ผลการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านม

นางสาวธีริศรา ตันเจริญลาภ

นางสาวสุชา ธาดาคุณากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Enhancement effect of Rhinacanthin-C on anti-cancer drug in breast cancer cells

Miss Theerissara Tancharoenlarb

Miss Sucha Thadakunakorn

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2016

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	ผลการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านม
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวธีริศรา ตันเจริญลาภ นางสาวสุชา ธาดาคุณากร
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนายา/เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนายา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์ถือเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อันมีวัตถุประสงค์ให้นิสิตเภสัชศาสตร์ได้ฝึกฝนตนเองให้มีความสามารถในการคิดและแก้ปัญหาอย่างเป็นระบบ มีความรู้ความสามารถในการวางแผนและดำเนินงาน สามารถร่วมพัฒนาและสรรค์สร้างงานทางด้านเภสัชศาสตร์จากองค์ความรู้ที่ได้รับจากการเรียนการสอน

รายงานนี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอโครงการปริญญานิพนธ์ในหัวข้อ “ผลการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านม” โดยเนื้อหาของรายงานได้กล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งในแต่ละขั้นตอนได้มีการอธิบายไว้ในเนื้อหาของแต่ละบท ประกอบไปด้วย ส่วนของบทนำ เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งกล่าวถึงที่มาของการทำโครงการปริญญานิพนธ์เรื่องนี้ วิธีการดำเนินการวิจัย ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ ที่น่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย

รายงานโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้จัดทำขึ้นด้วยความตั้งใจ และความพยายามตลอดการศึกษาวิจัย คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจทั้งในสายงานที่เกี่ยวข้อง เป็นแนวทางและแรงบันดาลใจให้เกิดการสร้างสรรค์งานวิจัยใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อสังคมและประเทศชาติต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คณะผู้จัดทำ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โครงการลำดับที่ 3.9

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ : ผลการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็ง ในเซลล์มะเร็งเต้านม

หัวหน้าโครงการ : นางสาวธีริศรา ตันเจริญลาภ 5536838233

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวสุชา ธาดาคุณากร 5536582833

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล

สาขา/ภาควิชา : การค้นพบและพัฒนายา/เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

สารไรนาแคนทิน-ซี เป็นสารที่ได้จากใบและรากของต้นทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* KURZ.) สารนี้อยู่ในกลุ่ม naphthoquinone ester โดยพบว่าสารไรนาแคนทิน-ซี จะไปรบกวนการทำงานของทั้ง P-gp และ MRP2 efflux pump โดยออกฤทธิ์กับ P-gp ได้ดีกว่า ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงประโยชน์ในการนำสารดังกล่าวมาศึกษา โดยให้ร่วมกับยาต้านมะเร็งต่างๆ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งในเซลล์ให้ความเข้มข้นถึงระดับที่ต้องการ แล้วทำให้ไม่ต้องเพิ่มขนาดของยาต้านมะเร็ง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อยาต้านมะเร็ง 4 ตัว ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine โดยยาทั้ง 4 ตัวนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันและอยู่ต่างกลุ่มกัน โดยเซลล์ที่ใช้เป็นแบบจำลอง คือ เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เริ่มต้นทำการศึกษาการทำงานของ P-gp, MRP1 และ MRP2 บนของผิวเซลล์มะเร็ง MCF-7 โดยวิธี uptake assay ซึ่งเปรียบเทียบการสะสมของสารเรืองแสงในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะกับโปรตีนขนส่งยานั้นๆ กับกลุ่มโปรตีนที่ได้รับสับเสตรทเพียงอย่างเดียว พบว่ามีการสะสมของสารเรืองแสงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสับเสตรทของ P-gp, MRP1 และ MRP2 8.0 เท่า 1.4 เท่า และ 2.6 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า มีเพียง P-gp และ MRP2 ที่มีการทำงานและการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าบนผิวเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง MCF-7 มีการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งยาที่สอดคล้องกับการทำงานของสารไรนาแคนทิน-ซี ที่ยับยั้งการทำงานของ P-gp และ MRP-2

จากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay โดยให้สารไรนาแคนทิน-ซี 0.1 nM ร่วมกับยามะเร็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารไรนาแคนทิน-ซี ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ยามะเร็งทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

แต่อย่างไรก็ตามอาจต้องมีการศึกษาสารไรนาแคนทิน-ซี ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพิ่มเติม เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ช่วยเสริมฤทธิ์ของยามะเร็ง และไม่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น

คณะเภสัชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Project No. 3.9

Academic year 2016

Abstract

Project title : Enhancement effect of Rhinacanthin-C on anti-cancer drug in breast cancer cells

Students' name : Miss Theerissara Tancharoenlarb 5536538233

Miss Sucha Thadakunakorn 5536582833

Advisor : Assoc. Prof. Suree Jianmongkol Ph.D.

Field/Department : Drug Discovery and Development/Pharmacology and Physiology

Rhinacanthin-C is a naphthoquinone ester derivative which was isolated from leaves and roots of *Rhinacanthus nasutus* Kurz(Acanthaceae); additionally, several studies have revealed that Rhinacanthin-C has ability to interfere normal function as efflux pump of P-gp and MRP2. Hence, using this agent with cytotoxic agents might raise intracellular concentration of cytotoxic agents in cancer cell to reach the effective cytotoxic concentration without titrating up its concentration. In this project, we aim to study an enhancement effect of Rhinacanthin-C on 4 cytotoxic agents which have different mechanisms of action including doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen, and vinblastine in MCF-7 cell line that was cultured in an appropriate environment.

Initially, the activities of P-gp, MRP1, and MRP2 on the surface of MCF-7 cell line were determined by using uptake assay which will compare fluorescence intensity between MCF-7 cell line that was treated with a known efflux pump inhibitor and a specific substrate of each transporter with MCF-7 cell line that was given individually specific substrate. The result showed that the fluorescence intensity of P-gp, MRP1, and MRP2 are 8.0, 1.4, and 2.6 fold, respectively. However, only P-gp and MRP2 had significant expression and function. Obviously, the surface of MCF-7 cell line had the expression and function of transporters which correspond to the function of Rhinacanthin-C which is P-gp and MRP2 inhibitor.

The following step, cell viability test, was conducted by using MTT assay. MCF-7 cell line was treated for 48 hours with Rhinacanthin-C at 0.1 nM and cytotoxic agents. All in all, Rhinacanthin-C could not enhance effect of cytotoxic agents.

The further study regarding to Rhinacanthin-C at the higher concentration might be needed in order to find out proper concentration that can enhance the effect of cytotoxic agents.

Faculty of Pharmaceutical Sciences Student's signature .....

Chulalongkorn University Advisor's signature .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ นายทัศรุจน์ ชัยสิทธิ์ และนางสาวพลอย วรรณภากร ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา อบรมทักษะ การฝึกปฏิบัติด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง การให้ยากับเซลล์มะเร็ง และให้การสนับสนุนเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่ใช้ในโครงการนี้

ขอขอบคุณ นิสิตบัณฑิตศึกษา นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับแนวทางปฏิบัติในการวิจัย ความกรุณาเอื้อเฟื้อและความช่วยเหลือในการทำการทดลองตลอดโครงการ

ขอขอบคุณฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเงินทุนในการดำเนินโครงการ

ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ และศูนย์คอมพิวเตอร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินโครงการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		ง
Abstract		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญภาพ		ฌ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	1.3 วิธีการดำเนินงานโดยย่อ	2
	1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	2.1 โรคมะเร็งและการดื้อยา	4
	2.2 ความสำคัญของ Transporter กับยามะเร็ง	5
	2.3 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลอง	7
	2.4 การวัดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay	7
	2.5 การวัดการทำงานของโปรตีนตัวขนส่งยา (Uptake Transporter Assay)	8
3	วิธีดำเนินการวิจัย	9
	3.1 สารไรนาแคนทิน-ซี	9
	3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	9
	3.3 สารเคมี	9
	3.4 เซลล์มะเร็ง MCF-7	10
	3.5 วิธีการศึกษา	10
	3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	13
4	ผลการวิจัย	14
	4.1 ผลทดสอบการทำงานของโปรตีนตัวขนส่งยา MRP1, MRP2 และ P-gp	14
	4.2 ผลของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7	16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
5	อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	19
รายการอ้างอิง		21

