที่ดื้อต่อยาและไม่ดื้อต่อยาฮอร์โมน โดยศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งในการยับยั้งการเจริญเติบโต การลุกลาม และการเพิ่มความไวต่อยาฮอร์โมน

ผลการศึกษาพบว่า DHA ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งชนิดที่ดื้อและไม่ดื้อต่อยาฮอร์โมน โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในระดับไมโครโมลาร์ และผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นกับความเข้มข้นสาร (dose dependent manner) สัมพันธ์กับการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DHA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและ

เซลล์มะเร็งลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า DHA กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis และการยับยั้งวัฏจักรเซลล์มะเร็งในระยะ G1 ผ่านทางกลไกการการลดลงของ cyclin D, E, CDK2-4 (Hou, Wang, Zhang, & Wang, 2008; Y. Y. Lu et al., 2009) อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยยังไม่ได้ศึกษาฤทธิ์ของ DHA ต่อการยับยั้งกระบวนการ apoptosis และวัฏจักรของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อต่อยาทาโมอกซิเฟนจึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ DHA โดยศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับ mRNA ของยีน *c-MYC* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (Efferth et al., 2004; Lai & Singh, 1995, 2006; Wu et al., 2004) และพบว่า การลดลงของ *c-MYC* ทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของวัฏจักรเซลล์ในระยะ S เป็นผลให้เซลล์ไม่เกิดการแบ่งตัวและการเจริญเติบโต (Musgrove & Sutherland, 2009) จากการศึกษาพบว่าเมื่อให้สารทดสอบ DHA ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อต่อยาทาโมอกซิเฟน มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *c-MYC* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า DHA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการ degradation ของ *c-MYC* ในเซลล์มะเร็งลำไส้เช่นกัน (Y. Y. Lu et al., 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาคั้งนี้ ที่แสดงให้เห็นว่า DHA สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *c-MYC* ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อต่อยาทาโมอกซิเฟนได้ แต่อย่างไรก็ตามผลของ DHA ต่อวัฏจักรของเซลล์ยังไม่ได้มีการศึกษาเพิ่มเติม

เมื่อศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของ DHA ร่วมกับยาทาโมอกซิเฟน เปรียบเทียบกับการให้ยาทาโมอกซิเฟนเพียงชนิดเดียว ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาทาโมอกซิเฟนเพียงชนิดเดียว จะเห็นได้ว่าเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่ดื้อต่อยาทาโมอกซิเฟน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงมากกว่าเซลล์ MCF-7/LCC-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาโมอกซิเฟน จากการศึกษาที่ผ่านมา มีผู้ทำการศึกษาโดยให้ DHA ร่วมกับ cyclophosphamide ในเซลล์มะเร็งปอด (H. J. Zhou, Zhang, Li, Wang, & Lou, 2010) และ DHA ร่วมกับ gemcitabine ในเซลล์มะเร็งตับ (Hwang et al., 2010) ผลการศึกษาพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าเมื่อให้สารทดสอบร่วมกัน มีผลในการเพิ่มฤทธิ์ต่อกระบวนการ apoptosis และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งถึงร้อยละ 54 โดยฤทธิ์ต่อกระบวนการ apoptosis ของ DHA และ tamoxifen นั้นควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต และยังไม่มีการศึกษาการใช้ DHA ร่วมกับยาอื่นในเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยา

แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาที่ได้ไม่ได้แสดงให้เห็นว่า DHA มีผลทำให้เซลล์มีความไวต่อการรักษาด้วยยาทาโมอกซิเฟนเพิ่มมากขึ้น หรือ DHA มีฤทธิ์ลดการดื้อยาของเซลล์ โดยสังเกตได้จากการทดลองในรูปที่ 7 เมื่อทำการทดสอบโดยให้ความเข้มข้นของ DHA คงที่ และเพิ่มความเข้มข้นของ

ทาม็อกซิเฟน พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพียงเล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน ซึ่งผลการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต อาจเกิดจากการออกฤทธิ์ ของ DHA ที่สารมีความเป็นพิษต่อเซลล์ และอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการขัดขวางการทำงานของวัฏ จักรเซลล์โดยไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาของเซลล์ ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ผู้วิจัยจึงยืนยันผลที่ได้โดยทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาของ เซลล์คือ *NcoA3* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม ER-coactivator โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *NcoA3* จะมี การแสดงออกสูงมากขึ้นในเซลล์ที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางคลินิก (Musgrove & Sutherland, 2009) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ DHA เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผล ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *NcoA3* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่ได้ นี้สนับสนุนผลการศึกษาข้างต้นคือ เมื่อให้สารทดสอบร่วมระหว่าง DHA และทาม็อกซิเฟน DHA ไม่มี ผลต่อกระบวนการดื้อยาของเซลล์ โดยฤทธิ์ของ DHA ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนใน กลุ่ม ER-coactivator ยังไม่มีผู้ที่เคยทำการศึกษา

