

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเอทท็อกซีแมนโซโนนิจต่อเซลล์มะเร็งเต้านม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTICANCER ACTIVITY OF ETHOXY MANSONONE G ON HUMAN BREAST CANCER CELLS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacology  
Inter-Department of Pharmacology  
Graduate School  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2018  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเอทที่ออกซีแมนโซโนนิจต่อเซลล์มะเร็งเต้านม
โดย	น.ส.พิริยา ชนสุด
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงวรรณรศมี เกตุชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร้อยโทหญิง สัตวแพทย์หญิงเนาวรัตน์  
สุธัฒนาภพพงษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงวรรณรศมี เกตุชาติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.ปิติ จันทรวรรโชติ)

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

พิริยา ชนสูตร : ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเอท็อกซีแมนโซโนนจีต่อเซลล์มะเร็งเต้านม. (

ANTICANCER ACTIVITY OF ETHOXY MANSONONE G

ON HUMAN BREAST CANCER CELLS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.พญ.ววรรณรัศมี เกตุ

ชาติ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนในระยะลุกลามร้อยละ 40 สามารถกลับเป็นมะเร็งซ้ำเนื่องจากมีการดื้อยา tamoxifen แพทย์จึงเปลี่ยนไปใช้ยาต้านฮอร์โมนกลุ่มอื่น แต่ยังคงเกิดการดื้อยาและมีผลข้างเคียงที่รุนแรง ดังนั้นการนำสารจากธรรมชาติมาพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจึงเป็นแนวทางที่อาจลดปัญหาดื้อยาได้ สารสกัดจากต้นจันทน์หอม (*Mansonia Gagei* Drumm) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด โดย mansonone G (MG) สารสำคัญที่แยกจากสารสกัดสามารถแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจนได้ ใน การศึกษานี้จึงทำการทดสอบฤทธิ์อนุพันธ์ MG คือ Ethoxy mansonone G (EMG) สารกึ่งสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญ การลุกลามและการยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการทดสอบ EMG สามารถยับยั้งการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่ดื้อยา (MCF-7) และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC2, MCF-7/LCC9) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความเป็นพิษน้อยกว่ายาเคมีบำบัดในเซลล์ไฟโบร بلاสต์ และพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ EMG ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ส่วนหนึ่งผ่านการลดการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจนและสาร EMG ยังสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา tamoxifen ใน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 นอกจากนี้ EMG ยังยับยั้งการลุกลามของ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 โดยลดการแสดงออกของ MMP-9 และ uPA ทั้งยังสามารถลดการเจริญแบบไร้การยึดเกาะผ่านการลดจำนวน ขนาดของ colony ใน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 สรุปว่าสาร EMG มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งเต้านมชนิดไม่ดื้อยาและชนิดที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ด้านการลุกลาม รวมไปถึงลดการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ซึ่งอาจนำไปพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน

สาขาวิชา เกษษัตริยา

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5887182020 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORD: mansonone G, breast cancer, mansononia gagei drumm

Piriya Chonsut : ANTICANCER ACTIVITY OF ETHOXY MANSONONE G ON HUMAN BREAST CANCER CELLS. Advisor: Asst. Prof. WANNARASMI KETCHART, M.D.,Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. Piyanuch Wonganan, Ph.D.

Approximately 40% of advanced-stage estrogen receptor (ER)-positive breast cancer patients developed recurrence due to tamoxifen resistance. Therefore, the use of natural substances to inhibit the growth of breast cancer cells is a promising way to reduce the problem of anti-hormonal drug resistance. The extract from *Mansononia Gagei Drum* has shown the inhibitory effect on several cancer cells and the major bioactive compound; MG showed the binding ability to ER. This study aimed to evaluate the inhibitory effects of EMG, a semi-synthetic compound on cell proliferation, invasion and anchorage-independent growth. The results showed that EMG inhibited the growth of ER-positive (MCF-7) and anti-hormonal resistant breast cancer cells (MCF-7/LCC2, MCF-7/LCC9) in a concentration and time-dependent manner with less toxic effect on normal fibroblasts. Inhibitory effect of EMG on cell proliferation was in part due to the reduction of ER-targeted genes in MCF-7 cells. EMG reduced tamoxifen resistant genes, inhibited cell invasion by decreasing MMP-9 and uPA and inhibited anchorage-independent growth in MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. In conclusion, EMG had anticancer effects in both ER-positive and anti-hormonal resistant breast cancer cells and was able to inhibit cell invasion and anchorage-independent growth. Therefore, this study suggested that EMG should be developed as a novel anticancer drug for anti-hormonal resistant breast cancer patients.

Field of Study: Pharmacology

Student's Signature .....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญ. วรรณรัศมี เกตุชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านทั้งสองได้ให้แนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบแก้ไขความเรียบร้อย ตลอดจนคำแนะนำที่ดีเสมอมาและขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้และแนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสารทดสอบอนุพันธ์แมนโซโนนจี

ดร.โรเบิร์ต คลาร์ค มหาวิทยาลัยจอร์จทาวน์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 สำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

การสนับสนุนทุนการศึกษาและวิจัยจาก “ ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อเฉลิมฉลองในโอกาสที่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงเจริญพระชนมายุ 60 พรรษา ” และ “ ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ”

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ที่หน่วยปฏิบัติการเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และเพื่อนร่วมศึกษาในสหสาขาวิชาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่ได้ให้ความสนับสนุนในทุก ๆ เรื่องเป็นอย่างดี ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จไปได้ด้วยดี

พิริยา ชนสุต

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	13
บทที่ 1 บทนำ.....	15
ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย (Background and rationale) .....	15
คำถามการวิจัย .....	17
วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives).....	17
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	17
กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	18
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	19
โรคมะเร็งเต้านม (Breast cancer).....	19
ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งเต้านม.....	20
อาการของมะเร็งเต้านม.....	21
แนวทางการรักษามะเร็งเต้านม.....	22
กลไกในการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนในมะเร็งเต้านม (รูปที่ 2).....	23

ตัวรับเอสโตรเจน (Estrogen receptor, ER).....	25
ยีนเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน (ER - targeted genes).....	27
ยาต้านฮอร์โมนที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน.....	28
กลไกในการดื้อยา tamoxifen ของมะเร็งเต้านม.....	29
Phosphatidylinositol- 3- kinase (PI3K).....	33
Cyclin dependent kinase 4/6 inhibitors (CDK4/6 inhibitors).....	35
การดื้อยาและการลุกลามของมะเร็ง.....	37
กระบวนการลุกลามของเซลล์มะเร็ง.....	37
จันทน์หอม ( <i>Mansonia gagei</i> Drumm).....	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	42
สารทดสอบ.....	42
เซลล์ที่ใช้ทดสอบ.....	42
สารเคมี.....	42
เครื่องมือและอุปกรณ์.....	43
วิธีดำเนินการวิจัย.....	44
การเตรียมสารละลาย ethoxy mansonone G (EMG).....	44
การศึกษาผลของ mansonone G (MG) และอนุพันธ์ของ mansonone G ต่ออัตราการรอดชีวิต ของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT assay.....	45
การศึกษาผลของ EMG ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT assay.....	45
การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time PCR).....	46
การศึกษาผลของ EMG ต่อการเจริญแบบไร้การยึดเกาะโดยวิธี soft agar assay.....	47
การศึกษาผลของ EMG ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยวิธี scratch assay.....	48
การศึกษาผลของ EMG ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยวิธี matrigel invasion assay.....	48



การศึกษาความเป็นพิษของ EMG ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ .....	49
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	50
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	51
การศึกษาผลของ mansonone G (MG) และอนุพันธ์ของ mansonone G ต่ออัตราการรอดชีวิต ของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT assay .....	51
การศึกษาผลของ EMG ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของ ตัวรับเอสโตรเจนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน .....	54
การศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับ เอสโตรเจน (ER-targeted genes) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตร เจน.....	60
การศึกษาผลของ EMG ต่อการยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะ (Anchorage-independent growth) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดต่อยาต้านฮอร์โมนด้วยวิธี Soft agar assay .....	63
การศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดต่อยา tamoxifen (tamoxifen-resistant genes) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน..	65
การศึกษาผลของ EMG ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน โดยวิธี scratch assay .....	68
การศึกษาผลของ EMG ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมนโดย วิธี matrigel invasion.....	70
การศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย และลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน .....	72
การศึกษาความเป็นพิษของ EMG ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010.....	74
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย.....	76
อภิปรายผลการทดลอง .....	76
สรุปผลการวิจัย.....	83
บรรณานุกรม.....	2
ประวัติผู้เขียน.....	10



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ชนิดของมะเร็งเต้านม (molecular subtypes of breast cancer).....	21
ตารางที่ 2 ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ ER และ co-regulators ต่อการดื้อยา tamoxifen (Musgrove & Sutherland, 2009).....	30
ตารางที่ 3 ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ growth factor receptors และ cytoplasmic signaling ต่อการดื้อยา tamoxifen .....	31
ตารางที่ 4 ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle regulators และ apoptotic proteins ต่อการดื้อยา tamoxifen.....	32
ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของยีนที่ใช้ในการศึกษา .....	47
ตารางที่ 6 แสดงค่า IC <sub>50</sub> ของ MG และอนุพันธ์ของ MG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	53
ตารางที่ 7 แสดงค่า IC <sub>50</sub> ของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ เซลล์ MCF-7/LCC2 และเซลล์ MCF-7/LCC9 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง.....	59

## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 อัตราการเกิดผู้ป่วยรายใหม่และผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง (Siegel Rebecca et al., 2018).....	20
รูปที่ 2 การทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ระดับโมเลกุล (Musgrove & Sutherland, 2009).....	25
รูปที่ 3 โครงสร้างของ estrogen receptor (Green & Carroll, 2007) .....	26
รูปที่ 4 กลไกการดื้อยาต้านฮอร์โมนในมะเร็งเต้านม (Musgrove & Sutherland, 2009).....	34
รูปที่ 5 PI3K pathway (Holmes, 2011).....	35
รูปที่ 6 วัฏจักรของเซลล์ (Abukhdeir & Park, 2008).....	36
รูปที่ 7 ต้นจันทน์หอม (Tiew et al., 2003).....	39
รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Mansonone G และ Ethoxy mansonone G .....	40
รูปที่ 9 MG และอนุพันธ์ของ MG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7/LCC2.....	53
รูปที่ 10 EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 .....	56
รูปที่ 11 EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7/LCC2 .....	57
รูปที่ 12 EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7/LCC9 .....	58
รูปที่ 13 EMG ลดการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน (ER-targeted genes) ได้แก่ CCND1, CTSD, PS2 และ PR ในเซลล์ MCF-7.....	62
รูปที่ 14 EMG ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9.....	64
รูปที่ 15 EMG สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ CCND1 ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 .....	66
รูปที่ 16 EMG ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ NCoR1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 .....	66
รูปที่ 17 EMG สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ NCoA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 .....	67