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การ reduced สาร MTT เป็นผลึก formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase	8
2	ผลการทำงานของ MRP1 บนผิวเซลล์ MCF-7	14
3	ผลการทำงานของ MRP2 บนผิวเซลล์ MCF-7	15
4	ผลการทำงานของ P-gp บนผิวเซลล์ MCF-7	15
5	ผลของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อการเสริมฤทธิ์ยา doxorubicin	16
6	ผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยา mitoxantrone	17
7	ผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยา tamoxifen	17
8	ผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยา vinblastine	18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของคนทั่วโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก พบว่าในปี พ.ศ. 2551 มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 7.6 ล้านคน คิดเป็น 13% จากสาเหตุการเสียชีวิตของคนทั่วโลก ซึ่งมากกว่าจำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน (กระทรวงสาธารณสุข, 2556) โดยมะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้หญิง และเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในผู้หญิง (CDC, 2015a) มะเร็งชนิดนี้สามารถพบได้ในทุกช่วงอายุของผู้หญิง โดยความรุนแรงของอาการจะมากขึ้นตามอายุ (CDC, 2015b) ในปัจจุบันพบว่า อัตราการเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้น เนื่องจากประชากรสัมผัสปัจจัยเสี่ยงมากขึ้น เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ พักผ่อนไม่เพียงพอ การรักษาด้วยการใช้ฮอร์โมนทดแทนเป็นระยะเวลานาน เป็นต้น ในส่วนของการรักษาด้วยยาต้านมะเร็งที่มีการใช้ในปัจจุบันก็พบว่ามีการดื้อของเซลล์มะเร็งต่อยาในอัตราสูง ทั้งนี้กลไกการดื้อยาส่วนหนึ่งอยู่ในลักษณะ multidrug resistance (MDR) นั่นคือเซลล์มะเร็งดื้อต่อยาหลายกลุ่มที่มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ส่วนหนึ่งเกิดจากเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งยากลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins เช่น P-glycoprotein(P-gp) บนผิวของเซลล์มะเร็งมากขึ้น และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาด้วยยาต้านมะเร็งล้มเหลว เนื่องจากโปรตีนตัวพากลุ่มนี้ขับยาออกนอกเซลล์ (Eid et al., 2012) ยาต้านมะเร็งหลายกลุ่ม เช่น vinblastine, doxorubicin เป็นทั้งสับสเตรทและตัวกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของ ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins บนผิวของเซลล์มะเร็ง ดังเช่นการดื้อยา vinblastine ส่วนหนึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ P-gp ที่เป็น efflux pump transporter เพิ่มมากขึ้น ทำให้เซลล์มะเร็งดื้อยากลุ่ม vinca alkaloids จะดื้อยากลุ่มอื่น เช่น mitoxantrone (Wongwanakul et al., 2013; วัชรี ลิ้มปนสิทธิกุล, 2555) ที่เป็นดังนี้เพราะตัวขนส่งยาออก (efflux pump) ทำให้ยาต้านมะเร็งเหล่านี้ถูกกำจัดออกจากเซลล์มะเร็งก่อนที่ความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งจะสูงพอที่จะทำลายเซลล์มะเร็ง และนำมาสู่การเพิ่มขนาดการใช้ยาเพื่อให้ระดับความเข้มข้นของยาในเซลล์มะเร็งสูงถึงระดับที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้ แต่การเพิ่มขนาดยาอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดผลข้างเคียงของยาต้านมะเร็งเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ความร่วมมือในการใช้ยาต้านมะเร็งของผู้ป่วยลดลง ซึ่งส่งผลให้การรักษาด้วยยาต้านมะเร็งล้มเหลว

ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ซึ่งเป็นสารที่ได้จากใบและรากของต้นทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* KURZ.) สารนี้อยู่ในกลุ่ม naphthoquinone ester โดยพบว่าสารไรนาแคนทิน-ซี จะไปรบกวนการทำงานของทั้ง P-gp และ MRP2 efflux pump โดยออกฤทธิ์กับ P-gp ได้ดีกว่า (Wongwanakul et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานล่าสุดพบว่า สารไรนาแคนทิน-ซี ที่

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ความเข้มข้น 0.1 μM สามารถเพิ่มการสะสมของยา doxorubicin ในเซลล์ MCF-7 ได้ (chaisit et al., 2017) ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์ในการนำสารดังกล่าวมาศึกษา โดยให้ร่วมกับยาต้านมะเร็งต่างๆ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งในเซลล์ให้ความเข้มข้นถึงระดับที่ต้องการ แล้วทำให้ไม่ต้องเพิ่มขนาดของยาต้านมะเร็งให้สูงขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของสารไรนาแคนทิน-ซีในขนาดต่ำต่อยาต้านมะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine โดยยาทั้ง 4 ชนิดนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันและอยู่ต่างกลุ่มกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารไรนาแคนทิน-ซี ในขนาดต่ำต่อการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม

1.3 วิธีดำเนินงานโดยย่อ

1. เลี้ยงเซลล์มะเร็ง MCF-7 และทดสอบการแสดงออกของ P-gp, MRP1 และ MRP2 ซึ่งเป็นตัวขนส่งยาในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins
2. เลือกความเข้มข้นที่ต้องการศึกษาของสารไรนาแคนทิน-ซี โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง MCF-7
3. ศึกษาความเป็นพิษของยาต้านมะเร็งทั้ง 4 ชนิด (doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine) ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีสารไรนาแคนทิน-ซี โดยวิธี MTT assay

   3.1 ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MCF-7 ในสภาวะที่มีและไม่มีสารไรนาแคนทิน-ซี โดยแบ่งกลุ่ม ดังนี้

   1) กลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว

   2) กลุ่มที่ได้รับยา doxorubicin ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6-7 ความเข้มข้น (± สารไรนาแคนทิน-ซี)

   3) กลุ่มที่ได้รับยา mitoxantrone ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6-7 ความเข้มข้น (± สารไรนาแคนทิน-ซี)

   4) กลุ่มที่ได้รับยา tamoxifen ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6-7 ความเข้มข้น (± สารไรนาแคนทิน-ซี)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

5) กลุ่มที่ได้รับยา vinblastine ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6-7 ความเข้มข้น (± สารไรนาแคนทิน-ซี)

4. ประมวลผลข้อมูลที่ได้จากการทดลอง และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Dose-response curve) ในสภาวะที่มีและไม่มีสารไรนาแคนทิน-ซี เพื่อคำนวณหาค่า Combination Index (CI) และ Cytotoxic Enhancement Ratio (CER) ค่าดังกล่าวจะใช้สำหรับการประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซี ในยาต้านมะเร็งทั้ง 4 ชนิด
5. วิเคราะห์และแปลผลข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยหรือพัฒนาสารไรนาแคนทิน-ซีเป็นยาเพื่อใช้เสริมฤทธิ์ในการรักษาของยาต้านมะเร็งได้ในอนาคต
2. องค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกในการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็งของสารไรนาแคนทิน-ซี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคมะเร็งและการดื้อยา

มะเร็ง คือเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตอย่างควบคุมไม่ได้ มีการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (local tissue invasion) และมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น (distant metastases) ได้ (DiPiro et al., 2012) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของประชากรทั่วโลก โดยจากข้อมูลในปี ค.ศ. 2012 พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ถึง 14 ล้านรายทั่วโลก มีผู้ป่วยมะเร็งเสียชีวิตมากถึง 8.2 ล้านราย ซึ่งจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่นั้นเพิ่มสูงขึ้นถึง 70% ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา โดยโรคมะเร็งที่พบมากสุด 5 อันดับแรกในผู้หญิงคือ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งกระเพาะอาหาร (WHO, 2015) จะเห็นได้ว่ามะเร็งเต้านมพบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้หญิง

จากการรวบรวมข้อมูลของ Genevieve และคณะ พบว่าโรคมะเร็งนั้นเมื่อได้รับการรักษาไปเป็นระยะเวลาหนึ่ง เซลล์มะเร็งสามารถที่จะพัฒนาตนเองจะสามารถที่จะทนต่อการรักษาได้ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องหาวิธีการรักษาที่เหมาะสมต่อไป (Genevieve et al.,2014) โดยกลไกการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น เซลล์มะเร็งหลั่งสารบางชนิดออกมา ทำให้ยามะเร็งไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ หรือเป้าหมายที่ยามะเร็งจะเข้าจับกับเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลง หรือยาถูกขับออกจากเซลล์มะเร็งอย่างรวดเร็วจนเหลือปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้ หรือเกิดการยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็ง (cell death inhibition) เป็นต้น

การดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistance) เป็นปรากฏการณ์ที่พบว่าเมื่อเซลล์มะเร็งดื้อยาที่ใช้รักษาแล้ว จะดื้อยาชนิดอื่นที่มีโครงสร้างโมเลกุลต่างกันหรือกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันด้วย และจัดเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดล้มเหลว โดยการดื้อยาหลายขนานนั้นมีความเกี่ยวข้องกับตัวนำส่งยากลุ่ม ATP-binding cassette domains (ABC transporters) ที่มีหน้าที่กำจัดสารพิษออกจากเซลล์ โดยมีการศึกษาในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา พบว่าที่ผิวของเซลล์มะเร็งจะมีการแสดงออกของ ABC transporters มากกว่าปกติ และกลไกการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistance) มีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของ P-gp (หรือ ABCB), MRP1 (หรือ ABCC1) และ BCRP (หรือ ABCG2) ที่มากกว่าเซลล์ชนิดที่ไม่ดื้อยาด้วย ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามี ABC transporters อย่างน้อย 12 ตัว จาก ABC subfamilies 4 กลุ่มที่มีบทบาทต่อการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง (Szakács et al., 2006)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.2 ความสำคัญของ Transporter กับยามะเร็ง

ที่ผ่านมาการรักษา metastatic breast cancer (MBC) มีการใช้ยากลุ่มต่างๆ เป็น first-line หรือ second-line ดังนี้ ในช่วงปี ค.ศ. 1980 -1989 เป็นยุคของยากลุ่ม anthracycline (เช่น doxorubicin, mitoxantrone) ช่วงปีค.ศ. 1990-1999 เป็นยุคของยากลุ่ม taxane ต่อมาในช่วงปี 2000-2009 เป็นยุคของยากลุ่ม biologic (คือ ผลิตภัณฑ์โมเลกุลที่ซับซ้อน เกิดจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจได้มาจากระดับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เช่น น้ำตาล โปรตีน นิวคลีอิคแอซิด) นอกจากนี้ยังมีการรักษาแบบ combination เช่นการให้ยาต้านมะเร็ง ร่วมกับ targeted therapy ซึ่งช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา (Stebbing and Glassman, 2004; National Comprehensive Cancer Network, 2005) อย่างไรก็ตามทั้งๆที่มีการพัฒนายาต้านมะเร็งและวิธีการรักษา แต่อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย MBC ในสหรัฐอเมริกาเพิ่มขึ้นเพียง 26% (National Cancer Institute, 2005) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าประมาณ 90% ของผู้ป่วย MBC ประสบภาวะการรักษาล้มเหลวซึ่งเกิดจากการดื้อของเซลล์มะเร็งต่อยาต้านมะเร็ง (Longley et al., 2005) การดื้อต่อยาต้านมะเร็งนั้นมีหลายกลไก เช่น การเปลี่ยนเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา (Drug target alteration) การยับยั้งการตายของเซลล์ (Cell death inhibition) (Housman et al., 2014) โดยกลไกที่มีการศึกษามาก คือ การดื้อยาของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับตัวนำส่งยากลุ่ม ATP-binding cassette domains (ABC transporters) ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นที่ผิวของเซลล์มะเร็ง ซึ่งถือเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิด multidrug resistance (MDR) นั่นคือเซลล์มะเร็งดื้อต่อยาหลายกลุ่มที่มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน (Eid, 2012) มีการศึกษาพบว่า ยาต้านมะเร็งหลายกลุ่ม เช่น vinblastine, doxorubicin เป็นทั้งสับสเตรทและตัวกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของ ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins บนผิวของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นหากเซลล์ดื้อยาที่ใช้รักษาเป็น substrate ของ ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins เช่น vinca alkaloids จะดื้อยาต้านมะเร็งตัวอื่นๆด้วย (Wongwanakul et al., 2013; วัชรี ลิ้มปนสิทธิกุล, 2555) การดื้อต่อยาต้านมะเร็งข้างต้นเกิดจากการที่ยาต้านมะเร็งถูกกำจัดออกจากเซลล์มะเร็งก่อนที่ความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งจะสูงพอที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้ จึงนำมาสู่การเพิ่มขนาดการใช้ยาเพื่อให้ระดับความเข้มข้นของยาในเซลล์มะเร็งสูงถึงระดับที่จะทำลายเซลล์มะเร็ง แต่การกระทำนี้อาจทำให้ผู้ป่วยเกิดผลข้างเคียงของยาต้านมะเร็งเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ความร่วมมือในการใช้ยาต้านมะเร็งของผู้ป่วยลดลง และนำไปสู่การล้มเหลวในการรักษาด้วยยาต้านมะเร็ง (Helen, 2008)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตัวขนส่งยาออกเป็นโปรตีนในกลุ่ม ABC transporter เช่น P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance-associated protein 1(MRP1) และ multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) ซึ่งถือเป็นโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง และได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง มีรายละเอียดที่น่าสนใจดังนี้

P-gp ถูกพบครั้งแรกในเซลล์รังไข่ของ Chinese hamster ในปี ค.ศ.1976 (Juliano et al., 1976) จากการศึกษาในมนุษย์และหนูพบว่า P-gp มีปริมาณมากที่ตำแหน่งด้านบน (apical) ของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้ใหญ่ ลำไส้เล็ก ท่อตับอ่อน ท่อน้ำดี หลอดไตฝอยส่วนต้น ต่อมหมวกไต และเซลล์สร้างเส้นใยของรก จะเห็นได้ว่าทั้งหมดเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการขจัดยา และจะพบ P-gp ได้น้อยในเนื้อเยื่อทั่วไป (Cordon-Cardo et al., 1990; Croop et al., 1989; Gil et al., 2005; Thiebaut et al., 1987) นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาซึ่งแสดงให้เห็นบทบาทของ P-gp ต่อการป้องกันการสะสมของยาและสิ่งแปลกปลอมในสมองและระบบประสาทส่วนกลางเช่น Doran และคณะที่รายงาน ค่าการสะสมยาในสมองหนูที่ปราศจาก P-gp ว่าพบมากกว่าสมองหนูปกติ (Doran et al., 2005) และการศึกษาของ Schinkel และคณะ (1994) พบว่า หนูที่ปราศจาก P-gp มีปริมาณของ ivermectin ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อระบบประสาทในระดับสูงกว่าหนูปรกติประมาณ 100 เท่า ตัวขนส่งยา P-gp สามารถขนส่งสารที่มีลักษณะที่หลากหลายตั้งแต่ยาต้านมะเร็งจนถึงเปปไทด์ เช่น vinblastine (Horio et al, 1988) daunorubicin, doxorubicin, mitroxantrone, vincristine, irinotecan เป็นต้น (Taylor et al., 1991; Hoki et al., 1997; Horio et al., 1989)

BCRP ถูกพบครั้งแรกจากเซลล์มะเร็งเต้านม Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) ที่ดื้อต่อยา Adriamycin และสามารถลดการดื้อยา Adriamycin ได้ด้วยยา verapamil (MCF-7/AdrVp) (Doyle et al., 1998) การแสดงออกของ BCRP พบมากที่เนื้อเยื่อรกในส่วนเซลล์ชั้นนอกซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีขอบแยกออกจากกันชัดเจน (syncytiotrophoblast) ระบบประสาทส่วนกลาง ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ตับ ต่อมหมวกไต ต่อมลูกหมาก อัณฑะและมดลูก (Fetsch et al., 2006; Maliepaard et al., 2001) ยาต้านมะเร็งที่สามารถถูกขนส่งด้วยโปรตีน BCRP ได้แก่ anthracycline, etoposide, teniposide, topotecan, methotrexate และยาในกลุ่ม tyrosine kinase inhibitors (Allen et al., 1999; Chen et al., 1990; Yang et al., 1995; Burger et al., 2004; Elkind et al., 2005)

MRP1 ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1992 (Cole et al., 1992; Mirski et al., 1987) พบการแสดงออกของ MRP1 จำนวนมากที่ปอด อัณฑะ รก และ ไต และพบโปรตีนนี้น้อยที่ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ เยื่อหุ้มสมอง ยาต้านมะเร็งที่สามารถถูกขนส่งด้วยโปรตีน MRP1 ได้แก่ chlorambucil, daunorubicin,

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

doxorubicin, methotrexate, vinblastine เป็นต้น (Hooijberg et al., 1999; Barnouin et al., 1998; Jedlitschky et al., 1996; Loe et al., 1998; Renes et al., 1999)

MRP2 มีการแสดงออกมากที่ตำแหน่งด้านบน (apical) ของเซลล์เนื้อเยื่อตับ หลอดไตส่วนต้น และเซลล์สร้างเส้นใยของรก ยาต้านมะเร็งที่สามารถถูกขนส่งด้วยโปรตีน MRP2 เช่น cisplatin, etoposide, doxorubicin, vincristine, vinblastine, methotrexate และ mitoxantrone (Jedlitschky et al., 2006)

การแก้ไขปัญหากลไกการดื้อยาจากโปรตีน ABC transporter มีอยู่หลายวิธี เช่น การใช้ยาต้านมะเร็งที่ไม่สามารถถูกขับออกได้โดยโปรตีน ABC transporter หรือ การให้ยาหรือสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ ABC transporter ร่วมกับการให้ยาต้านมะเร็ง