จากการศึกษาของ Mohseni และคณะในปี 2014 โดยการนำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้าน มมาตรวจสอบการแสดงออกของ *MACROD2* พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA เพิ่มสูงขึ้นอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติในเซลล์มะเร็งเต้านมของผู้ป่วยที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน (Mohseni et al., 2014) แต่ยังไม่มีการทดสอบการแสดงออกของ *MACROD2* ในเซลล์ MCF-7/LCC-2 ทางผู้ศึกษาจึงได้ ทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ MCF-7 และ MCF-7/LCC-2 ซึ่งดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน โดยพบว่ามี การแสดงออกของ *MACROD2* เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ MCF-7/LCC- 2 ที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ Mohseni และคณะ นอกจากนี้ยังทำการ ทดสอบผลของ DHA ในเซลล์ MCF-7/LCC-2 พบว่า DHA ไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *MACROD2* สัมพันธ์กับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกใน ระดับ mRNA ของ *NcoA3* ดังนั้น DHA จึงไม่น่าจะมีผลต่อการดื้อยาทาม็อกซิเฟน

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ DHA ผ่านทางกลไกการทำงานอื่นๆ ของเซลล์ โดยเริ่มจากศึกษาฤทธิ์ด้านการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นลง และมีการลุกลามผ่าน matrigel ซึ่งทำหน้าที่เสมือน basement membrane ลดลง สัมพันธ์กับการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่า DHA มีผลยับยั้งกระบวนการ เคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งชนิด fibrosarcoma โดยมีการลดลงของการแสดงออกของ *NF-kB*, *MMP2* และ *MMP9* (Hwang et al., 2010) ซึ่งสัมพันธ์กับการทดสอบครั้งนี้ ที่พบว่า DHA สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *MMP9* ได้เช่นกัน แต่ผลของ DHA ต่อ *CXCR-4* ยังไม่ มีผู้ใดทำการศึกษา นี่จึงเป็นการศึกษาแรกที่ค้นพบว่า DHA สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *CXCR-4* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