รูปที่ 18 EMG ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 ..... 69

รูปที่ 19 EMG ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ..... 71

รูปที่ 20 EMG สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ MMP-9 ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ..... 73

รูปที่ 21 EMG เปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ uPA ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ..... 73

รูปที่ 22 EMG มีความเป็นพิษน้อยกว่า DOX ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010..... 75

รูปที่ 23 Proposed mechanism of EMG in ER-positive breast cancer cells ..... 81

รูปที่ 24 Proposed mechanism of EMG in anti-hormonal resistant breast cancer cells 82



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AI	Aromatase Inhibitor
Ap1	Activation Protein 1
BRCA1	Breast Cancer Type 1
BRCA2	Breast Cancer Type 2
Cath-D	Cathepsin D
CCND1	Cyclin D1
CDK4/6	Cyclin Dependent Kinase 4 Or 6
CoA	Co-Activator
DBD	DNA-Binding Domain
EMG	Ethoxy Mansonone G
E <sub>2</sub>	Estrogen
E2F	E2 Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERE	Estrogen Response Element
ER	Estrogen Receptor
ER- $\alpha$	Estrogen Receptor Alpha
ER- $\beta$	Estrogen Receptor Beta
ER-Targeted Gene	Estrogen Receptor Targeted Gene
FAK	Focal Adhesion Kinase
H12	Helix 12
HATS	Histone Acetyl Transferase
HDAC	Histone Deacetylase

HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IC <sub>50</sub>	Half inhibitory concentration
IGFR	Insulin-Like Growth Factor Receptor
LBD	Ligand-Binding Domain
MG	Mansonone G
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffer saline
PIK3CA	Phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PR	Progesterone Receptor
RE	Response Element
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
SERDS	Selective Estrogen Receptor Down Regulators
SERMS	Selective Estrogen Receptor Modulators
Sp1	Specificity Protein 1
SRE	Serum Response Element
TAM	Tamoxifen
TFE1	Trefoil Factor1
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
μl	Microliter
μM	Micromolar

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย (Background and rationale)

ในปัจจุบันผู้ป่วยโรคมะเร็งมีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีอัตราการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้นทุกปี จากการสำรวจอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งของ American Cancer Society ในปีคริสตศักราช 2018 พบผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมรายใหม่มากเป็นอันดับ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับโรคมะเร็งชนิดอื่น (Siegel Rebecca, Miller Kimberly, & Jemal, 2018) สอดคล้องกับอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในประเทศไทยที่สำรวจโดยสถาบันวิจัยมะเร็งแห่งชาติในปีคริสตศักราช 2016 พบผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมมากเป็นอันดับ 1 เช่นเดียวกัน (Siegel, Miller, & Jemal, 2016) โดยแนวทางหลักในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม คือ การผ่าตัด (surgery) แล้วนำชิ้นเนื้อมะเร็งส่งตรวจทางพยาธิวิทยา เพื่อระบุชนิดของมะเร็งเต้านม (molecular subtypes) และพิจารณาหาแนวทางการรักษาที่เหมาะสมตามชนิดของมะเร็งเต้านมต่อไป

มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (Zwart, Terra, Linn, & Schagen, 2015) เป็นชนิดที่พบได้มากที่สุด ประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมทั้งหมด เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดนี้ถูกกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงใช้ยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal therapy) ในการรักษา ซึ่งยาตัวแรกที่นิยมใช้ในกลุ่มยาต้านฮอร์โมน คือ tamoxifen จัดอยู่ในกลุ่ม selective estrogen receptor modulators (SERMs) โดย tamoxifen สามารถลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมได้ ("Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials," 2005) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า 1 ใน 3 ของผู้ป่วยที่ได้รับยา tamoxifen เป็นเวลา 5 ปี สามารถกลับมาเป็นมะเร็งเต้านมได้อีกภายในเวลา 15 ปี (Lewis & Jordan, 2005) แสดงถึงภาวะดื้อต่อยา tamoxifen (Green & Carroll, 2007) แพทย์จึงรักษาโดยการเปลี่ยนไปใช้ยาต้านฮอร์โมนชนิดอื่น ได้แก่ aromatase inhibitors (AIs) (B. Huang, Warner, & Gustafsson, 2015) หรือ selective estrogen receptor down regulators (SERDs) (Eroles, Bosch, Perez-Fidalgo, & Lluch, 2012) แต่ยังคงพบปัญหาการดื้อยาและผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรงจากการขาดเอสโตรเจนได้ (Ayyagari et al., 2018)

ในผู้ป่วยที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน แพทย์จะให้ยาในกลุ่ม mTOR inhibitor หรือ cyclin dependent kinase 4 or 6 (CDK4/6) inhibitor โดยอาจให้ร่วมกับยาต้านฮอร์โมนชนิดอื่นที่ผู้ป่วยยังไม่เคยได้รับมาก่อน แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงพบผู้ป่วยที่ดื้อยาในกลุ่ม mTOR inhibitor เนื่องจาก mTOR ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ mTOR complex 1 (mTORC1) และ mTOR complex 2 (mTORC2) ซึ่ง mTOR inhibitor สามารถยับยั้งได้เพียงการทำงานของ mTORC1 ทำให้ mTORC2 สามารถกลับไปกระตุ้นการทำงานของ Akt ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมเจริญเติบโตได้เช่นเดิมและยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงในการเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นเยื่อช่องปากอักเสบ (stomatitis) ซึ่งในผู้ป่วยบางรายมีอาการรุนแรงมากอีกด้วย (de Lima, Hajj, de Lima, & Alves, 2018)



สำหรับ CDK4/6 inhibitor มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CDK4/6 ในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) โดยมีการศึกษาพบว่า เมื่อให้ CDK4/6 inhibitor ร่วมกับยาต้านฮอร์โมนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนที่มีการแพร่กระจายได้ (metastatic luminal breast cancer) (Gampenrieder, Rinnerthaler, & Greil, 2016) แต่ยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงที่รุนแรง คือ ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) ส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่ายขึ้น (Gampenrieder et al., 2016) และพบปัญหาการดื้อยาและผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรง ทางเลือกของการใช้ยาในผู้ป่วยกลุ่มนี้จึงมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการหาสารจากธรรมชาติหรือยาตัวใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและมีผลข้างเคียงน้อย จึงเป็นงานวิจัยในการพัฒนาการรักษามะเร็งเต้านมที่ควรให้ความสำคัญ

แก่นจันทน์หอม (heartwood of *Mansonia gagei* Drumm) หรือจันทน์ขมด จันทน์ขาว จันทน์พม่า จัดอยู่ในวงศ์ Sterculiaceae พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยจันทน์หอมมีสรรพคุณในการต้านการอักเสบ (anti-inflammation) และเนื่องจากเนื้อไม้มีกลิ่นหอม จึงนำมาใช้ในการทำเครื่องหอม ลดความตึงเครียด และมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายในสารสกัดแก่นจันทน์หอม เช่น กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardiac stimulant) ต้านการอาเจียน (antiemetic) ต้านภาวะซึมเศร้า (antidepressant) ต้านเชื้อรา (anti-fungal) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Tiew, loset, Kokpol, Chavasiri, & Hostettmann, 2003) และต้านมะเร็ง (anticancer) (Tiew et al., 2003; Tiew, loset, et al., 2002) ต่อมาได้มีการศึกษาเพื่อแยกสารสำคัญจากสารสกัดแก่นจันทน์หอม ซึ่งพบสารสำคัญหลัก ได้แก่ กลุ่ม mansonone และกลุ่ม mansorin (Tiew, loset, et al., 2002; Tiew, Puntumchai, Kokpol, & Chavasiri, 2002)

mansonone G เป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดในกลุ่ม mansonone ที่สกัดได้จากแก่นจันทน์หอม จากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (anti-estrogenic activity) ด้วยวิธี yeast two hybrid assay และเมื่อทดสอบด้วยวิธี ER-alpha competitor assay พบว่า mansonone G สามารถแย่งฮอร์โมนเอสโตรเจนในการจับกับตัวรับเอสโตรเจนได้ (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany, Salah El Dine, & Hattori, 2013) ต่อมามีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ mansonone G จากแก่นจันทน์หอมในรูปแบบกึ่งสังเคราะห์ คือ ethoxy mansonone G (EMG) ( $C_{17}H_{20}O_3$ , molecular weight = 272 g/mol) โดยการเติมหมู่ ethoxy บริเวณ side chain ของ mansonone G และมีการศึกษาเพื่อทดสอบคุณสมบัติของ EMG เปรียบเทียบกับ mansonone G ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ผลการศึกษาพบว่า EMG สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า mansonone G ถึง 10 เท่า (Hairani, Mongkol, & Chavasiri, 2016) รวมทั้งมีรายงานถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากต้นจันทน์หอมในการแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจน (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany, El Dine, Chung, Nishihara, & Hattori, 2011) และต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด HTB123 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน โพรเจสโตโรนและ human epidermal growth factor receptor (HER2) (triple negative breast cancer) (Tiew et al., 2003; Tiew, loset, et al., 2002) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์

ต้านมะเร็งของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนในระดับหลอดทดลอง

### คำถามการวิจัย

1. EMG มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญ การแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนหรือไม่
2. EMG สามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen และยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามได้หรือไม่