ไรนาแคนทิน-ซีเป็นสารกลุ่ม naphthoquinone ester ที่พบได้จากใบและรากของต้นทองพันชั่ง (Rhinacanthus nasutus KURZ.) ต้นทองพันชั่งนั้นมีการนำมาใช้กันมากในการแพทย์แผนไทยสำหรับรักษา eczema, skin disease, tuberculosis, hepatitis, hypertension และมะเร็ง (Siripong et al., 2006) และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานว่าไรนาแคนทิน-ซีสามารถยับยั้งการทำงานของ P-gp และ MRP2 efflux pump ในเซลล์ Caco-2 (Wongwanakul et al., 2013) และจากการศึกษาล่าสุดพบว่า ความเข้มข้นของไรนาแคนทิน-ซี ที่ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง (0.1 μm) สามารถเพิ่มความเป็นพิษของยา doxorubicin ต่อเซลล์ MCF-7 ได้ถึง 38 เท่า หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเซลล์ MCF-7 ที่ทำการศึกษานี้พบว่ามีการทำงานของ P-gp และ MRP2 (Chaisit et al., 2017) ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำสารไรนาแคนทิน-ซี มาศึกษาความสามารถในการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็งอื่นๆผ่านกลไกยับยั้งตัวขนส่งยาออก โดยเมื่อให้สารไรนาแคนทิน-ซี ร่วมกับยาต้านมะเร็งต่างๆ จะเพิ่มความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งในเซลล์ให้ความเข้มข้นถึงระดับที่ต้องการเพื่อที่จะไม่ต้องเพิ่มขนาดของยาต้านมะเร็งให้สูงขึ้น

2.3 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลอง

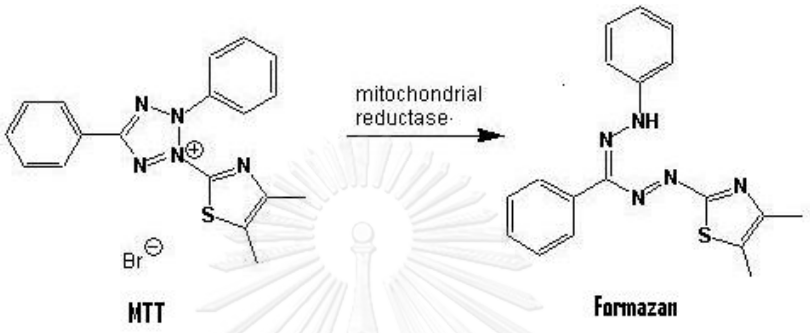
เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลอง คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC)

2.4 การวัดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay

MTT assay เป็นการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสี (colorimetric assay) ของ 3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเป็นผงละเอียดสีเหลือง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

อ่อน โดยจะเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นผลึก formazan ซึ่งมีสีม่วง (รูปที่ 1) โดยปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ซึ่งพบในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น โดยความเข้มข้นที่นิยมใช้อยู่ในช่วง 0.2 – 0.5 mg/ml และนำไปบ่มเป็นเวลา 1 - 4 ชั่วโมง ดังนั้นปริมาณ formazan จะบ่งบอกถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้ (Mosmann, 1983; Riss et al., 2004) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 570 nm (van Tonder et al., 2015; Maioli et al., 2009)



รูปที่ 1 การ reduced สาร MTT เป็นผลึก formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase

2.5 การวัดการทำงานของโปรตีนตัวขนส่งยา (Uptake Transporter Assay)

เป็นการศึกษาถึงกลไกและบทบาทของโปรตีนตัวขนส่งยานั้นมีความสำคัญในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาหรือสารต่างๆ โดยการศึกษานี้ช่วยให้คาดการณ์ถึงการแพร่ผ่านของสารนั้นผ่านเนื้อเยื่อที่มีโปรตีนตัวขนส่งยาอยู่ และเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการประเมินช่องทางการดูดซึมของยา การกระจายของยาไปยังอวัยวะต่างๆ และการขจัดยาออกจากเซลล์ได้ด้วย (Shitara et al., 2003)

โดยมีหลักการ คือ เปรียบเทียบการสะสมของสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของสับเสตรทที่จำเพาะกับโปรตีนขนส่งยาที่ศึกษาโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ ในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะกับโปรตีนขนส่งยานั้นๆ กับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสับเสตรทเพียงอย่างเดียว โดยสารเรืองแสงที่เกิดขึ้น เช่น Calcein-AM ซึ่งเป็นสับเสตรทของ P-gp จะถูกเปลี่ยนเป็น Calcein (สารเรืองแสง) และนำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นได้ที่ความยาวคลื่น excitation/emission 485/535 nM (Chaisit et al., 2016)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารไรนาแคนทิน-ซี

สารไรนาแคนทิน-ซี ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Laminar air flow cabinet
2. Microcentrifuge tube
3. Mechanical pipette ขนาด 0.5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL
4. Carbondioxide incubator
5. 5ortex – 2TM Genie
6. ell culture Flask
7. 24-well plate
8. 96-well plate
9. เครื่องชั่ง Mettler Toledo AG 135
10. Microplate reader
11. Orbital Shaker
12. Microscope

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 สารเคมี

1. Dimethylsulphoxide [$(CH_3)_2SO_4$; DMSO]
2. RPMI-1640
3. L-Glutamine [$C_5H_{10}N_2O_3$]
4. Penicillin Streptomycin
5. Fetal Bovine Serum [FBS]
6. Phosphate Buffer Saline [PBS]
7. Ethanol [C_2H_6O]
8. Tryptan Blue

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

9. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide [$C_{18}H_{16}N_5SBr$; MTT]
10. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)
11. Lysis buffer (1% tritonx-100 with 0.3 N NaOH)
12. Indomethacin
13. Calcein acetoxymethyl (calcein-AM), 5(6)-carboxy-2´, 7´ –dichlorofluorescein diacetate (CDCFDA)
14. DCDF
15. Cyclosporin
16. Calcein

3.4 เซลล์มะเร็ง

MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell) ซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC)

3.5 วิธีการศึกษา

3.5.1 การเตรียม culture medium

นำ Ultra-Purified Water (UPW) ที่ผ่านการ autoclave และตั้งทิ้งไว้จนเย็นแล้ว นำไปทำละลายกับผง RPMI medium ที่ชั่งเตรียมไว้ ในสัดส่วน ผง RPMI medium 10.10 กรัม ต่อ UPW 1 ลิตร หลังจากทำละลายและปรับ pH เป็น 7.25 แล้ว นำสารละลาย RPMI medium ไปผ่านการกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 μM และบรรจุใส่ขวด Duran เก็บไว้ในที่เย็น อุณหภูมิประมาณ 4 – 8 °C

การเตรียม Complete medium นั้นให้ผสมสารต่างๆกับ RPMI medium ที่ได้เตรียมไว้แล้วให้ได้ความเข้มข้นดังนี้ FBS 10% v/v, Penstrep 1% v/v และ L-glutamine 1% v/v

3.5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่น 5.5 x 10^4 cell/cm^2
2. เปลี่ยน culture medium วันเว้นวัน และ subculture ทุก 3 วัน โดยมีวิธีการดังนี้
   2.1 ดูด culture media ออก ล้าง flask ด้วย PBS ประมาณ 5 - 10 ml
   2.2 ดูด PBS ออก ใส่ trypsin 2 ml บ่มที่ 37°C, 5% CO_2 และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100% นาน 2 นาที

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3 หลังจากนั้นเติม complete medium 6 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin

2.4 ใช้ปิเปตดูดเซลล์ทั้งหมดใน flask ใส่ลงใน tube ขนาด 15 ml และนำไปเข้าเครื่อง centrifuge ตั้งเครื่องที่ความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เซลล์จะตกตะกอน

2.5 เทของเหลวใน tube ทิ้ง โดยระมัดระวังไม่ให้เซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ก้น tube ไหลตกลงไปด้วย หลังจากนั้นดูด complete medium 3 ml ลงไปใน tube และเขย่าให้เซลล์กระจายจนทั่ว

2.6 ใช้ปิเปตแก้วดูด cell suspension จาก tube 1 ml ใส่ลงไปใน flask ที่ทำความสะอาดแล้ว ซึ่งมี complete medium เติมอยู่แล้ว 12 ml จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มที่ 37°C, 5% CO_2 และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100%