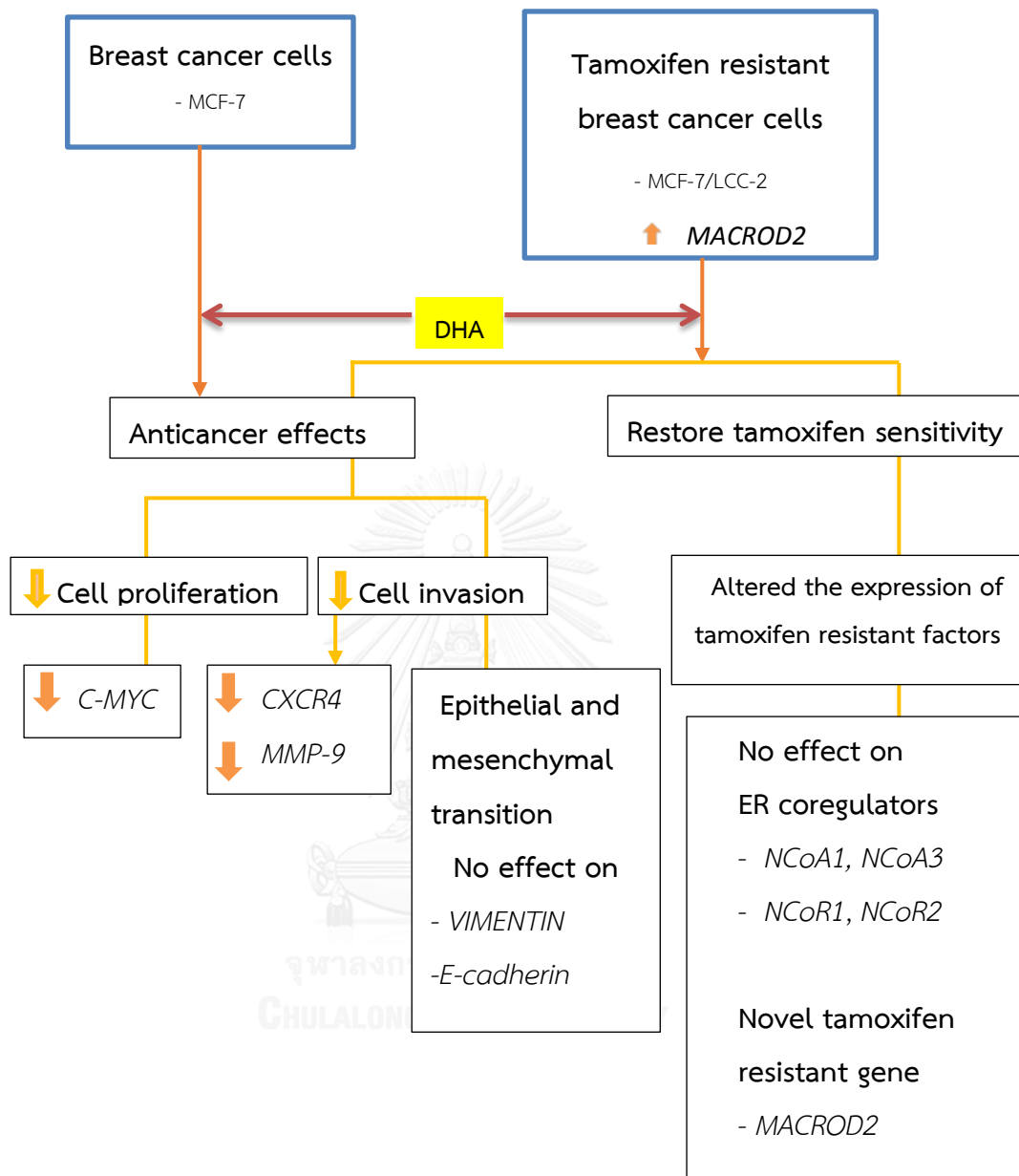
นอกจากการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งผ่านทางกลไกการทำงานของ *MMP-9* และ *CXCR4* แล้ว การศึกษาอื่นยังรายงานว่าเซลล์มะเร็งที่ดีย่อมมีความสามารถในการเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะอื่นได้มากขึ้นจากกระบวนการ EMT โดยการลดลงของ *E-cadherin* (Xu et al., 2009) ผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์ของ DHA เพิ่มเติมในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ EMT marker ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาทาม็อกซิเฟน โดยศึกษาการแสดงออกของ *E-cadherin* และ *Vimentin* พบว่า DHA ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *E-cadherin* และ *Vimentin* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติชี้ให้เห็นว่า DHA ไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งผ่านทางกระบวนการ EMT ผลที่ได้นี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาอื่น ที่ทำการศึกษาผลของ artesunate (ART) ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของอาร์เทมิซินิน ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยการศึกษานี้พบว่า ART มีฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ โดยเพิ่มการแสดงออกของ *E-cadherin* (Li et al., 2008) ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องนี้อาจเกิดจากการศึกษาด้วยอนุพันธ์ของอาร์เทมิซินินต่างชนิดกัน และเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาไม่ใช่เซลล์มะเร็งชนิดเดียวกัน

สรุปได้ว่า DHA มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านทางกลไกการทำงานของ *c-MYC* และมีความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์ผ่านทางกลไกการทำงานของ *MMP-9* และ *CXCR4* แต่ไม่มีผลยับยั้งกระบวนการ EMT นอกจากนี้ DHA ไม่มีฤทธิ์ในการลดการดื้อยาทาม็อกซิเฟนของเซลล์ MCF-7/LCC-2 โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ ER coactivator ที่สำคัญ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ ถือเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่รายงานถึงคุณสมบัติในการต้านมะเร็งของ DHA ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาทาม็อกซิเฟน โดยการศึกษาพบว่า DHA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ผ่านทางการแสดงออกที่ลดลงในระดับ mRNA ของ *c-MYC* และสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ และการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อยาทาม็อกซิเฟน ผ่านทางการแสดงออกที่ลดลงในระดับ mRNA ของ *MMP-9* และ *CXCR4* แต่ไม่มีผลต่อกระบวนการ EMT แต่อย่างไรก็ตามพบว่า DHA ไม่มีฤทธิ์ในการลดการดื้อยาทาม็อกซิเฟนในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *NCoA3* ซึ่งเป็น ER coactivator ที่สำคัญ และยังพบการแสดงออกของ *MACROD2* ที่สูงขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ดื้อยาทาม็อกซิเฟน ซึ่งคาดว่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญที่ใช้ศึกษากลไกการดื้อยาทาม็อกซิเฟนต่อไป แต่ DHA ก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *MACROD2* เช่นกัน