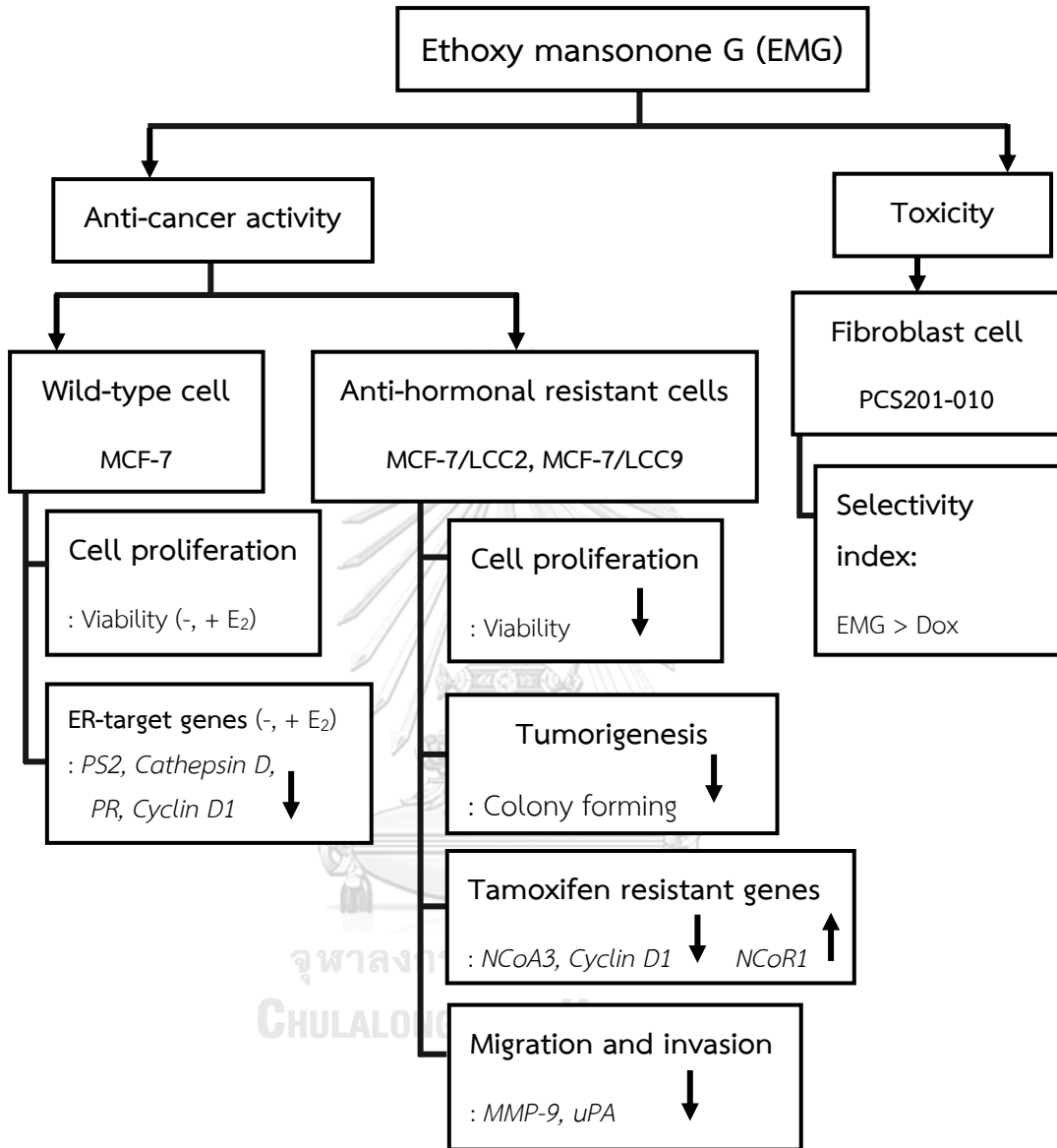
### วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ EMG ต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ EMG ต่อการเจริญ การเจริญแบบไร้การยึดเกาะ (anchorage-independent growth) การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen และการแพร่กระจายและลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของ EMG ในเซลล์ปกติชนิดไฟโบรบลาสต์ PCS201-010

### สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

1. EMG มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและลดการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน
2. EMG มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ การเจริญแบบไร้การยึดเกาะ (anchorage-independent growth) ลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen และลดการแพร่กระจายและลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน
3. EMG ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิดไฟโบรบลาสต์ PCS201-010

กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework)




## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง


#### โรคมะเร็งเต้านม (Breast cancer)

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ในร่างกาย (Daniel, Hagan, & Lange, 2011; B. Huang et al., 2015) โดยเซลล์สามารถเจริญเติบโต แพร่กระจายและลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียงได้ เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิต (Green & Carroll, 2007; V. Craig Jordan, 2004; Osborne, Schiff, Fuqua, & Shou, 2001) โดยมะเร็งที่พบมากที่สุดในประเทศหญิง คือ มะเร็งเต้านม (breast cancer) แต่อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากโรคมะเร็งเต้านมในปีคริสตศักราช 2018 ลดลงประมาณร้อยละ 32 เมื่อเทียบกับช่วงปีคริสตศักราช 1930-2015 (Siegel Rebecca et al., 2018; Siegel et al., 2016) แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาในการตรวจคัดกรอง วินิจฉัยโรคได้ในระยะเริ่มแรก ทำให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วและเกิดประสิทธิภาพสูงสุด แต่ก็ยังมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะลุกลามเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการพยากรณ์โรคไม่ดีและยากต่อการรักษา (Ahmad, 2013; Eroles et al., 2012) เนื่องด้วยกลุ่มยาที่มีใช้สำหรับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะลุกลามยังมีอยู่อย่างจำกัด จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการพัฒนาสารหรือยาใหม่เพื่อลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากโรคมะเร็งเต้านม (Ahmad, 2013; Anbalagan & Rowan, 2015; Hopp et al., 2004; B. Huang et al., 2015; Musgrove & Sutherland, 2009; Viedma-Rodriguez et al., 2014)

#### Estimated New Cases

		Males		Females		
Prostate	164,690	19%		Breast	266,120	30%
Lung & bronchus	121,680	14%		Lung & bronchus	112,350	13%
Colon & rectum	75,610	9%		Colon & rectum	64,640	7%
Urinary bladder	62,380	7%		Uterine corpus	63,230	7%
Melanoma of the skin	55,150	6%		Thyroid	40,900	5%
Kidney & renal pelvis	42,680	5%		Melanoma of the skin	36,120	4%
Non-Hodgkin lymphoma	41,730	5%		Non-Hodgkin lymphoma	32,950	4%
Oral cavity & pharynx	37,160	4%		Pancreas	26,240	3%
Leukemia	35,030	4%		Leukemia	25,270	3%
Liver & intrahepatic bile duct	30,610	4%		Kidney & renal pelvis	22,660	3%
<b>All Sites</b>	<b>856,370</b>	<b>100%</b>	<b>All Sites</b>	<b>878,980</b>	<b>100%</b>	

#### Estimated Deaths

		Males		Females		
Lung & bronchus	83,550	26%		Lung & bronchus	70,500	25%
Prostate	29,430	9%		Breast	40,920	14%
Colon & rectum	27,390	8%		Colon & rectum	23,240	8%
Pancreas	23,020	7%		Pancreas	21,310	7%
Liver & intrahepatic bile duct	20,540	6%		Ovary	14,070	5%
Leukemia	14,270	4%		Uterine corpus	11,350	4%
Esophagus	12,850	4%		Leukemia	10,100	4%
Urinary bladder	12,520	4%		Liver & intrahepatic bile duct	9,660	3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,510	4%		Non-Hodgkin lymphoma	8,400	3%
Kidney & renal pelvis	10,010	3%		Brain & other nervous system	7,340	3%
<b>All Sites</b>	<b>323,630</b>	<b>100%</b>	<b>All Sites</b>	<b>286,010</b>	<b>100%</b>	

รูปที่ 1 อัตรากาการเกิดผู้ป่วยรายใหม่และผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง (Siegel Rebecca et al., 2018)

### ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งเต้านม

#### 1. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรม

- ผู้ที่มีภาวะโรคอ้วนหรือมีการสะสมไขมันในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเกินปกติ เนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถสังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ส่งผลให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีอิทธิพลในร่างกายมากขึ้น (Green & Carroll, 2007)

#### 2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม

- มีประวัติครอบครัวเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีน *Breast cancer type 1 (BRCA1)* หรือ *Breast cancer type 2 (BRCA2)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA ที่เสียหายและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (Eroles et al., 2012)

#### 3. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) คือ การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นระยะเวลาานตลอดช่วงชีวิต

- ผู้หญิงที่มีประจำเดือนเร็วกว่าปกติหรือเร็วกว่าอายุ 12 ปี หรือเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วกว่าปกติ (early menarche) (Lippman et al., 2001)
- ผู้หญิงอายุ 30 ปีขึ้นไปที่ไม่เคยมีการตั้งครรภ์หรือคลอดบุตร (nulliparity) จะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านมมากขึ้น โดยสามารถเพิ่มโอกาสในการเป็นมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (Lippman et al., 2001)
- ผู้หญิงประจำเดือนหมดช้าและอายุ 55 ปีขึ้นไป จะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านมเนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจนจะสามารถทำงานในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Lippman et al., 2001)
- ผู้ป่วยมีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ในเลือดสูงกว่าปกติ เนื่องจากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนถูกเปลี่ยนเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนได้โดยเอนไซม์อะโรมาเตส (aromatase) ซึ่งเมื่อมีระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงจะส่งผลทำให้เกิดมะเร็งเต้านมได้มากกว่าปกติ (Green & Carroll, 2007)
- การรักษาด้วยฮอร์โมนทดแทนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน โดยได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเพียงชนิดเดียวหรือได้รับร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) จะเพิ่มโอกาสในการเป็นมะเร็งเต้านมโดยจะขึ้นกับขนาด ชนิด และระยะเวลาในการได้รับฮอร์โมนด้วย (Lippman et al., 2001)

### อาการของมะเร็งเต้านม

ในระยะแรกผู้ป่วยมักไม่พบอาการผิดปกติ โดยอาจตรวจพบจากการตรวจสุขภาพหรืออาจคลำเจอก้อนบริเวณเต้านม จากนั้นแพทย์จะให้ผู้ป่วยเข้ารับการตรวจเต้านมด้วยวิธี mammography ซึ่งเป็นการใช้รังสีเอกซเรย์กำลังต่ำเพื่อตรวจหาก้อนมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น ซึ่งการตรวจพบมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรก ทำให้มีโอกาสรักษาให้หายขาด และลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย (B. Huang et al., 2015) ส่วนในระยะที่มีการแพร่กระจายหรือลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง มักพบอาการต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้โตหรือมีของเหลว เลือด หรือหนองไหลออกจากบริเวณหัวนม (nipple discharge) (Lippman et al., 2001) หรือมีการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังบริเวณเต้านม คล้ายผิวเปลือกส้ม และอาจคลำพบก้อนบริเวณรักแร้เมื่อเซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายจนถึงชั้นผิวหนัง (Ahmad, 2013; Eroles et al., 2012)

ในการรักษามะเร็งเต้านมควรคำนึงถึงขนาด ชนิดของมะเร็งเต้านม (subtypes) (Ahmad, 2013; Eroles et al., 2012) (ตารางที่ 1) รวมไปถึงบริเวณที่เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายไป โดยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการทำนายโรคดีที่สุดคือ luminal A ซึ่งเป็นชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและสามารถตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมนได้ดี โดยมะเร็งเต้านมชนิดนี้พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด (Green & Carroll, 2007)

ตารางที่ 1 ชนิดของมะเร็งเต้านม (molecular subtypes of breast cancer)

Subtypes	Characteristics
Luminal A	ER (+), PR (+), HER2 (-)
Luminal B	ER (+) น้อยกว่าใน luminal A, PR (+), HER2 (+)
Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) overexpressing	ER (-), PR (-), HER2 (+)
Triple negative breast cancer cells (TNBC)	ER (-), PR (-), HER2 (-), cytokeratin 5/6 (+), EGFR (+)
Normal breast-like	Expressing genes characteristics of adipose tissue

ER: Estrogen receptor, PR: Progesterone receptor, EGFR: Epidermal growth factor receptor