3.5.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate

1. ดูด complete medium เก่าออกจาก flask
2. ล้างเซลล์ที่อยู่ใน flask ด้วย PBS ครั้งละ 5 – 10 ml
3. หลังจากการล้างด้วย PBS แล้ว ใส่ trypsin 1 – 2 ml บ่มที่ 37°C, 5% CO_2 และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100% นาน 2 นาที
4. ใส่ complete medium 6 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin
5. นำ cell suspension 25 µl ผสมกับ tryptan blue 25 µl นับจำนวนเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อคำนวณความเข้มข้นของ cell suspension ที่จะเตรียม
6. เตรียม cell suspension ให้มีความเข้มข้น 25 x 10^3 cells/ml สำหรับ MCF-7
7. นำเซลล์จากข้อ 6. เพาะเลี้ยงใน ของ 96-well plate (ที่มีความหนาแน่นเริ่มแรก 5 x 10^3 cells/well)

3.5.4 การวัดการทำงานของโปรตีนตัวขนส่งยาบนผิวเซลล์ MCF-7

1. นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ใน 24 well plate ออกจาก incubator
2. ดูด medium เก่าออก และล้างเซลล์ด้วย HBSS 500 µL/well 2 รอบ
3. ทำ Pretreat คือการใส่ยาหรือสารที่เป็น inhibitors ของ transporters ที่ต้องการทดสอบเพียงอย่างเดียวก่อน เป็นเวลานาน 30 นาที
4. ทำ Cotreat คือการใส่ยาหรือสารที่เป็น inhibitors + substrates ของ transporters ที่ต้องการทดสอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

5. ดูด medium เก่าออก และล้างเซลล์ด้วย ice cold PBS 500 µL/well 2 รอบ
6. ทำการย่อยเซลล์โดยใช้ 1% triton-x100 with 0.3 N NaOH 500 µL/well นาน 20 นาที
7. ดูดสารละลายข้างต้นมา 200 µL/well ใส่ plate ทึบนำไปวัด absorption ที่ excitation/emission: 485/535

3.5.5 การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay

ทดสอบฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง โดยวิธี MTT assay ทดสอบใน 2 สภาวะ คือ

1.ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เมื่อได้รับยาต้านมะเร็ง

2.ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เมื่อได้รับยาต้านมะเร็งร่วมกับสารไรนาแคนทิน-ซี

โดยมีวิธีการดังนี้

1. เตรียม stock solution ของยามะเร็งและไรนาแคนทิน-ซี ใน 100% DMSO ให้ได้ความเข้มข้นคงที่
   - ไรนาแคนทิน-ซี 1 mM, doxorubicin 500 µM, mitoxantrone 500 µM, vinblastine 20 µM และ tamoxifen 5 mM
2. นำ stock solution มาเจือจางด้วย RPMI ด้วยวิธี serial dilution ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ ดังนี้

   doxorubicin: 2 µM, 1.5 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.1 µM, 0.05 µM และ 0.01 µM

   mitoxantrone: 2.5 µM, 1.5 µM, 0.5 µM, 0.25 µM, 0.1 µM, 0.05 µM และ 0.01 µM

   vinblastine: 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 0.5 nM และ 0.1 nM

   tamoxifen: 20 µM, 17.5 µM, 15 µM, 12.5 µM, 10 µM, 5 µM และ 1 µM

   ไรนาแคนทิน-ซี (RN-C) 0.01 µM (เป็น negative control)

   โดยเตรียมปริมาตรแต่ละความเข้มข้นอย่างน้อย 800 µl และแบ่งสำหรับ 2 ภาวะ คือ 300 µl ในภาวะที่ไม่มีไรนาแคนทิน-ซี และ 500 µl ในภาวะที่มีไรนาแคนทิน-ซี และเตรียม DMSO ความเข้มข้น 0.5% เป็น negative control
3. เอาเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้มาเปลี่ยน medium เป็น medium ที่มียาผสมอยู่ ตามข้อ 2. และ negative control ต่างๆ ลงในแต่ละ well ตามที่ได้วางแผนการทดลองไว้ ในปริมาตร 200 µl/well สำหรับยามะเร็งแบบเดี่ยวๆ และแบบ combination จะทำแบบ duplicate และส่วนที่เป็น control จะทำ 5 wells/สาร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4. นำเซลล์ที่ศึกษาไปบ่มที่ 37°C, 5% CO_2 และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. เตรียม MTT solution โดยละลายผง MTT ใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 0.85 mg/ml
6. เติม MTT solution 15 µl จากนั้นนำ culture plate ไปบ่มที่ 37°C, 5% CO_2 และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
7. เปลี่ยน medium เดิมที่มี MTT ผสมอยู่เป็น DMSO 100 µl/well เพื่อละลายผลึก Formazan จากนั้นนำ culture plate ไป shake บน shaker ประมาณ 15 นาที
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละ well โดยใช้ microplate reader ที่ 570 nm
9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา %viability และรายงานผลในรูปของ mean ± SD หรือ SEM

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลการอยู่รอดของเซลล์จะถูกนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย One-way ANOVA และ Post Hoc analysis Bonferroni test

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

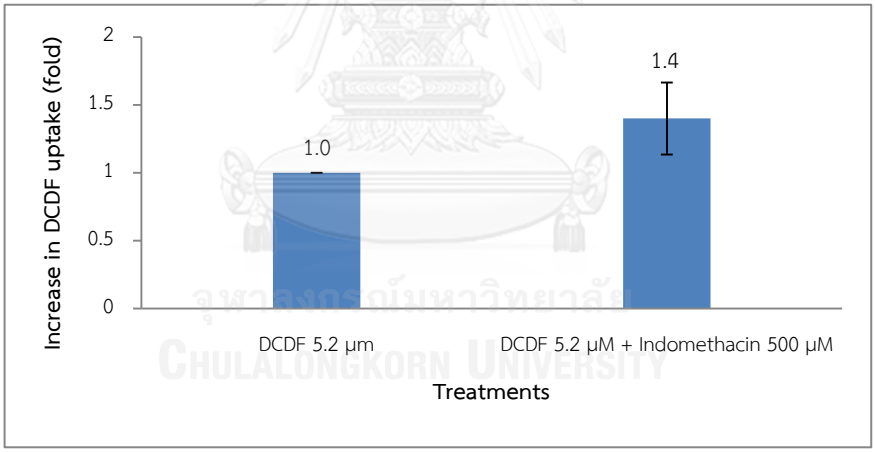
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลทดสอบการทำงานของโปรตีนตัวขนส่งยา MRP1, MRP2 และ P-gp

การศึกษาในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการทำงานของโปรตีนตัวขนส่งยา MRP1, MRP2 และ P-gp บนผิวเซลล์ MCF-7 โดยใช้สารหรือยาซึ่งเป็นสับเสตรทและตัวยับยั้งที่จำเพาะกับโปรตีนตัวขนส่งยาแต่ละตัว ดังนี้ DCDF (5.2 μM) เป็นสับเสตรทของ MRP1, CDCFDA (5 μM) เป็นสับเสตรทของ MRP2 และ calcein-AM (0.4 μM) เป็นสับเสตรทของ P-gp โดยในการทดลองนั้นจะกลุ่มเซลล์จะได้รับตัวยับยั้งเพียงอย่างเดียวก่อน (pretreat) ส่วนเซลล์อีกกลุ่มจะได้รับ 0.5% DMSO แทน แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์จะได้รับตัวยับยั้งพร้อมสับเสรตทที่จำเพาะ (cotreat) และนำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น excitation/emission 485/535 nM เพื่อวัดการสะสมของสารเรืองแสงที่เกิดจากสับเสตรทเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่โปรตีนตัวพาไม่ได้ถูกยับยั้ง ผลการศึกษาที่ได้เป็นดังนี้

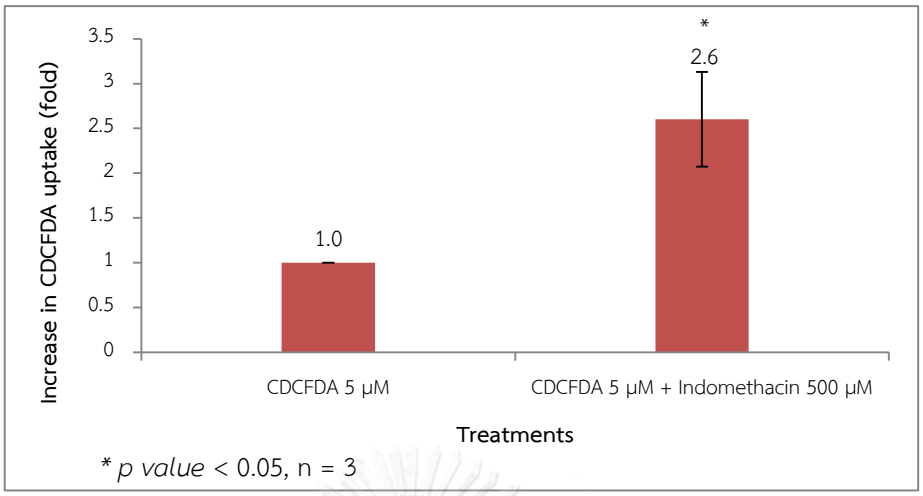
รูปที่ 2 ผลการทำงานของ MRP1 บนผิวเซลล์ MCF-7