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของ DHA ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ศึกษากลไกการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์โดยวิธี flow cytometry หรือ ศึกษาการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งซึ่งมีผลต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน VEGF เป็นต้น กลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ผ่านทางยีนต่างๆ ล้วนเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาถึงศักยภาพของ DHA ในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต



รูปที่ 17 แสดงกลไกการทำงานของ DHA ผ่านทางกระบวนการต่างๆ ในการต้านเซลล์มะเร็ง

รายการอ้างอิง

- Al Saleh, S., Sharaf, L. H., & Luqmani, Y. A. (2011). Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). *Int J Oncol*, *38*(5), 1197-1217. doi: 10.3892/ijco.2011.942
- Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., & Brawley, O. W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat*, *76*(1), 27-36.
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., . . . Meltzer, P. S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, *277*(5328), 965-968.
- Arimidex, T. A. o. i. C. T. G., Forbes, J. F., Cuzick, J., Buzdar, A., Howell, A., Tobias, J. S., & Baum, M. (2008). Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*, *9*(1), 45-53. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70385-6
- Beelen, K., Zwart, W., & Linn, S. C. (2012). Can predictive biomarkers in breast cancer guide adjuvant endocrine therapy? *Nat Rev Clin Oncol*, *9*(9), 529-541. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.121
- Bergqvist, J., Elmberger, G., Ohd, J., Linderholm, B., Bjohle, J., Hellborg, H., . . . Bergh, J. (2006). Activated ERK1/2 and phosphorylated oestrogen receptor alpha are associated with improved breast cancer survival in women treated with tamoxifen. *Eur J Cancer*, *42*(8), 1104-1112. doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.028
- Berry, M., Metzger, D., & Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, *9*(9), 2811-2818.
- Biswas, D. K., Singh, S., Shi, Q., Pardee, A. B., & Iglehart, J. D. (2005). Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Sci STKE*, *2005*(288), pe27. doi: 10.1126/stke.2882005pe27

- Bosco, E. E., Wang, Y., Xu, H., Zilfou, J. T., Knudsen, K. E., Aronow, B. J., . . . Knudsen, E. S. (2007). The retinoblastoma tumor suppressor modifies the therapeutic response of breast cancer. *J Clin Invest*, *117*(1), 218-228. doi: 10.1172/JCI28803
- Brauch, H., & Jordan, V. C. (2009). Targeting of tamoxifen to enhance antitumour action for the treatment and prevention of breast cancer: the 'personalised' approach? *Eur J Cancer*, *45*(13), 2274-2283. doi: 10.1016/j.ejca.2009.05.032
- Brinton, L. A., Schairer, C., Hoover, R. N., & Fraumeni, J. F., Jr. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest*, *6*(3), 245-254.
- Brodie, A., & Sabnis, G. (2011). Adaptive changes result in activation of alternate signaling pathways and acquisition of resistance to aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res*, *17*(13), 4208-4213. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2920
- Busillo, J. M., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*, *1768*(4), 952-963. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.11.002
- Cariou, S., Donovan, J. C., Flanagan, W. M., Milic, A., Bhattacharya, N., & Slingerland, J. M. (2000). Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(16), 9042-9046. doi: 10.1073/pnas.160016897
- Carroll, J. S., Prall, O. W., Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2000). A pure estrogen antagonist inhibits cyclin E-Cdk2 activity in MCF-7 breast cancer cells and induces accumulation of p130-E2F4 complexes characteristic of quiescence. *J Biol Chem*, *275*(49), 38221-38229. doi: 10.1074/jbc.M004424200
- Chen, H., Sun, B., Pan, S., Jiang, H., & Sun, X. (2009). Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs*, *20*(2), 131-140. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283212ade
- Cottone, E., Orso, F., Biglia, N., Sismondi, P., & De Bortoli, M. (2001). Role of coactivators and corepressors in steroid and nuclear receptor signaling: potential markers of tumor growth and drug sensitivity. *Int J Biol Markers*, *16*(3), 151-166.
- Crespo-Ortiz, M. P., & Wei, M. Q. (2012). Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *J Biomed Biotechnol*, *2012*, 247597. doi: 10.1155/2012/247597