## แนวทางการรักษามะเร็งเต้านม

### การรักษาหลัก

#### การผ่าตัด (surgery):

เป็นการรักษาลำดับแรก โดยผ่าตัดเอาก้อนมะเร็ง เนื้อเยื่อบริเวณรอบ ๆ และต่อมน้ำเหลือง บริเวณรักแร้ออก มีทั้งการผ่าตัดเฉพาะก้อนมะเร็งและผ่าตัดทั้งเต้านม เพื่อป้องกันการลุกลามของ เซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะใกล้เคียง ซึ่งในการรักษามะเร็งเต้านมระยะแรก มักใช้การผ่าตัดก้อนมะเร็ง ออกร่วมกับการให้รังสีรักษาเพื่อป้องกันการแพร่กระจายและรักษาเต้านมไว้ ("Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials," 2005; Eroles et al., 2012)

การรักษาเพื่อป้องกันการลุกลามและกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งเต้านม ซึ่งจะพิจารณาให้การรักษา ตามชนิดของมะเร็งเต้านม ประกอบไปด้วย

#### 1. การให้รังสีรักษา (radiation):

เป็นการรักษาโดยใช้อนุภาครังสีพลังงานสูงเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Wang et al., 2018) นิยมให้เป็นการรักษาเสริมหลังจากการผ่าตัดเฉพาะก้อนมะเร็งเพื่อป้องกันการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น ได้แก่ อากาศบวม แดง ที่ผิวหนังบริเวณหน้าอก เป็นต้น (Ronckers, Erdmann, & Land, 2005)

#### 2. การให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy):

การให้ยาเคมีบำบัดเป็นการใช้ยาชนิดเดียวหรือมากกว่าสองชนิดในการรักษามะเร็งเต้านม ชนิดที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน โพรเจสเทอโรน และ HER2 เป็นหลัก ("Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials," 2005) หรือในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ HER2 หรือ ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนที่ตรวจพบว่าเซลล์มะเร็ง มีการกระจายไปสู่หลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลืองแล้ว แพทย์จะให้ยาเคมีบำบัดในช่วงหลังการผ่าตัด ก้อนออกแล้วและให้ก่อนเริ่มยาต้านฮอร์โมน โดยยาสามารถออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย จำเพาะกับเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วภายในร่างกาย ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติที่แบ่งตัวเร็วเช่นกัน เช่น เซลล์ผิวหนัง เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร เซลล์เม็ดเลือด เป็นต้น ทำให้ผู้ป่วยที่ใชยากลุ่มนี้มักมีอาการผมร่วง คลื่นไส้ อาเจียน ภูมิคุ้มกันต่ำจากผลข้างเคียงของยา โดยยาเคมีบำบัดที่นิยมใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม ได้แก่ doxorubicin, paclitaxel และ gemcitabine เป็นต้น (Zhang et al., 2014)

#### 3. การรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (targeted therapy):

เป็นวิธีการรักษาที่จำเพาะต่อการแสดงออกของตัวรับเป้าหมายบนเซลล์มะเร็ง โดยให้ยาไป จับกับเป้าหมายนั้น ๆ และส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม เช่น เซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ HER2 (Ahmad, 2013) อาจให้การรักษาโดยนำ monoclonal antibody ไป

จับกับ extracellular domain ของ HER2 เช่น trastuzumab ซึ่งป้องกันไม่ให้ endogenous ligand มาจับได้ (Eroles et al., 2012) หรือการใช้ tyrosine kinase inhibitor ซึ่งจะยับยั้ง kinase domain ของ HER2 และ epidermal growth factor receptor (EGFR) เช่น lapatinib ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมได้ (Dovnik & Takac, 2017)

## กลไกในการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนในมะเร็งเต้านม (รูปที่ 2)

เนื่องจากการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษามะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ซึ่งอาศัยฮอร์โมนเอสโตรเจนในการเจริญเติบโต โดยมีกลไกในการทำงาน ดังนี้

### 1. Ligand - dependent pathway (classical or genomic pathway)

#### Classical estrogen signaling แบ่งเป็น 2 วิธี

1) **Direct binding** เอสโตรเจนจับกับตัวรับเอสโตรเจน จากนั้นจะเกิดการเข้าคู่กันของเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจน (homodimerization) และเคลื่อนเข้าสู่บริเวณ promoter ของ ER-targeted gene (Anbalagan & Rowan, 2015; Eroles et al., 2012; Farooq, 2015; Green & Carroll, 2007; B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001; Pearce & Jordan, 2004; Ring & Dowsett, 2004; Stack et al., 1988) จากนั้น co-activators (CoA) และ histone acetyl transferase (HATs) จะเข้ามาจับแล้วส่งผลให้เกิดการกระบวนการ transcription ต่อไป (Anbalagan & Rowan, 2015; Eroles et al., 2012; Farooq, 2015; Green & Carroll, 2007; B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001; Pearce & Jordan, 2004; Ring & Dowsett, 2004; Stack et al., 1988)

2) **indirect binding** เมื่อเอสโตรเจนจับกับตัวรับเอสโตรเจน จะเกิดการเข้าคู่กันและเคลื่อนไปยังบริเวณนิวเคลียสเพื่อจับกับ activation protein 1 (Ap1) และ specificity protein 1 (Sp1) จากนั้นจะไปจับบริเวณ serum response element (SRE) (Musgrove & Sutherland, 2009) แล้วทำให้เกิดกระบวนการ transcription ได้เช่นเดียวกัน เมื่อเกิดการ transcription จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ ER-targeted gene ซึ่งส่วนใหญ่เป็นยีนที่มีหน้าที่ในการพัฒนาการเจริญเติบโตและยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็งเต้านม (Anbalagan & Rowan, 2015; Eroles et al., 2012; Farooq, 2015; Green & Carroll, 2007; B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001; Pearce & Jordan, 2004; Ring & Dowsett, 2004; Stack et al., 1988)

### 2. Ligand - independent pathway (non-classical or non-genomic pathway)

การกระตุ้นตัวรับเอสโตรเจนผ่าน downstream signaling ของ receptor tyrosine kinases (RTK) หรือ growth signaling pathway อื่น ๆ เช่น EGFR, HER2 และ insulin-like growth factor receptor (IGFR) เป็นต้น (Anbalagan & Rowan, 2015; Eroles et al., 2012; Farooq, 2015; Green & Carroll, 2007; B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001; Pearce & Jordan, 2004; Ring & Dowsett, 2004; Stack et al., 1988) จากนั้นจะไปกระตุ้นผ่าน



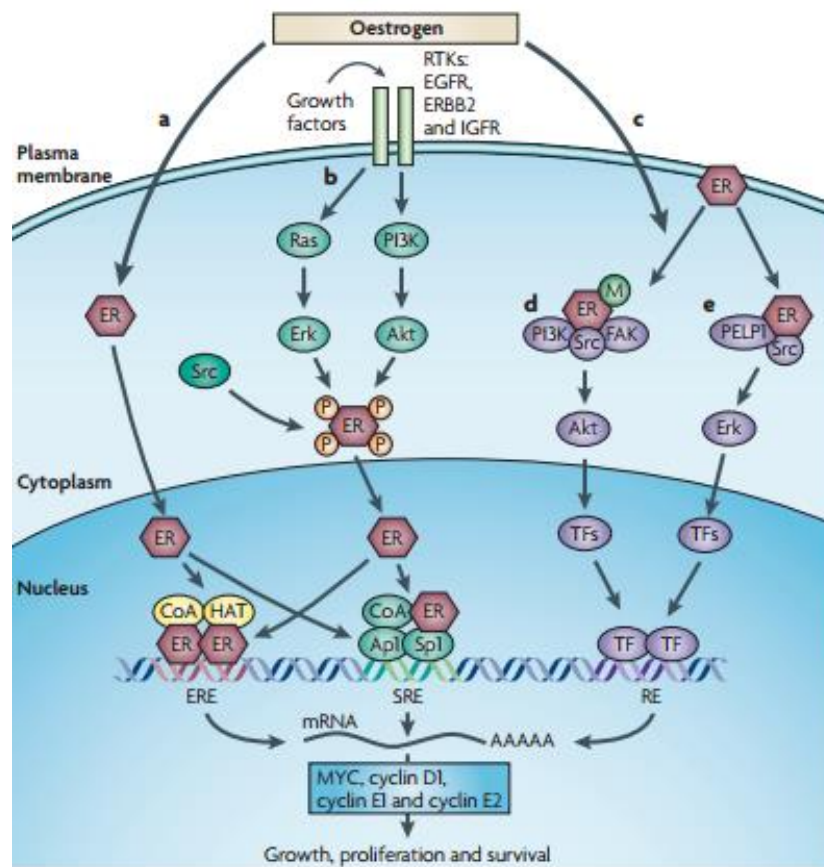
survival pathway เช่น Ras-Erk และ PI3K-Akt pathway ส่งผลให้เกิดการ phosphorylation ตัวรับเอสโตรเจน แล้วจะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสไปจับบน ERE หรือ SRE เพื่อทำให้เกิดกระบวนการ transcription (Anbalagan & Rowan, 2015; Eroles et al., 2012; Farooq, 2015; Green & Carroll, 2007; B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001; Pearce & Jordan, 2004; Ring & Dowsett, 2004; Stack et al., 1988)

### 3. Plasma membrane - ER

การส่งสัญญาณผ่านกลไก non-genomic pathway บนตัวรับเอสโตรเจนบริเวณ cell membrane สามารถส่งผลกระทบต่อ survival pathway ต่าง ๆ ได้แก่ Erk หรือ Akt และทำให้ transcription factor เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสไปจับบริเวณ response element (RE) (Zwart et al., 2015) (รูปที่ 2c) ได้แก่

- การจับของ ligand จะชักนำให้เกิดการสะสมของ protein complex ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ เป็นผลให้เกิดการกระตุ้น transcription factor ไปจับบริเวณ RE และเกิดกระบวนการ ligand-induced methylation (M) ของตัวรับเอสโตรเจน ทำให้มีการสร้าง ER-PI3K-Src-focal adhesion kinase (FAK) ไปกระตุ้น Akt pathway (Anbalagan & Rowan, 2015) (รูปที่ 2d)

- การกระตุ้น Erk โดย ER-Src-PELP1 complex โดยตัวรับเอสโตรเจนบนผิวเซลล์จะไปจับกับ PELP1 ซึ่งเป็น co-regulator (Girard, Daniel, Lange, & Ostrander, 2014) จากนั้นจะเหนี่ยวนำ Src เข้ามาจับกับ complex แล้วส่งผลกระทบต่อ Erk ซึ่งเป็น pathway ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านม และทำให้ transcription factor ไปจับบริเวณ RE (Anbalagan & Rowan, 2015; Eroles et al., 2012; Farooq, 2015; Green & Carroll, 2007; B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001; Pearce & Jordan, 2004; Ring & Dowsett, 2004; Stack et al., 1988) (รูปที่ 2e)



รูปที่ 2 การทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ระดับโมเลกุล (Musgrove & Sutherland, 2009)

### ตัวรับเอสโตรเจน (Estrogen receptor, ER)

ตัวรับเอสโตรเจนจัดอยู่ในกลุ่ม intracellular receptor หรือ nuclear receptor ทำหน้าที่เป็น transcription factor แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ER- $\alpha$  (ER-alpha) และ ER- $\beta$  (ER-beta) (Anbalagan & Rowan, 2015; Lee, Kim, & Choi, 2012; Osborne et al., 2001)