จากรูปที่ 2 จะเห็นว่าเมื่อให้ DCDF และ Indomethacin ซึ่งเป็นสับเสตรทที่จำเพาะและตัวยับยั้งของ MRP1 ตามลำดับ พบว่ากลุ่มเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับ DCDF ร่วมกับ Indomethacin จะมีการสะสมของ DCDF มากกว่ากลุ่มเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับสับเสตรทเพียงอย่างเดียวถึง 1.4 เท่า แต่จากการคำนวณทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีสำคัญที่ $p < 0.05$

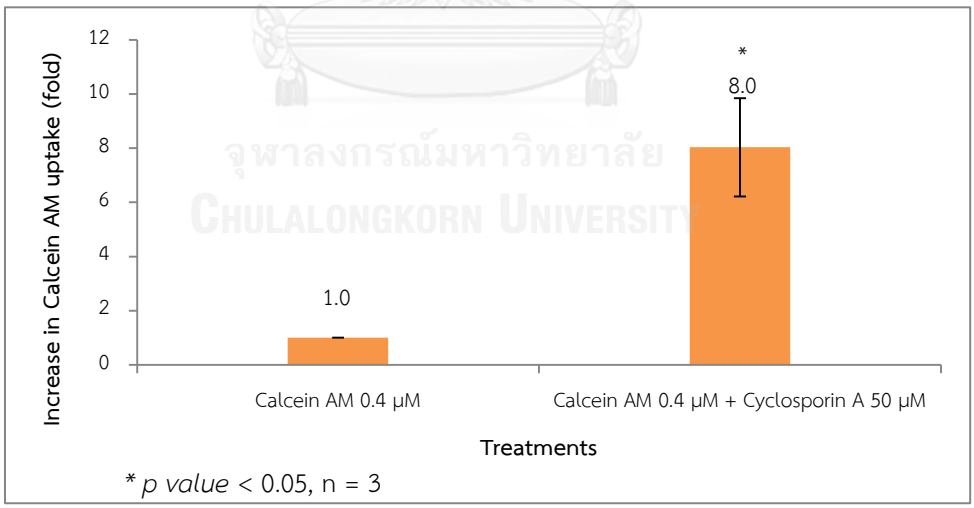
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รูปที่ 3 ผลการทำงานของ MRP2 บนผิวเซลล์ MCF-7



จากรูปที่ 3 จะเห็นว่าเมื่อให้ CDCFDA และ Indomethacin ซึ่งเป็นสับเสตรทที่จำเพาะและ ตัวยับยั้งของ MRP2 ตามลำดับ พบว่ากลุ่มเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับ CDCFDA ร่วมกับ Indomethacin จะมีการสะสมของ CDCFDA มากกว่ากลุ่มเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับ CDCFDA เพียงอย่างเดียวถึง 2.6 เท่า และจากการคำนวณทางสถิติพบว่าแตกต่างอย่างมีสำคัญที่ $p < 0.05$

รูปที่ 4 ผลการทำงานของ P-gp บนผิวเซลล์ MCF-7



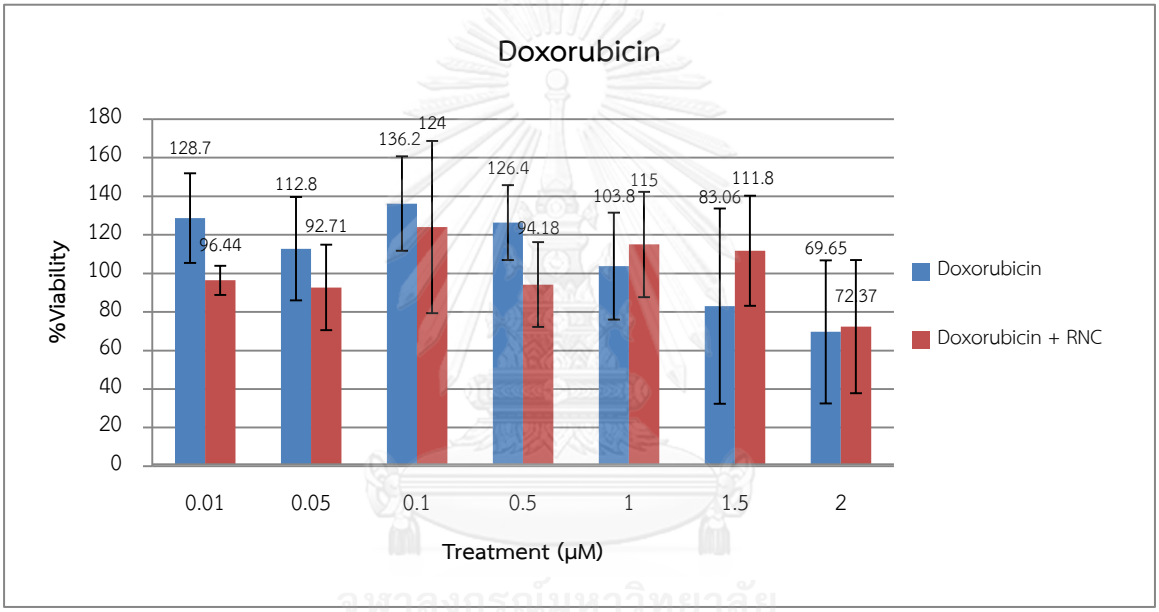
จากรูปที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อให้ Calcein AM และ Cyclosporin A ซึ่งเป็นสับเสตรทที่จำเพาะและตัวยับยั้งของ P-gp ตามลำดับ พบว่ากลุ่มเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับ Calcein AM ร่วมกับ Cyclosporin A จะมีการสะสมของ Calcein AM มากกว่ากลุ่มเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับ Calcein AM เพียงอย่างเดียวถึง 8.0 เท่า และจากการคำนวณทางสถิติพบว่าแตกต่างอย่างมีสำคัญที่ $p < 0.05$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.2 ผลของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7

ในการศึกษาผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ความเข้มข้น 0.1 nM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์) ต่อการเสริมฤทธิ์ยามะเร็ง 4 ชนิด (doxorubicin, mitoxantrone, vinblastine และ tamoxifen ชนิดละ 7 ความเข้มข้น ดังแสดงในกราฟ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับยาและสารไรนาแคนทิน-ซี เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยามะเร็งเพียงอย่างเดียวกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยามะเร็งร่วมกับสารไรนาแคนทิน-ซี ผลการศึกษาที่ได้เป็นดังนี้

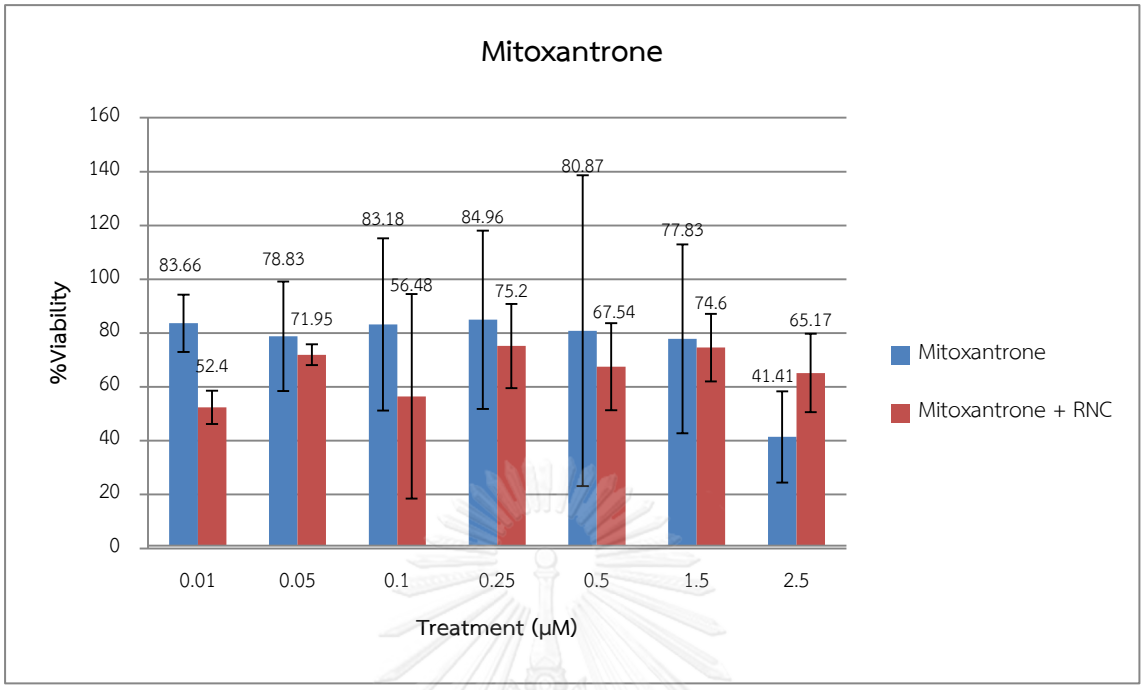
รูปที่ 5 ผลของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อการเสริมฤทธิ์ยา doxorubicin