- Cummings, S. R., Lee, J. S., Lui, L. Y., Stone, K., Ljung, B. M., & Cauleys, J. A. (2005). Sex hormones, risk factors, and risk of estrogen receptor-positive breast cancer in older women: a long-term prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *14*(5), 1047-1051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0375
- Deng, B., Yang, X., Liu, J., He, F., Zhu, Z., & Zhang, C. (2010). Focal adhesion kinase mediates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition in vitro. *Mol Cell Biochem*, *340*(1-2), 21-29. doi: 10.1007/s11010-010-0396-7
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, *116*(3), 561-570. doi: 10.1172/JCI27987
- Deryugina, E. I., Luo, G. X., Reisfeld, R. A., Bourdon, M. A., & Strongin, A. (1997). Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res*, *17*(5A), 3201-3210.
- Dhillon, N. K., & Mudryj, M. (2002). Ectopic expression of cyclin E in estrogen responsive cells abrogates antiestrogen mediated growth arrest. *Oncogene*, *21*(30), 4626-4634. doi: 10.1038/sj.onc.1205576
- Dhingra, V., Vishweshwar Rao, K., & Lakshmi Narasu, M. (2000). Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci*, *66*(4), 279-300.
- Doisneau-Sixou, S. F., Sergio, C. M., Carroll, J. S., Hui, R., Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, *10*(2), 179-186.
- Dowsett, M., Smith, I. E., Ebbs, S. R., Dixon, J. M., Skene, A., Griffith, C., . . . A'Hern, R. (2006). Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res*, *12*(3 Pt 2), 1024s-1030s. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2127
- Efferth, T., Benakis, A., Romero, M. R., Tomicic, M., Rauh, R., Steinbach, D., . . . Marschall, M. (2004). Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med*, *37*(7), 998-1009. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.023
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 453-458. doi: 10.1038/nrc1098

- Frasor, J., Danes, J. M., Komm, B., Chang, K. C., Lyttle, C. R., & Katzenellenbogen, B. S. (2003). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*, *144*(10), 4562-4574. doi: 10.1210/en.2003-0567
- Girault, I., Lerebours, F., Amarir, S., Tozlu, S., Tubiana-Hulin, M., Lidereau, R., & Bieche, I. (2003). Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res*, *9*(4), 1259-1266.
- Gomme, P. T., McCann, K. B., & Bertolini, J. (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today*, *10*(4), 267-273. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03333-1
- Gradishar, W. J. (2004). Tamoxifen--what next? *Oncologist*, *9*(4), 378-384.
- Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., . . . Chambon, P. (1986). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem*, *24*(1), 77-83.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, *320*(6058), 134-139. doi: 10.1038/320134a0
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, *346*(5), 340-352. doi: 10.1056/NEJMra000471
- Han, W. D., Zhao, Y. L., Meng, Y. G., Zang, L., Wu, Z. Q., Li, Q., . . . Mu, Y. M. (2007). Estrogenically regulated LRP16 interacts with estrogen receptor alpha and enhances the receptor's transcriptional activity. *Endocr Relat Cancer*, *14*(3), 741-753. doi: 10.1677/ERC-06-0082
- Harigopal, M., Heymann, J., Ghosh, S., Anagnostou, V., Camp, R. L., & Rimm, D. L. (2009). Estrogen receptor co-activator (AIB1) protein expression by automated quantitative analysis (AQUA) in a breast cancer tissue microarray and association with patient outcome. *Breast Cancer Res Treat*, *115*(1), 77-85. doi: 10.1007/s10549-008-0063-9

- Hou, J., Wang, D., Zhang, R., & Wang, H. (2008). Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clin Cancer Res*, *14*(17), 5519-5530. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0197
- Howell, A., Robertson, J. F., Abram, P., Lichinitser, M. R., Elledge, R., Bajetta, E., . . . Osborne, C. K. (2004). Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial. *J Clin Oncol*, *22*(9), 1605-1613. doi: 10.1200/JCO.2004.02.112
- Hsieh, C. C., Trichopoulos, D., Katsouyanni, K., & Yuasa, S. (1990). Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*, *46*(5), 796-800.
- Hu, W., Chen, S. S., Zhang, J. L., Lou, X. E., & Zhou, H. J. (2014). Dihydroartemisinin induces autophagy by suppressing NF-kappaB activation. *Cancer Lett*, *343*(2), 239-248. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.035
- Hui, R., Finney, G. L., Carroll, J. S., Lee, C. S., Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2002). Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res*, *62*(23), 6916-6923.
- Hwang, Y. P., Yun, H. J., Kim, H. G., Han, E. H., Lee, G. W., & Jeong, H. G. (2010). Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by dihydroartemisinin via inhibition of PKCalpha/Raf/MAPKs and NF-kappaB/AP-1-dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol*, *79*(12), 1714-1726. doi: 10.1016/j.bcp.2010.02.003
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, *61*(2), 69-90. doi: 10.3322/caac.20107
- Johnson, L. L., Dyer, R., & Hupe, D. J. (1998). Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol*, *2*(4), 466-471.