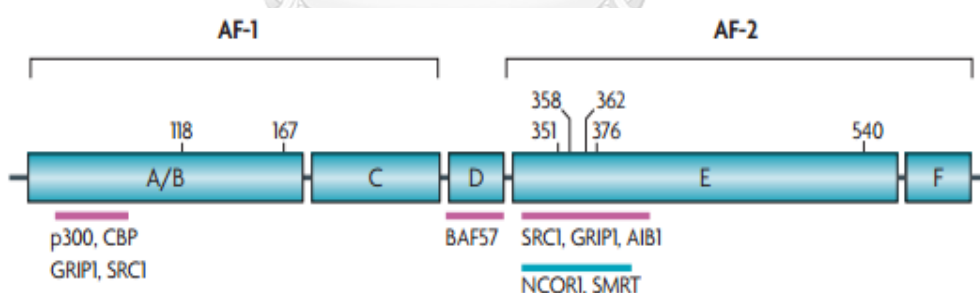
ER- $\alpha$  พบการแสดงออกของ ER- $\alpha$  ในมดลูก บริเวณ stroma ของต่อมลูกหมาก theca cells ของรังไข่ Leydig cells ในอัณฑะ เต้านมและตับ (Anbalagan & Rowan, 2015; Lee et al., 2012; Osborne et al., 2001) มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งเอสโตรเจนจะเข้ามาจับกับ ER- $\alpha$  แล้วส่งผลทำให้เกิดการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (Anbalagan & Rowan, 2015; Lee et al., 2012; Osborne et al., 2001)

ER- $\beta$  พบการแสดงออกมากในต่อมลูกหมาก รังไข่ อัณฑะ ไช้สันหลังและสมอง (Anbalagan & Rowan, 2015; Lee et al., 2012; Osborne et al., 2001) สำหรับบทบาทในมะเร็งเต้านม ยังไม่มีข้อสรุปแน่ชัด เนื่องจากมีหลายการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกัน โดยมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยลดการทำงานของ *c-myc* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่

สำคัญของตัวรับเอสโตรเจน (Haldosen, Zhao, & Dahlman-Wright, 2014; B. Huang et al., 2015) และยังมีการศึกษาที่รายงานบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในมะเร็งเต้านมแต่น้อยกว่า ER- $\alpha$  เนื่องจาก ER- $\beta$  มี AF-1 activity ในระดับที่ต่ำกว่า ER- $\alpha$  (Anbalagan & Rowan, 2015; Lee et al., 2012; Osborne et al., 2001) (Osborne et al., 2001)

**โครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ประกอบไปด้วย 6 ส่วน (รูปที่ 3)**  
(Pearce & Jordan, 2004)

1. **A/B domain** ประกอบไปด้วย activation function 1 (AF-1) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ช่วยทำให้เกิดกระบวนการ transcription ของ ER-targeted gene ในกรณีที่ไม่มีฮอร์โมนเอสโตรเจนมาจับ (ligand independent transcription)
2. **C domain** หรือที่เรียกว่า DNA-binding domain (DBD) มีบทบาทสำคัญต่อการเกิด dimerization และการจับกันของ receptor ต่อ specific DNA sequences
3. **D domain** เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง C และ E domains ซึ่งทำหน้าที่เป็น nuclear localizing signal
4. **E domain** เป็นบริเวณที่ให้ฮอร์โมนหรือ ligand มาจับ เรียกว่า ligand-binding domain (LBD) ประกอบไปด้วย activation function 2 (AF2) ที่สามารถตอบสนองต่อ ligand ส่งผลกระทบการทำงานของ ER และเป็น second nuclear localization signal ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิด dimerization และเป็นบริเวณที่มี helix 12 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการจับของ ligand อีกด้วย
5. **F domain** เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมทั้ง AF1 และ AF2



รูปที่ 3 โครงสร้างของ estrogen receptor (Green & Carroll, 2007)

## ยีนเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน (ER - targeted genes)

เป็นยีนที่เกี่ยวกับการทำงานของตัวรับเอสโตรเจน ซึ่งมีหน้าที่ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต การแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านม ได้แก่

### 1. *pS2 (Trefoil factor1: TFE1)*

pS2 เป็น small secretory polypeptide ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 84 ชนิด โดยการสังเคราะห์และการหลั่งของ pS2 ถูกกระตุ้นด้วย estradiol และ phenol red ซึ่ง pS2 เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับ hormone - dependent breast cancer และตรวจพบได้ในเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็น cell line ของมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (Stack et al., 1988)

### 2. *Cathepsin D (Cath-D)*

Cathepsin D เป็น lysosomal protease ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านม ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต การลุกลามหรือแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ โดย cathepsin D จะย่อยสลายโปรตีนใน tumor microenvironment ของมะเร็งเต้านม โดยจะช่วยย่อยสลาย cathepsin inhibitor cystatin C ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านม (Bach et al., 2015)

### 3. *Cyclin D1 (CCND1)*

Cyclin D1 ทำงานร่วมกับ cyclin dependent kinase (CDK) 4 หรือ 6 เพื่อควบคุมวัฏจักรของเซลล์จากระยะ G1 ถึง S โดย cyclin D1 จะไปยับยั้ง retinoblastoma (Rb) ในระยะ G1 ทำให้ E2F สามารถทำงานได้ มีผลไปกระตุ้นการแสดงออกของ cyclin E ที่จับอยู่กับ CDK2 ทำให้เข้าสู่ระยะ S ได้และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า cyclin D1 มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยา (Musgrove, Caldon, Barraclough, Stone, & Sutherland, 2011; Viedma-Rodriguez et al., 2014)

### 4. *Progesterone receptor (PR)*

Progesterone receptor เป็น nuclear receptor หรือตัวรับภายในนิวเคลียส (Daniel et al., 2011) ซึ่งสามารถทำงานแบบ genomic pathway และ non-genomic pathway ที่กระตุ้นการทำงานด้วย survival pathway อื่น ๆ เช่น receptor tyrosine kinase EGFR หรือ ERBB2 เป็นต้น โดยมักพบตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) ร่วมกับการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (ER) ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน เช่น MCF-7 หรือ T47D (Daniel et al., 2011) ทั้งนี้การจับกันของเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจนสามารถเพิ่มการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) ทำให้เกิดการ phosphorylation ของตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) ส่งผลกระทบต่อการทำงานของ c-Src และทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีตัวรับเอสโตรเจน เช่นเดียวกับการศึกษาที่ให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์ทดลองแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) พบว่าเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะส่งผลให้ตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Clarke, Feil, & Satyaswaroop, 1987) และในการศึกษาทางคลินิกพบว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) จะมีการตอบสนองต่อยาต้านฮอร์โมนน้อยลง ส่งผลให้

อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยลดลง (Hopp et al., 2004) และตัวรับโปรเจสโตโรน (PR) เป็น proliferative factor ในมะเร็งเต้านมอีกด้วย (Daniel et al., 2011)

### ยาต้านฮอร์โมนที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน

(Lewis & Jordan, 2005)

ประกอบด้วย

- **Selective estrogen receptor modulators (SERMs)** ยาหลักในกลุ่มนี้คือ tamoxifen ออกฤทธิ์โดยการแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจนแทนที่ฮอร์โมนเอสโตรเจน ส่งผลยับยั้งการ transcription ของ ER-targeted gene ทำให้ลดการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งเต้านมได้ แต่ในขณะเดียวกันสามารถออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจนที่บริเวณเซลล์กระดูกและเยื่อบุโพรงมดลูก (Eroles et al., 2012; B. Huang et al., 2015) ซึ่งเป็นข้อดีในการเพิ่มมวลกระดูกในวัยหมดประจำเดือน แต่ในทางกลับกันสามารถเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูกได้ โดย tamoxifen มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ซึ่งผู้ป่วยจะได้รับยา tamoxifen เป็นเวลา 5 ปี เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการให้ยา tamoxifen ในระยะเวลามากกว่า 5 ปีไม่ได้ก่อให้เกิดประโยชน์ในการรักษาและยังทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมสามารถพัฒนาไปสู่การดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนได้ (Zwart et al., 2015)
- **Aromatase inhibitors (AIs)** ยากลุ่มนี้จะทำงานโดยการยับยั้งเอนไซม์ aromatase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน androgen เป็น estrogen เหมาะสำหรับมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (Chumsri, Howes, Bao, Sabnis, & Brodie, 2011) โดยยากลุ่มนี้มีข้อแตกต่างจาก tamoxifen คือไม่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอสโตรเจนในเยื่อบุโพรงมดลูก แต่จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการขาดเอสโตรเจนรุนแรงได้ จึงใช้เฉพาะในผู้ป่วยที่หมดประจำเดือนแล้ว ผลข้างเคียงที่พบบ่อยคือ มีอาการปวดตามข้อ ร้อนวูบวาบและผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรง เช่น ภาวะกระดูกพรุนจนอาจเกิดกระดูกหักได้ โดยในปัจจุบันเซลล์มะเร็งเต้านมมีการพัฒนาในการดื้อต่อยากลุ่มนี้เช่นเดียวกัน (B. Huang et al., 2015)
- **Selective estrogen receptor downregulators (SERDs)** ได้แก่ fulvestrant (Eroles et al., 2012) ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายกับ estradiol จึงสามารถแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจน โดยออกฤทธิ์เป็น antagonist ในเนื้อเยื่อทุกชนิด (Yeh, 2013) นอกจากนี้ยังทำให้ตัวรับเอสโตรเจนถูกทำลายและไม่สามารถทำงานได้อีก เหมาะสำหรับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลามในวัยหลังหมดประจำเดือนที่ได้รับยาต้านฮอร์โมนกลุ่มอื่นมาก่อนแล้วมีการดื้อยา (Ayyagari et al., 2018; Y. Huang, Jiang, Sui, Wang, & Fan, 2017) แต่ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยาชนิดนี้แล้วและมีผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรงคือ ทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน มีพิษต่อตับ เป็นต้น (Ayyagari et al., 2018; Y. Huang et al., 2017; Yeh, 2013)

ชนิดของมะเร็งเต้านมที่มีการพยากรณ์โรคที่ดีที่สุดคือ luminal A ซึ่งเป็นชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน โดยฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดนี้ได้ จึงใช้ยาในกลุ่ม SERMs คือ tamoxifen จึงสามารถลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตามพบผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลามประมาณร้อยละ 40 มีการกลับมาเป็นมะเร็งเต้านมซ้ำและมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น บ่งชี้ว่าโรคมะเร็งเต้านมมีภาวะดื้อต่อยา tamoxifen ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา (V. C. Jordan, 2004)