จากรูปที่ 5 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของ doxorubicin ขนาดต่ำ (0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 μM) พบการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อยา doxorubicin คือเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของยา doxorubicin ขนาดสูง (1, 1.5 และ 2 μM) กลับพบว่าการให้สารไรนาแคนทิน-ซีร่วมกับยา doxorubicin มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

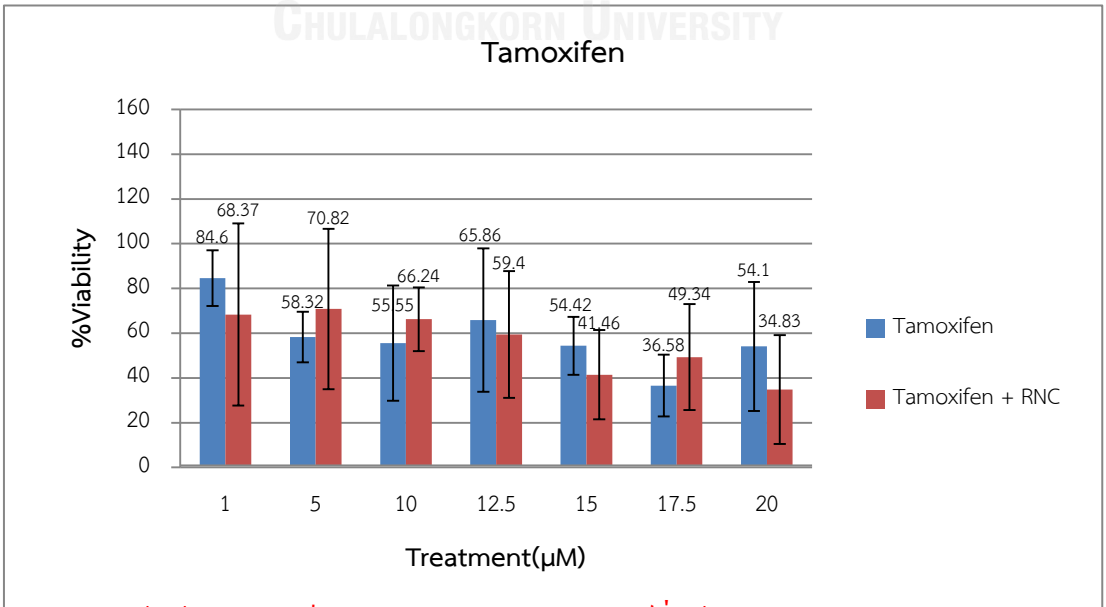
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รูปที่ 6 ผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยา mitoxantrone



จากรูปที่ 6 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของ mitoxantrone 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.5 และ 2.5 μM พบการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อยา mitoxantrone คือเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 2.5 μM กลับพบว่าการให้สารไรนาแคนทิน-ซีร่วมกับยา mitoxantrone มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

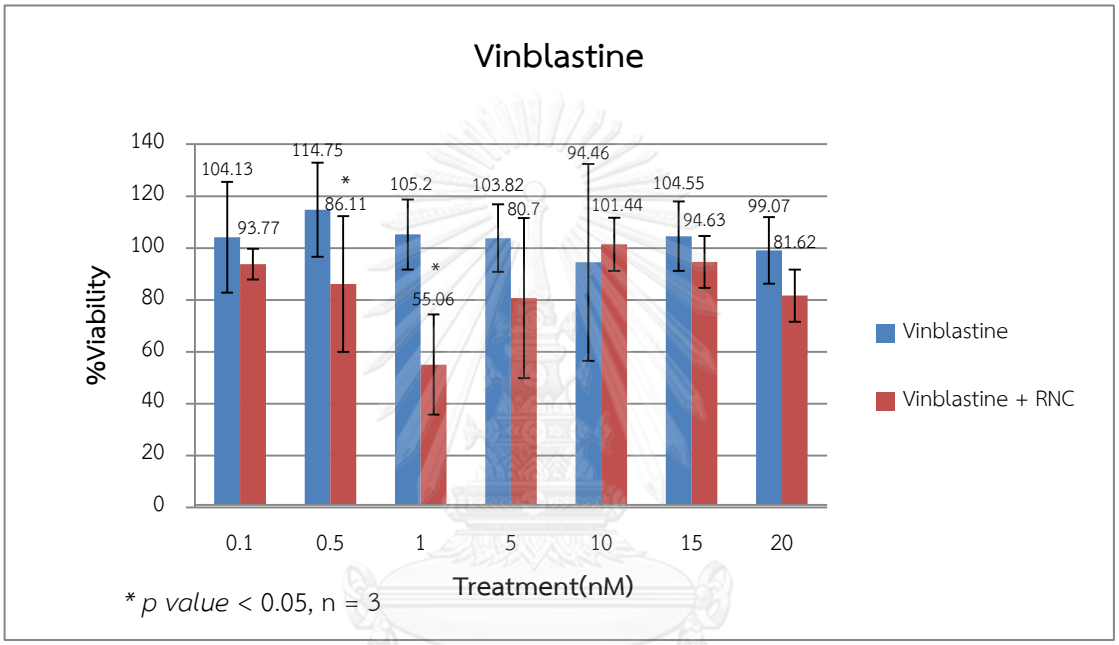
รูปที่ 7 ผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยา tamoxifen



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จากรูปที่ 7 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของ tamoxifen 1, 12.5, 15 และ 20 μM พบการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อยา tamoxifen คือเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 17.5 μM กลับพบว่าการให้สารไรนาแคนทิน-ซีร่วมกับยา tamoxifen นั้นมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 8 ผลของสารไรนาแคนทิน-ซี ต่อการเสริมฤทธิ์ยา vinblastine



จากรูปที่ 8 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของ vinblastine 0.1, 0.5, 1, 5, 15 และ 20 nM พบการเสริมฤทธิ์ของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อยา vinblastine คือเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 nM นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 10 nM พบว่าการให้สารไรนาแคนทิน-ซีร่วมกับยา vinblastine นั้นมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การดื้อยาหลายขนานเป็นปัญหาสำคัญในการรักษามะเร็ง โดยการดื้อยาหลายขนานนั้นมีความเกี่ยวข้องกับตัวนำส่งยากลุ่ม ATP-binding cassette domains (ABC transporters) เช่น P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance-associated protein 1(MRP1) และ multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) ที่มีหน้าที่กำจัดสารพิษออกจากเซลล์ โดยมีการศึกษาพบว่า ผิวของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาจะมีการแสดงออกของ ABC transporters มากกว่าปกติ (Szakács et al., 2006) ทำให้ยามะเร็งสะสมในเซลล์มะเร็งเป้าหมายได้น้อยลง เป็นผลให้การรักษามะเร็งล้มเหลว โดยมีการศึกษารายงานว่าสารไรนาแคนทิน-ซี จะไปรบกวนการทำงานของทั้ง P-gp และ MRP2 efflux pump (Wongwanakul et al., 2013) และจากการศึกษาล่าสุดพบว่าความเข้มข้นของไรนาแคนทิน-ซี ที่ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง (0.1 μm) สามารถเพิ่มความเป็นพิษของยา doxorubicin ต่อเซลล์ MCF-7 ได้ถึง 38 เท่า หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเซลล์ MCF-7 ที่ทำการศึกษานี้พบว่ามีการทำงานของ P-gp และ MRP2 (Chaisit et al., 2017)

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์ในการนำสารดังกล่าวมาศึกษาที่ความเข้มข้นต่ำ โดยให้ร่วมกับยาต้านมะเร็งต่างๆ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งที่สะสมในเซลล์ให้มีความเข้มข้นถึงระดับที่ต้องการ ทำให้ไม่ต้องเพิ่มขนาดของยาต้านมะเร็งให้สูงขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของสารไรนาแคนทิน-ซีต่อยาต้านมะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine โดยยาทั้ง 4 ชนิดนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันและอยู่ต่างกลุ่มกัน และมีสมมติฐานงานวิจัยว่า สารไรนาแคนทิน-ซี ในความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine ในการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins มีการศึกษาพบว่ายา doxorubicin และ vinblastine เป็นสับเสตรทของ P-gp, MRP1 และ MRP2 ยา mitoxantrone เป็นสับเสตรทของ P-gp และ MRP2 ยา tamoxifen เป็นสับเสตรทของ P-gp (Rao, 1994; Coley, 2008) และความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดที่เลือกมาใช้นั้นต้องทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 20 – 80% เนื่องจากที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 80% จะให้ฤทธิ์ในการรักษาเพิ่มขึ้นไม่มากเมื่อเทียบกับผลข้างเคียงที่เกิดจากการได้รับยามากขึ้น.(Birkett, 1995)