- Jordan, V. C., & O'Malley, B. W. (2007). Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*, *25*(36), 5815-5824. doi: 10.1200/JCO.2007.11.3886
- Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., & Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, *275*(24), 18447-18453. doi: 10.1074/jbc.M910345199
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, *119*(6), 1420-1428. doi: 10.1172/JCI39104
- Kressler, D., Hock, M. B., & Kralli, A. (2007). Coactivators PGC-1beta and SRC-1 interact functionally to promote the agonist activity of the selective estrogen receptor modulator tamoxifen. *J Biol Chem*, *282*(37), 26897-26907. doi: 10.1074/jbc.M705596200
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. R., & Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, *51*(6), 941-951.
- Kurokawa, H., Lenferink, A. E., Simpson, J. F., Pisacane, P. I., Sliwkowski, M. X., Forbes, J. T., & Arteaga, C. L. (2000). Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res*, *60*(20), 5887-5894.
- Lai, H., & Singh, N. P. (1995). Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Lett*, *91*(1), 41-46.
- Lai, H., & Singh, N. P. (2006). Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Lett*, *231*(1), 43-48. doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.019
- Lavinsky, R. M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T. M., Schiff, R., . . . Rose, D. W. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(6), 2920-2925.
- Liabakk, N. B., Talbot, I., Smith, R. A., Wilkinson, K., & Balkwill, F. (1996). Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res*, *56*(1), 190-196.

- Liotta, L. A., Steeg, P. S., & Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, *64*(2), 327-336.
- Lu, J. J., Meng, L. H., Shankavaram, U. T., Zhu, C. H., Tong, L. J., Chen, G., . . . Ding, J. (2010). Dihydroartemisinin accelerates c-MYC oncoprotein degradation and induces apoptosis in c-MYC-overexpressing tumor cells. *Biochem Pharmacol*, *80*(1), 22-30. doi: 10.1016/j.bcp.2010.02.016
- Lu, Y. Y., Chen, T. S., Qu, J. L., Pan, W. L., Sun, L., & Wei, X. B. (2009). Dihydroartemisinin (DHA) induces caspase-3-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *J Biomed Sci*, *16*, 16. doi: 10.1186/1423-0127-16-16
- Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2011). Minireview: steroid receptor coactivator-3: a multifarious coregulator in mammary gland metastasis. *Endocrinology*, *152*(1), 19-25. doi: 10.1210/en.2010-1012
- Marino, M., & Ascenzi, P. (2008). Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids*, *73*(9-10), 853-858. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.003
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, *20*(3), 321-344. doi: 10.1210/edrv.20.3.0366
- Meshnick, S. R. (2002). Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol*, *32*(13), 1655-1660.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., & Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*, *15*(6), 1292-1300.
- Mohseni, M., Cidado, J., Croessmann, S., Cravero, K., Cimino-Mathews, A., Wong, H. Y., . . . Park, B. H. (2014). MACROD2 overexpression mediates estrogen independent growth and tamoxifen resistance in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(49), 17606-17611. doi: 10.1073/pnas.1408650111

- Moore, J. C., Lai, H., Li, J. R., Ren, R. L., McDougall, J. A., Singh, N. P., & Chou, C. K. (1995). Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Lett*, *98*(1), 83-87.
- Mukherjee, D., & Zhao, J. (2013). The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*, *3*(1), 46-57.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., . . . Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, *410*(6824), 50-56. doi: 10.1038/35065016
- Murphy, L. C., Simon, S. L., Parkes, A., Leygue, E., Dotzlaw, H., Snell, L., . . . Watson, P. H. (2000). Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, *60*(22), 6266-6271.
- Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, *9*(9), 631-643. doi: 10.1038/nrc2713
- Nakase, I., Gallis, B., Takatani-Nakase, T., Oh, S., Lacoste, E., Singh, N. P., . . . Sasaki, T. (2009). Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis. *Cancer Lett*, *274*(2), 290-298. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.023
- Nakase, I., Lai, H., Singh, N. P., & Sasaki, T. (2008). Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *Int J Pharm*, *354*(1-2), 28-33. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.09.003
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr., & Sledge, G. W., Jr. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol*, *17*(7), 3629-3639.
- Nicholson, R. I., Hutcheson, I. R., Jones, H. E., Hiscox, S. E., Giles, M., Taylor, K. M., & Gee, J. M. (2007). Growth factor signalling in endocrine and anti-growth factor resistant breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*, *8*(3), 241-253. doi: 10.1007/s11154-007-9033-5
- Noori, S., & Hassan, Z. M. (2012). Tehranolide inhibits proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by inducing G0/G1 arrest and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, *52*(9), 1987-1999. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.026