### กลไกในการดื้อยา tamoxifen ของมะเร็งเต้านม

ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลามพบว่าการดื้อยา tamoxifen ถึงร้อยละ 50 (Viedma-Rodriguez et al., 2014) โดยกลไกการดื้อยามีความเกี่ยวข้องกับการทำงานภายในเซลล์หลายส่วน ได้แก่ ความผิดปกติของตัวรับเอสโตรเจน, การกระตุ้นผ่านทาง growth signaling pathway, การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการลดการแสดงออกของยีนที่ยับยั้งหรือควบคุมการทำงานของเซลล์มะเร็ง (ตารางที่ 2, 3, 4) (V. C. Jordan, 2004)

#### 1. ความผิดปกติของตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา (ER- $\alpha$ )

- 1.1 การลดการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา (ER- $\alpha$ ) เมื่อการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนลดลง จะส่งผลให้ยาไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมได้ เนื่องจาก tamoxifen ออกฤทธิ์โดยการแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจน (Lewis & Jordan, 2005)
- 1.2 มีการกลายพันธุ์ของตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา (ER- $\alpha$ ) เช่น การเกิด point mutation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก tyrosine เป็น aspartate ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 351 (D351Y) ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยา เพราะยาไม่สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนที่มีการ mutation ได้ (V. Craig Jordan, 2004)
- 1.3 การเพิ่มการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดแอลฟา (ER- $\alpha$ ) มีการกระตุ้น ligand ให้เข้ามาจับได้มากยิ่งขึ้น เป็นผลให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งความผิดปกติของ receptor ในลักษณะนี้จะพบได้น้อยมาก (Musgrove & Sutherland, 2009)

#### 2. การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ ER-coregulator

- a. การเพิ่มการแสดงออกของ co-activator เช่น nuclear receptor coactivator 3 (NCoA3) หรือ amplified in breast cancer 1 (AIB1) หรือ steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) เป็น ER co-activator ที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการ transcription ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมสามารถเจริญเติบโตได้ (List, Reiter, Singh, Wellstein, & Riegel, 2001) เมื่อฮอร์โมนเอสโตรเจนจับกับตัวรับเอสโตรเจนตรงบริเวณ hydrophobic pocket จะทำให้ helix 12 (H12) เลื่อนมาปิดบริเวณที่มีการจับของฮอร์โมนเอสโตรเจนกับตัวรับ ทำให้การจับเสถียรยิ่งขึ้นและแสดงส่วน LXXL motif เพื่อให้ coactivator เข้ามาจับและส่งผลให้เกิดกระบวนการ transcription ต่อไป (Farooq, 2015) โดยมีการแสดงออกของ NCoA3 มากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมถึงร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับเซลล์เต้านมปกติ โดยมีการศึกษาใน

เซลล์มะเร็งเต้านมพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยา tamoxifen ชนิด MCF7/LCC9 มีการแสดงออกของโปรตีน NCoA3 มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ไม่มีการดื้อยา MCF7 (Sakunrangsit, Kalpongkul, Pisitkun, & Ketchart, 2016) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสัตว์ทดลองที่จัดอยู่ในกลุ่ม NCoA3 ribozyme active มีขนาดของก้อนมะเร็งที่ใหญ่ขึ้นเมื่อให้ tamoxifen (List, Lauritsen, et al., 2001) รวมไปถึงการศึกษาทางคลินิกพบว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ NCoA3 ที่เพิ่มขึ้น จะมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ NCoA3 ที่น้อยกว่า ( $P=0.017$ ) (Zhao et al., 2003)

การปรับเปลี่ยนการทำงานของ ER co-activator คือ proline, glutamate and leucine rich protein 1 (PELP1) ซึ่งจะไปกระตุ้น SRC, ERK family kinases และกระตุ้นการทำงานของตัวรับเอสโตรเจนผ่าน PI3K pathway ซึ่งเป็น pathway ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Girard et al., 2014) (ตารางที่ 2)

- 2.2 การลดการแสดงออกของ co-repressor** ได้แก่ nuclear receptor co-repressor 1 (NCoR1) โดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของ histone deacetylase complex (HDAC) ส่งผลให้เกิด chromatin condensation และยับยั้งกระบวนการ transcription ในเซลล์มะเร็งเต้านม (Ring & Dowsett, 2004) จากการศึกษาของ Ring และคณะในปีคริสต์ศักราช 2004 พบว่ามีการลดลงของ NCoR1 ในเซลล์ MCF7 ที่มีการดื้อยา tamoxifen (Lavinsky et al., 1998) ส่วนการศึกษาทางคลินิกพบว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ NCoR1 ต่ำมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยลดลง ( $P = 0.0076$ ) (Girault et al., 2003)

ตารางที่ 2 ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ ER และ co-regulators ต่อการดื้อยา tamoxifen (Musgrove & Sutherland, 2009)

ER and co-regulators	
โมเลกุลที่ผิดปกติ	ความผิดปกติ
ER- $\alpha$	การแสดงออกลดลงหรือเกิด mutation
Activator protein1 (AP1)	การแสดงออกมากเกินไป
Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)	การกระตุ้นการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น
Nuclear receptor co-activator 3 (NCoA3)	การแสดงออกและการ phosphorylation เพิ่มมากขึ้น
Nuclear receptor co-repressor 1 (NCoR1)	การแสดงออกลดลง

### 3. การกระตุ้นผ่านทาง growth signaling pathway อื่น ๆ โดยไม่อาศัยฮอร์โมนเอสโตรเจน

เป็นกลไกในการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในสภาวะที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนน้อยลงหรือไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้เกิดการดื้อยา เช่น มีการสูญเสีย PTEN ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ PI3K (Holmes, 2011) เพื่อไม่ให้เกิดการกระตุ้นที่มากเกินไปในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยา ทำให้มีการกระตุ้น PI3K/Akt เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม และการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ receptor ที่สามารถจับกับ growth factor ได้ เช่น EGFR HER2 และ fibroblast growth factor receptor (FGFR) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ growth factor receptors และ cytoplasmic signaling ต่อการดื้อยา tamoxifen

Growth factor receptors and cytoplasmic signaling	
โมเลกุลที่ผิดปกติ	ความผิดปกติ
EGFR, ERBB2 (HER2)	การแสดงออกหรือการเปลี่ยนแปลงของ receptor ที่ผิดปกติหรือมากเกินไป
FGFR	มีการแสดงออกมากเกินไปโดยเฉพาะ FGFR4
Akt activation	การแสดงออกหรือกระตุ้นการทำงานของ Akt ที่มากเกินไป
PTEN loss	สูญเสียการทำงานของ PTEN ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ PI3K

### 4. การเพิ่มของ cell cycle regulators และ apoptotic proteins ที่มากกว่าปกติ

มีการศึกษาพบว่า มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาจะมีการเพิ่มขึ้นของ cell cycle regulators เช่น cyclin D1 (Musgrove et al., 2011) ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวผิดปกติ และยังพบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายแบบ apoptosis เช่น Bcl-2 ซึ่งในทางตรงกันข้ามมีการลดลงของ CDK inhibitors และ pro-apoptotic protein จึงส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาสามารถเจริญเติบโตและลดการตายแบบ apoptosis (Abukhdeir & Park, 2008)



ตารางที่ 4 ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle regulators และ apoptotic proteins ต่อการดื้อยา tamoxifen

Cell cycle	
โมเลกุลที่ผิดปกติ	ความผิดปกติ
Cyclins D1, E1	การแสดงออกมากเกินไป
MYC	การแสดงออกมากเกินไป
CDK inhibitors: p21, p27	การแสดงออกลดลง
Apoptosis	
Bcl-2, BAD	การแสดงออกของ Bcl-2 เพิ่มขึ้น, BAD ลดลง

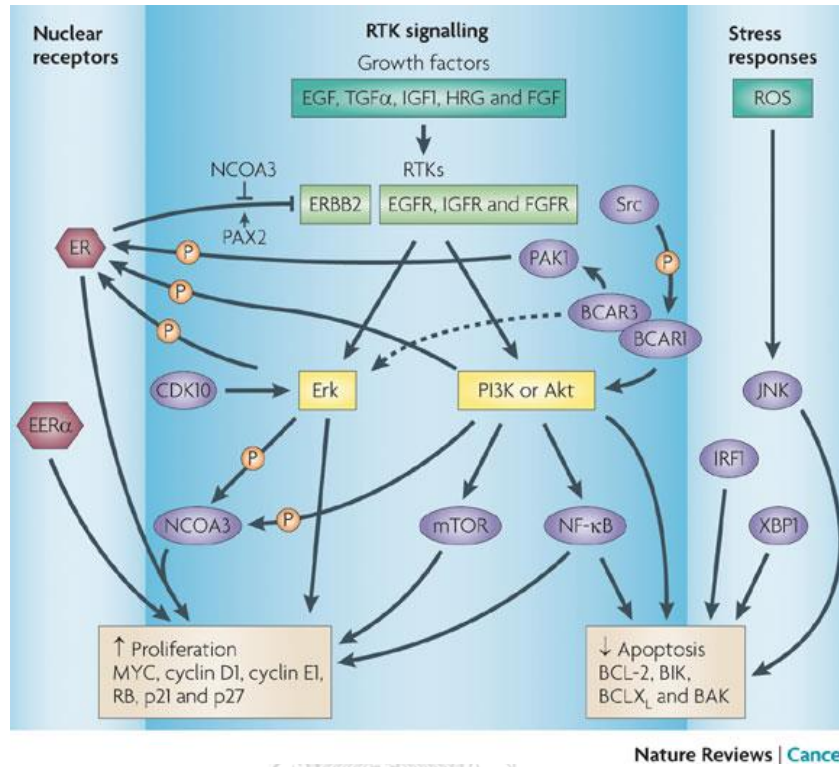
PI3K pathway และ CDK 4/6 มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการรักษา ซึ่งมีการพัฒนายากลุ่มใหม่เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อ ยาด้านฮอร์โมน ได้แก่ PI3K inhibitors และ CDK 4/6 inhibitors