ผู้วิจัยเริ่มต้นศึกษาการทำงานของ ABC transporters บนผิวของเซลล์ MCF-7 โดยวิธี uptake assay ซึ่งเปรียบเทียบการสะสมของสารเรืองแสงในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะกับโปรตีนขนส่งยานั้นๆ กับกลุ่มโปรตีนที่ได้รับสับเสตรทเพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่า มีการสะสมของสารเรืองแสงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสับเสตรทของ P-gp, MRP1 และ MRP2 8.0 เท่า 1.4 เท่า และ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.6 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า มีเพียง P-gp และ MRP2 ที่มีการทำงานและการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าบนผิวเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง MCF-7 มีการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งยาที่สอดคล้องกับการทำงานของสารไรนาแคนทิน-ซี ที่ยับยั้งการทำงานของ P-gp และ MRP-2

จากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay โดยให้สารไรนาแคนทิน-ซี 0.1 nM ร่วมกับยามะเร็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารไรนาแคนทิน-ซี ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ยามะเร็งทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองมีค่าการกระจายที่กว้าง อาจเนื่องมาจาก ผู้วิจัยมีความเชี่ยวชาญและเทคนิคในการทำปฏิบัติการยังไม่ดีพอ ทำให้มีความคลาดเคลื่อนของเวลาในการ seed cells และเวลาการให้ยามะเร็งและสารไรนาแคนทิน-ซี กับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง เพราะมีเวลาจำกัดในการฝึกฝนและทำการทดลอง นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง เป็นต้น และยังพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่ได้รับและไม่ได้รับสารไรนาแคนทิน-ซี ร่วมกับยามะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่อยู่ในช่วง 20 – 80 % แต่มีแนวโน้มความสัมพันธ์แบบ dose dependent ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สารไรนาแคนทินซีที่ความเข้มข้น 0.1 nM ไม่มีผลต่อการเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ doxorubicin, mitoxantrone, tamoxifen และ vinblastine ในการลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการทำงานและแสดงออกของ P-gp และ MRP2 แต่ผู้วิจัยคาดว่าหากมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารไรนาแคนทิน-ซี ก็อาจก่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์ต่อยามะเร็งทั้ง 4 ชนิดได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสารไรนาแคนทิน-ซี ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพิ่มเติม เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ช่วยเสริมฤทธิ์ของยามะเร็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กระทรวงสาธารณสุข กรมการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ National Cancer Control Programs (พ.ศ. 2556 - 2560). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแหงประเทศไทย จำกัด; 2556.

วัชรี ลิ้มปนสิทธิกุล. ยามะเร็ง (Antineoplastic agents). In: คณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา, editor. เภสัชวิทยา. 4 ed. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2555. p. 415-27.

ภาษาอังกฤษ

Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overex pression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. Cancer Res 1999;59:4237-41.

Barnouin K, Leier I, Jedlitschky G, Pourtier-Manzanedo A, Konig J, Lehmann WD, et al. Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione. Br J Cancer 1998;77:201-9.

Birkett DJ. Pharmacokinetics made easy 10 pharmacodynamics the concentration-effect relationship. Aust Prescr 1995;18:102-4. DOI: 10.18773/austprescr.1995.088

Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. Blood 2004;104:2940-2.

Cancer for Disease Control and Prevention. Cancer Among Women [updated August 20, 2015; cited 2016 February 8]. Available from: http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/women.htm.

Cancer for Disease Control and Prevention. What Are the Risk Factors for Breast Cancer? [updated November 17, 2015; cited 2016 February 8]. Available from: http://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm.

Cancer multidrug resistance. Nat Biotechnol. 2000;18 Suppl:IT18-20.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Chaisit T, Siripong P, Jianmongkol S. Rhinacanthin-C enhances doxorubicin cytotoxicity via inhibiting the functions of P-glycoprotein and MRP2 in breast cancer cells. Eur J Pharmacol. 2017;795:50-7.

Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang JL, Fojo AT. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpres sion of a novel resistance-related membrane protein. J Biol Chem 1990;265:10073-80.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 1992;258:1650-4.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Histochem Cytochem 1990;38:1277-87.

Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, et al. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. Mol Cell Biol 1989;9:1346-50.

Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E, et al. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. Drug Metab Dispos 2005;33:165-74.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:15665-70.

Eid SY, El-Readi MZ, Wink M. Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters. Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology. 2012;19(11):977-87.

Elkind NB, Szentpetery Z, Apati A, Ozvegy-Laczka C, Varady G, Ujhelly O, et al. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). Cancer Res. 2005;65:1770-7.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, et al. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. Cancer Lett 2006;235:84-92.

Gil S, Saura R, Forestier F, Farinotti R. P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. Placenta 2005;26:268-70.

Glodek, Cass. A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement. Michigan Cancer Foundation, Detroit; 1990.

Helen MC. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. Cancer Treatment Reviews 2008; 34:378-390.

Hoki Y, Fujimori A, Pommier Y. Differential cytotoxicity of clinically important camptothecin derivatives in P-glycoprotein-overexpressing cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 1997;40:433-8.

Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. Cancer Res 1999;59:2532-5.

Horio M, Chin KV, Currier SJ, Goldenberg S, Williams C, Pastan I, et al. Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney cell epithelia. J Biol Chem 1989; 264:14880-4.

Horio M, Gottesman MM, Pastan I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrugresistant cells. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:3580-4.

Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. Cancers. 2014;6(3):1769-92.

Immunological Methods. 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2(ABCC2) protein and its role in drug disposition. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology 2006; 2(3): 351-366.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. Cancer Res 1996;56:988-94.

Joseph T. DiPiro, Robert L. Talbert, Gary C. Yee. Gray R. Matzke, Barbara G. Wells and L. Michael Posey. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2012.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 1976;455:152-62.

Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. Cancer Research 1997; 57(15): 3071-3078.

Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Characterization of vincristine transport by the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP): Evidence for cotransport with reduced glutathione. Cancer Research 1998;58:5130-6.

Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. J Pathol 2005;205:275-92.

Maioli E, Torricelli C, Fortino V, Carlucci F, Tommassini V, Pacini A. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. Biol Proced Online. 2009;11:227-40.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. Cancer Res 2001;61:3458-64.

Mirski SE, Gerlach JH, Cole SP. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. Cancer Res 1987;47:2594-8.

Mosmann, Tim (December 1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and

National Cancer Institute (NCI). Surveillance epidemiology and end results (SEER) cancer statics [reviews 1975-2002; cited Febuary 8, 2017] Available from: http://seer.cancer.gov/publicdata/.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Breast [Version 1.2005].

Renes J, de Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL, Muller M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. Br J Pharmacol 1999;126:681-8.

resistance in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(3):219-34.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD) 2004.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell 1994;77:491-502.

Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. J Pharmacol Exp Ther. 2003; 304:610–616.

Siripong P, Yahuafai J, Shimizu K, Ichikawa K, Yonezawa S, Asai, T, et al. Antitumor activity of liposomal naphthoquinone esters isolated from Thai medicinal plant: Rhinacanthus nasutus KURZ. Biol Pharm Bull 2006; 29(11): 2279-2283.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the Nation al Cancer Institute 1973; 51(5): 1409-1416.

Stebbing J, Glassman R. Breast cancer (metastatic). Clin Evind 2004; 11:2266-99.

survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". Journal of

Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug

Taylor CW, Dalton WS, Parrish PR, Gleason MC, Bellamy WT, Thompson FH, et al. Different mechanisms of decreased drug accumulation in doxorubicin and mitoxantrone resistant variants of the MCF7 human breast cancer cell line. Br J Cancer 1991;63:923-9.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84:7735-8.

Van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC research notes. 2015;8:47.

Wongwanakul R, Vardhanabhuti N, Siripong P, Jianmongkol S. Effects of rhinacanthin-C on function and expression of drug efflux transporters in Caco-2 cells. Fitoterapia 2013; 89: 80-85.

World Health Organization. Cancer. [Updated February, 2015; cited January 29, 2017]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.

Yang CJ, Horton JK, Cowan KH, Schneider E. Cross-resistance to camptothecin analogues in a mitoxantrone-resistant human breast carcinoma cell line is not due to DNA topoisomerase I alterations. Cancer Res 1995; 55:4004-9.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.