- Norris, J. D., Fan, D., Kerner, S. A., & McDonnell, D. P. (1997). Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, *11*(6), 747-754. doi: 10.1210/mend.11.6.0008
- O'Neill, P. M. (2004). Medicinal chemistry: a worthy adversary for malaria. *Nature*, *430*(7002), 838-839. doi: 10.1038/430838a
- Oh, S., Kim, B. J., Singh, N. P., Lai, H., & Sasaki, T. (2009). Synthesis and anti-cancer activity of covalent conjugates of artemisinin and a transferrin-receptor targeting peptide. *Cancer Lett*, *274*(1), 33-39. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.031
- Osborne, C. K. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, *339*(22), 1609-1618. doi: 10.1056/NEJM199811263392207
- Osborne, C. K., & Schiff, R. (2005). Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol*, *23*(8), 1616-1622. doi: 10.1200/JCO.2005.10.036
- Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A., & Shou, J. (2001). Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res*, *7*(12 Suppl), 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Pike, M. C., Spicer, D. V., Dahmouh, L., & Press, M. F. (1993). Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, *15*(1), 17-35.
- Prall, O. W., Rogan, E. M., Musgrove, E. A., Watts, C. K., & Sutherland, R. L. (1998). c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. *Mol Cell Biol*, *18*(8), 4499-4508.
- Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., & Levin, E. R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol*, *16*(1), 100-115. doi: 10.1210/mend.16.1.0757
- Redmond, A. M., Bane, F. T., Stafford, A. T., McIlroy, M., Dillon, M. F., Crotty, T. B., . . . Young, L. S. (2009). Coassociation of estrogen receptor and p160 proteins predicts resistance to endocrine treatment; SRC-1 is an independent predictor of breast cancer recurrence. *Clin Cancer Res*, *15*(6), 2098-2106. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1649

- Ring, A., & Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer*, *11*(4), 643-658. doi: 10.1677/erc.1.00776
- Robertson, J. F., Osborne, C. K., Howell, A., Jones, S. E., Mauriac, L., Ellis, M., . . . Morris, C. (2003). Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma in postmenopausal women: a prospective combined analysis of two multicenter trials. *Cancer*, *98*(2), 229-238. doi: 10.1002/cncr.11468
- Russo, J., Ao, X., Grill, C., & Russo, I. H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat*, *53*(3), 217-227.
- Salo, T., Makela, M., Kylmaniemi, M., Autio-Harmanen, H., & Larjava, H. (1994). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest*, *70*(2), 176-182.
- Santibanez, J. F., Kocic, J., Fabra, A., Cano, A., & Quintanilla, M. (2010). Rac1 modulates TGF-beta1-mediated epithelial cell plasticity and MMP9 production in transformed keratinocytes. *FEBS Lett*, *584*(11), 2305-2310. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.042
- Sas, L., Lardon, F., Vermeulen, P. B., Hauspy, J., Van Dam, P., Pauwels, P., . . . Van Laere, S. J. (2012). The interaction between ER and NFkappaB in resistance to endocrine therapy. *Breast Cancer Res*, *14*(4), 212. doi: 10.1186/bcr3196
- Schiff, R., Massarweh, S. A., Shou, J., Bharwani, L., Mohsin, S. K., & Osborne, C. K. (2004). Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res*, *10*(1 Pt 2), 331S-336S.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, *62*(1), 10-29. doi: 10.3322/caac.20138
- Smith, C. L., Nawaz, Z., & O'Malley, B. W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*, *11*(6), 657-666. doi: 10.1210/mend.11.6.0009

- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, *51*(5), 1409-1416.
- Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, *10*(6), 415-433. doi: 10.1006/scbi.2000.0379
- Strasser-Weippl, K., & Goss, P. E. (2005). Advances in adjuvant hormonal therapy for postmenopausal women. *J Clin Oncol*, *23*(8), 1751-1759. doi: 10.1200/JCO.2005.11.038
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., & Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, *59*(3), 477-487.
- Tzukerman, M. T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M. G., Stein, R. B., . . . McDonnell, D. P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*, *8*(1), 21-30. doi: 10.1210/mend.8.1.8152428
- Varma, H., Skildum, A. J., & Conrad, S. E. (2007). Functional ablation of pRb activates Cdk2 and causes antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *PLoS One*, *2*(12), e1256. doi: 10.1371/journal.pone.0001256
- Venditti, M., Iwasiow, B., Orr, F. W., & Shiu, R. P. (2002). C-myc gene expression alone is sufficient to confer resistance to antiestrogen in human breast cancer cells. *Int J Cancer*, *99*(1), 35-42.
- Wang, L. H., Yang, X. Y., Zhang, X., An, P., Kim, H. J., Huang, J., . . . Farrar, W. L. (2006). Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell*, *10*(6), 487-499. doi: 10.1016/j.ccr.2006.09.015
- Wang, Y., Dean, J. L., Millar, E. K., Tran, T. H., McNeil, C. M., Burd, C. J., . . . Knudsen, E. S. (2008). Cyclin D1b is aberrantly regulated in response to therapeutic challenge and promotes resistance to estrogen antagonists. *Cancer Res*, *68*(14), 5628-5638. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3170

- Wang, Z., Yu, Y., Ma, J., Zhang, H., Zhang, H., Wang, X., . . . Zhang, Q. (2012). LyP-1 modification to enhance delivery of artemisinin or fluorescent probe loaded polymeric micelles to highly metastatic tumor and its lymphatics. *Mol Pharm*, *9*(9), 2646-2657. doi: 10.1021/mp3002107
- Webster, N. J., Green, S., Tasset, D., Ponglikitmongkol, M., & Chambon, P. (1989). The transcriptional activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded in a single exon. *EMBO J*, *8*(5), 1441-1446.
- Weifeng, T., Feng, S., Xiangji, L., Changqing, S., Zhiqian, Q., Huazhong, Z., . . . Wan-Yee, L. (2011). Artemisinin inhibits in vitro and in vivo invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine*, *18*(2-3), 158-162. doi: 10.1016/j.phymed.2010.07.003
- Weigel, M. T., Ghazoui, Z., Dunbier, A., Pancholi, S., Dowsett, M., & Martin, L. A. (2012). Preclinical and clinical studies of estrogen deprivation support the PDGF/Abl pathway as a novel therapeutic target for overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res*, *14*(3), R78. doi: 10.1186/bcr3191
- Westermarck, J., & Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, *13*(8), 781-792.
- Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E. M., Hebert, J. M., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., . . . Klein, T. E. (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*, *92*(4), 414-417. doi: 10.1038/clpt.2012.96
- White, N. J. (2004). Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, *113*(8), 1084-1092. doi: 10.1172/JCI21682
- Wu, G. D., Zhou, H. J., & Wu, X. H. (2004). Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by artesunate. *Vascul Pharmacol*, *41*(6), 205-212. doi: 10.1016/j.vph.2004.11.001
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, *19*(2), 156-172. doi: 10.1038/cr.2009.5
- Yang, J. J., Park, S. K., Cho, L. Y., Han, W., Park, B., Kim, H., . . . Korean Breast Cancer, S. (2010). Cost-effectiveness analysis of 5 years of postoperative adjuvant tamoxifen therapy for Korean women with breast cancer: retrospective cohort

- study of the Korean breast cancer society database. *Clin Ther*, 32(6), 1122-1138. doi: 10.1016/j.clinthera.2010.05.013
- Youns, M., Efferth, T., Reichling, J., Fellenberg, K., Bauer, A., & Hoheisel, J. D. (2009). Gene expression profiling identifies novel key players involved in the cytotoxic effect of Artesunate on pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 78(3), 273-283. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.014
- Zhang, S., Ma, Y., Jiang, J., Dai, Z., Gao, X., Yin, X., . . . Min, W. (2014). Inhibition of urokinase-type plasminogen activator expression by dihydroartemisinin in breast cancer cells. *Oncol Lett*, 7(5), 1375-1380. doi: 10.3892/ol.2014.1918
- Zhou, Y., Yau, C., Gray, J. W., Chew, K., Dairkee, S. H., Moore, D. H., . . . Benz, C. C. (2007). Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer*, 7, 59. doi: 10.1186/1471-2407-7-59
- Zilli, M., Grassadonia, A., Tinari, N., Di Giacobbe, A., Gildetti, S., Giampietro, J., . . . Consorzio Interuniversitario Nazionale per la, B.-O. (2009). Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1795(1), 62-81. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.08.003

ภาคผนวก



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิศากร พรสมชัย เกิดวันที่ 27 ตุลาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนน่านคริสเตียนศึกษา และระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี ในปี พ.ศ. 2549 เข้าศึกษาต่อในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีทันตแพทยศาสตรบัณฑิต ในปี พ.ศ. 2555

ปัจจุบันศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