### Phosphatidylinositol- 3- kinase (PI3K)

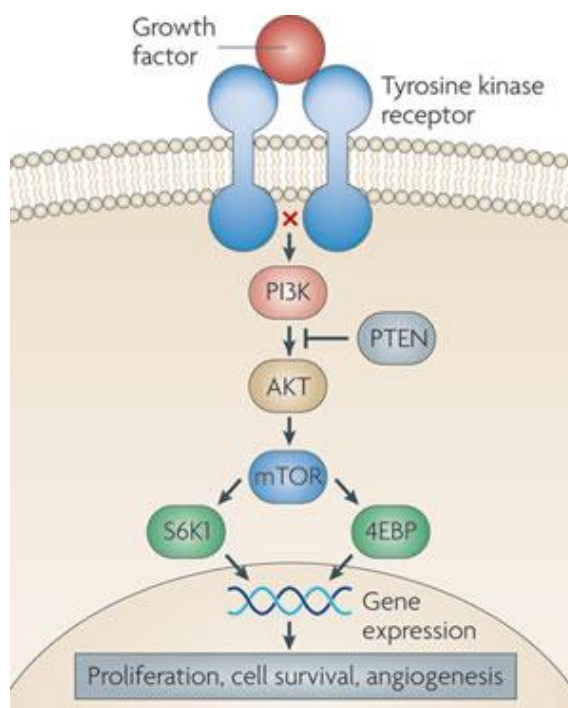
การพัฒนา ยาใหม่เป็นอีกทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน โดยแนวทางหนึ่งคือการยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction pathway) ที่สำคัญ ได้แก่ PI3K/Akt pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์มะเร็ง (Maira, 2011) เมื่อมะเร็งเต้านมมีการดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนจะกระตุ้นการทำงานของ PI3K pathway เพิ่มขึ้นกว่าปกติ ทั้งยังมีการเพิ่มการแสดงออกของ HER2 และสูญเสียการทำงานของ PTEN ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ PI3K เป็นต้น (Bachman et al., 2004) โดยใน pathway มีโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ PI3K Akt และ mTOR ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนา ยาในกลุ่ม PI3K inhibitors Akt inhibitors และ mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors ในปัจจุบันมีรายงานปัญหาของการดื้อยา PI3K และ mTOR inhibitors เนื่องจากเซลล์มะเร็งจะมีการปรับตัวเมื่อถูกยับยั้งโปรตีนใน pathway ดังกล่าวและอาจส่งผลทำให้เกิดการ mutation ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ PI3K/Akt pathway signaling เช่น *PIK3CA* (Vora et al., 2014) นอกจากนี้ยายังมีผลข้างเคียงที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้ อาเจียน อาหารไม่ย่อย และท้องเสีย และยาสามารถผ่าน blood brain barrier ได้ ทำให้สามารถยับยั้ง PI3K บริเวณระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการแปรปรวน ตื่นตระหนก ซึมเศร้า เป็นต้น (Ackermann et al., 2008) และยังมีผลข้างเคียงรุนแรงคือ โรคปอดบวม (pneumonia) ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 20 และมีไข้จากเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenic fever) ซึ่งพบได้ร้อยละ 11 และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองและทางคลินิกพบว่ายาในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดลำไส้อักเสบ (colitis) เป็นเหตุให้ต้องหยุดการใช้ยา (Ortiz-Maldonado, García-Morillo, & Delgado, 2015) และไม่นิยมใช้เป็นยาเดี่ยวเนื่องจากพบปัญหาการดื้อยาและประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร ปัจจุบันใน clinical guideline ไม่แนะนำให้ใช้ยาในกลุ่มนี้กับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนแล้ว (Chen et al., 2017; Dey, De, & Leyland-Jones, 2017)

mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors เป็นยาอีกตัวที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมผ่านทาง PI3K/Akt pathway โดยประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลักคือ mTORC1 และ mTORC2 (Hare & Harvey, 2017) ซึ่ง mTORC1 จะทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์โปรตีน ขณะที่ mTORC2 จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ kinase หรือการ phosphorylation ของ survival pathway (Michaloglou et al., 2018) โดยการทำงานของ mTOR ที่มากเกินไปจะพบได้ในโรคมะเร็งหลายชนิด รวมไปถึงมะเร็งเต้านม (Eroles et al., 2012) โดยการทำงานของยาในกลุ่มนี้คือ rapamycin จะไปจับกับตัวรับที่อยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular receptor) FK506 binding protein 12 (FKBP12) ส่งผลไปยับยั้งเฉพาะที่ mTORC1 ทำให้ชะลอการเจริญเติบโตและลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ แต่ mTORC2 ทำงานได้เช่นเดิมจึงสามารถไปกระตุ้น Akt ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเจริญเติบโตและดื้อต่อยา หลังจากนั้นมีการพัฒนา ยาในกลุ่ม rapalogue ขึ้นมา ได้แก่ Everolimus ถูกนำมาใช้ร่วมกับ exemestane ในผู้ป่วยวัยหมดประจำเดือนที่เป็นมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนซึ่งเคยได้รับยา aromatase inhibitors แล้วเกิดปัญหาในการดื้อยา แต่ปัจจุบัน everolimus เริ่มพบปัญหาในการดื้อยาเช่นเดียวกัน (Petrossian et al., 2018) นอกจากปัญหาการดื้อยา ยังพบผลข้างเคียง

ของยา คือ เยื่อช่องปากอักเสบ (Stomatitis), ผื่นผิวหนัง (Rash), ภาวะโลหิตจาง (Anemia) และ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) อีกด้วย (de Lima et al., 2018; Dey et al., 2017)



รูปที่ 4 กลไกการดื้อยาต้านฮอร์โมนในมะเร็งเต้านม (Musgrove & Sutherland, 2009)



Nature Reviews | Drug Discovery

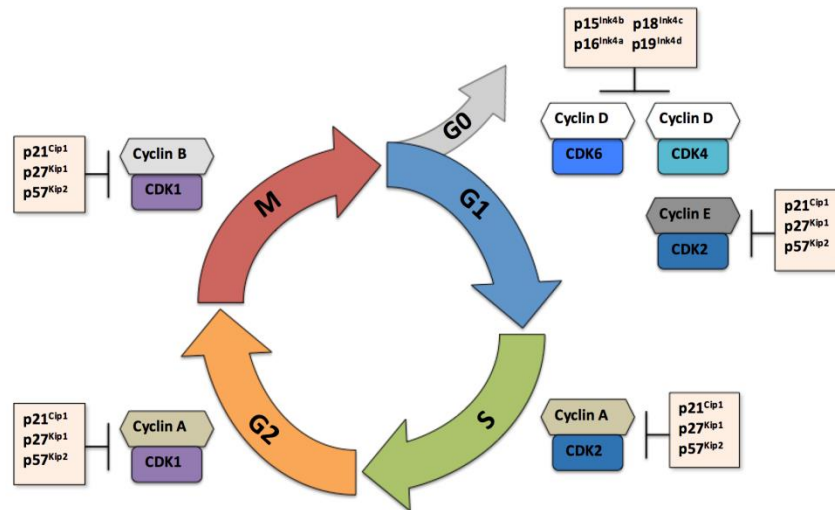
รูปที่ 5 PI3K pathway (Holmes, 2011)

### Cyclin dependent kinase 4/6 inhibitors (CDK4/6 inhibitors)

Cell cycle หรือวัฏจักรเซลล์ถือเป็นวงจรสำคัญในการดำรงชีวิต การแบ่งตัวหรือการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งถูกควบคุมการทำงานโดย cyclin-dependent kinases (CDK) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ serine/threonine kinases โดย CDKs จะสามารถทำงานได้เมื่อจับกับโปรตีนที่เรียกว่า cyclin (Gampenrieder et al., 2016) รณมมหาวิทยาลัย

ในเซลล์มะเร็งจะมีการรบกวนการทำงานของ cell cycle ทำให้มีการแบ่งตัวไปได้อย่างต่อเนื่อง (Vora et al., 2014) โดยใน cell cycle จะแบ่งออกได้เป็น 4 phase ได้แก่ G<sub>1</sub> (GAP 1), S phase (DNA synthesis), G<sub>2</sub> (GAP 2) และ M phase (mitosis) โดยตัวควบคุมหลักของ G<sub>1</sub>-S phase คือ CDK4/6 และ cyclin D1 (CCND1) ซึ่งเมื่อรวมตัวกันจะมีผลไปเติม phosphate ให้ retinoblastoma (Rb) protein ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ เมื่อ Rb ไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้ transcription factor family E2F หลุดออกและกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงมีการนำยาในกลุ่ม CDK4/6 inhibitors มาใช้เพื่อรักษามะเร็งมากขึ้น โดยในการรักษามะเร็งเต้านมมักใช้ยาในกลุ่มนี้ร่วมกับยาต้านฮอร์โมน เช่น aromatase inhibitors (AIs) หรือ Fulvestrant (Ayyagari et al., 2018) แต่ในปัจจุบันพบรายงานการดื้อยาในกลุ่มนี้แล้ว โดยเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด non-luminal หรือ basal-like ระยะลุกลาม (Muranen, Meric-Bernstam, & Mills, 2014) เนื่องจากเซลล์มะเร็งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตผ่านกระบวนการอื่นได้ (O'Leary et al., 2016) ผลข้างเคียงที่พบของยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน เยื่อช่องปากอักเสบ พิษต่อระบบทางเดิน

อาหาร (gastrointestinal toxicities) โลหิตจาง เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดมีการลดลงอย่างรุนแรง (severe neutropenia) ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อได้ (Finn, Aleshin, & Slamon, 2016)



รูปที่ 6 วัฏจักรของเซลล์ (Abukhdeir & Park, 2008)



### การดีออกซิและการลุกลามของมะเร็ง

แม้ว่าในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีในการวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจนสามารถลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยในระยะแรกได้มากขึ้น แต่ผู้ป่วยบางส่วนมีการดำเนินโรคเข้าสู่ระยะลุกลาม โดยประมาณร้อยละ 40 ของผู้ป่วยในระยะลุกลามมักจะมีการกลับมาเป็นซ้ำและต้องต่อยาต้านฮอร์โมน (Zwart et al., 2015) ทำให้เกิดการลุกลามและแพร่กระจายของมะเร็งเต้านม โดยการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน ตั้งแต่เซลล์มะเร็งหลุดออกจาก basement membrane ของก้อนมะเร็ง จากนั้นจะมีการลุกลามเข้าสู่บริเวณ stroma เซลล์มะเร็งจะแทรกตัวเข้าไปภายในหลอดเลือดหรือท่อน้ำเหลืองและถูกขนส่งไปยังบริเวณอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมมักจะแพร่กระจายไปยังกระดูกมากที่สุด รองลงมาเป็น ตับ ปอด สมอง เป็นต้น เมื่อเซลล์มะเร็งไปถึงยังบริเวณอวัยวะที่มีการแพร่กระจาย จะส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของมะเร็งและสร้างหลอดเลือดใหม่ตรงบริเวณอวัยวะที่มีการแพร่กระจาย ทำให้อวัยวะเหล่านั้นไม่สามารถทำงานได้เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในที่สุด (Muller et al., 2001; Roomi, Monterrey, Kalinovsky, Rath, & Niedzwiecki, 2009)

### กระบวนการลุกลามของเซลล์มะเร็ง

ในการลุกลามของเซลล์มะเร็งจะมีการย่อย extracellular matrix (ECM) ซึ่งเป็นโครงข่ายของ extracellular molecules เช่น collagen, fibronectin, proteoglycans, laminin และ glycoproteins อื่น ๆ อีกหลายชนิด ECM ทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังบริเวณใกล้เคียง (Roomi et al., 2009) โดยเซลล์มะเร็งที่สามารถลุกลามไปยังบริเวณอื่นจะหลั่งเอนไซม์ proteases เพื่อย่อย ECM โดยเอนไซม์ protease ที่สำคัญคือ เอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) พบมากในมะเร็งระยะลุกลามหรือมะเร็งที่มีการดีออกซิ (Mehner et al., 2014)

Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นเอนไซม์สลายโปรตีนที่อาศัยการทำงานของ zinc ร่วมกับ calcium โดยแรกเริ่มจะอยู่ในรูป inactive เป็น pro-enzymes ต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็น active form และสามารถทำงานได้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีจำนวนหลายชนิด ซึ่งตัวที่มีการแสดงออกมากในมะเร็งเต้านม คือ MMP-9 หรือ gelatinase B (Stetler-Stevenson, 2001) มีบทบาทสำคัญในการย่อย type IV collagen และ gelatin ซึ่งเป็นสองส่วนประกอบหลักของ ECM ทั้งยังเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลักของ basement membrane โดยมีการศึกษาที่บ่งบอกว่าการเพิ่มของ MMP-9 จะสัมพันธ์กับการลุกลามและความรุนแรงของมะเร็งเต้านม (Gohji et al., 1998; Mehner et al., 2014) และยังสัมพันธ์กับอัตราการแพร่กระจายไปบริเวณต่อมน้ำเหลือง อวัยวะบริเวณใกล้เคียงและอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ลดลง (Cathcart, Pulkoski-Gross, & Cao, 2015)

Urokinase plasminogen activator (uPA) ถูกสร้างจากเซลล์มะเร็ง ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ protease ในการย่อยสลาย ECM ช่วยให้เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายและลุกลามไปยังบริเวณใกล้เคียงได้ (Duffy, McGowan, Harbeck, Thomssen, & Schmitt, 2014) โดย uPA จะจับกับตัวรับคือ Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) ซึ่งพบตัวรับนี้ได้ในเลือด แล้วจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ plasminogen ให้อยู่ในรูป plasmin เกิดการปล่อย proteolytic

enzyme เช่น gelatinase, fibronectin, fibrin เป็นต้น (Wilkins-Port, Higgins, Higgins, Kobori-Hotchkiss, & Higgins, 2012) ทำให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่และลุกลามได้ในที่สุด ทั้งนี้พบว่า uPA เป็น prognostic marker ที่สำคัญในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เริ่มมีการแพร่กระจายไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง (Duffy et al., 2014) ในขณะเดียวกัน plasmin จะสามารถไปกระตุ้นการทำงานของ Pro-MMPs ให้อยู่ในรูปของ MMP ซึ่งเป็นอีกเอนไซม์ที่สำคัญในการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมอีกด้วย (Bevan & Mala, 2008)

ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการพัฒนายาหรือวิธีการรักษาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ แต่ยังคงพบผู้ป่วยอีกจำนวนไม่น้อยเสียชีวิตจากการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมไปยังอวัยวะข้างเคียง (Duffy et al., 2014) ซึ่งมีสาเหตุสำคัญมาจากการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา (Gohji et al., 1998; Mehner et al., 2014) และยาที่มีใช้ในปัจจุบันมักพบผลข้างเคียงที่รุนแรง ได้แก่ การกระตุ้นการทำงานของเยื่อโพรงมดลูกมากเกินไป ก่อให้เกิดมะเร็งเยื่อโพรงมดลูกได้ ภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนที่รุนแรงส่งผลให้กระดูกพรุนและหักได้ (V. C. Jordan, 2004) หรือแม้แต่นวัตกรรมใหม่ที่น่าสนใจในการรักษา พบปัญหาการดื้อยาและผลข้างเคียงของยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหายาหรือสารจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยาและมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด

## จันทน์หอม (*Mansonia gagei* Drumm)



รูปที่ 7 ต้นจันทน์หอม (Tiew et al., 2003)

เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ พบในสภาพดินเกือบทุกชนิดของป่าดิบแล้ง (Tiew, loset, et al., 2002) มีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น จันทน์พม่า จันทน์ขาว หรือจันทน์ชะมด จัดอยู่ในวงศ์ Sterculiaceae และพบได้ในประเทศไทย บริเวณที่พบ คือ ภาคตะวันตกและภาคตะวันออก และเนื่องจากเนื้อไม้มีกลิ่นหอม จึงถูกนำมาใช้ในการฟ่อนคลาย ลดความตึงเครียด (Tiew, Puntumchai, et al., 2002)

จันทน์หอมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการกระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardiac stimulant), ฤทธิ์ต้านการอาเจียน (antiemetic) ฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้า (antidepressant) ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) ฤทธิ์ต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Anti-estrogenic activity) (El-Halawany et al., 2011) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cell) และเซลล์มะเร็งเต้านม (HTB123 cell) (Tiew et al., 2003) เป็นต้น

จากการศึกษาของ Tiew ในปีคริสต์ศักราช 2003 ได้นำใบ เปลือกไม้ รากและแก่นมาศึกษาสารสำคัญของจันทน์หอม (*Mansonia gagei* Drumm) โดยการสกัดด้วย dichloromethane, ethyl acetate และ methanol โดยแยกตามคุณสมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ได้เป็นสารต่าง ๆ ในกลุ่มของ coumarin และ naphthoquinone ดังนี้ mansorin A B C mansonone N O P Q C E G H dehydrooxoperezinone 3-methoxy-4,5-dihydroxybenzaldehyde, mansoxetane, mansonone R และ mansonone S โดย mansonones N O P Q R S และ mansoxetane เป็นสารใหม่ที่พบในธรรมชาติ (Tiew et al., 2003)

จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบ พบว่าสารสกัด dichloromethane จากรากของจันทน์หอมมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระและที่สำคัญมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านม (HTB123 cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cell) เป็นต้น (Tiew et al., 2003; Tiew, loset, et al., 2002)



### Mansonone G (MG)

ในปีคริสตศักราช 2007 Halawany และคณะได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนของ mansonone และ mansorin A ซึ่งทดสอบด้วยวิธี ER-competitor assay พบว่า mansonone มีความสามารถในการจับกับ ER- $\beta$  ได้ดีกว่า ER- $\alpha$  และจากการทดสอบด้วยวิธี yeast two hybrid assay พบว่า mansonone มีคุณสมบัติในการต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้อีกด้วย (ER antagonist) (El-Halawany et al., 2007)

### Antibacterial activity

ในปีคริสตศักราช 2016 Hairani และคณะได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่า mansonone G สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. Aureus* ที่ MIC เท่ากับ 62.5  $\mu$ M ผู้วิจัยจึงทำการสังเคราะห์สารใหม่จาก mansonone G จำนวน 12 สาร โดยแต่ละสารจะมี side chain ที่แตกต่างกันและได้นำไปทำการศึกษาต่อเนื่องในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารกึ่งสังเคราะห์จาก mansonone G มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดีขึ้นถึง 10 เท่าเมื่อเทียบกับ mansonone G (Hairani et al., 2016)

### Anti-cancer activity

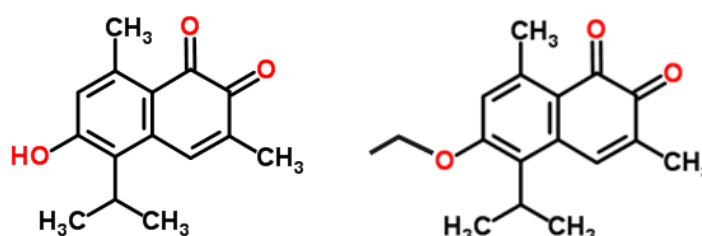
จากการศึกษาสารสกัดของต้นจันทน์หอม พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ซึ่งทดสอบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cell) และเซลล์มะเร็งเต้านม (HTB123 cell) (Tiew et al., 2003) และในขณะเดียวกันมีการศึกษาสารสำคัญที่ถูกสกัดมาจากแก่นของต้นจันทน์หอม คือกลุ่ม mansonone พบว่า มีคุณสมบัติในการต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ (anti-estrogenic activity) (El-Halawany et al., 2007)

### Anti-adipogenic activity

จากการศึกษาของ Kim และคณะในปีคริสตศักราช 2017 พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้ง adipocyte differentiation ในเซลล์ 3T3-L1 และที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ M สามารถลดการสะสมของไขมันได้ถึงร้อยละ 40 (Kim et al., 2017)

### Ethoxy mansonone G (EMG)

ethoxy mansonone G ( $C_{17}H_{20}O_3$ , Molecular weight = 272 g/mol) เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic compound) ที่สกัดมาจากแก่นของต้นจันทน์หอม (heartwood of *Mansonia gagei* Drumm) โดยใช้  $CH_2Cl_2$  (Hairani et al., 2016)



รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Mansonone G และ Ethoxy mansonone G

Ethoxy mansonone G ถูกสังเคราะห์จาก mansonone G ด้วยการเติมหมู่ ethyl บริเวณ side chain ของ mansonone G และมีการศึกษาเพื่อทดสอบคุณสมบัติของ mansonone G เปรียบเทียบกับ ethoxy mansonone G ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียพบว่า ethoxy mansonone G สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า mansonone G ถึง 10 เท่า (Hairani et al., 2016) แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ของ ethoxy mansonone G ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (Hairani et al., 2016)

ในปีคริสต์ศักราช 2017 Kim และคณะได้ทำการทดสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเซลล์ไขมันพบว่า ethoxy mansonone G หรือ EMG ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 cells ทั้งในวันที่ 2 และวันที่ 6 ของการทดลองด้วยวิธี CYTOX (cell viability assay kit) ทั้งยังมีคุณสมบัติในการลดการสะสมของไขมันโดยวิธี oil red O staining (Kim et al., 2017)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลของ Ethoxy mansonone G ในการต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนในระดับหลอดทดลอง และเนื่องจาก EMG เป็นสารสังเคราะห์ใหม่ จึงมีความจำเป็นในการทดสอบความปลอดภัยในเซลล์ปกติของร่างกายด้วย

#### ความปลอดภัย (Safety profile)

เนื่องจาก Ethoxy mansonone G เป็นสารสังเคราะห์ใหม่ ยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษหรือความปลอดภัยในเซลล์ปกติและสัตว์ทดลอง (*in vitro* and *in vivo*) และยังไม่มีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต้นจันทน์หอมและสาร mansonone G ซึ่งเป็นสารต้นแบบของ ethoxy mansonone G

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

#### สารทดสอบ

Ethoxy mansonone G (EMG) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วรินทร์ ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### เซลล์ที่ใช้ทดสอบ

- เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (human breast adenocarcinoma cell line) MCF-7 จากบริษัท ATCC (USA)
- เซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยา tamoxifen (4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer cell) MCF-7/LCC2 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อทั้งยา tamoxifen และ fulvestrant (Antiestrogen-resistant MCF-7) MCF-7/LCC9 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Robert Clarke (Georgetown University Medical center, Washington, DC, USA) (Brunner et al., 1997; Brunner et al., 1993)
- เซลล์ปกติชนิดไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) PCS201-010 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

#### สารเคมี

- 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)
- ซีรัมจากตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)
- ซีรัมจากตัวอ่อนลูกวัว ชนิดซาโคลเด็กซ์แทรนสตริป (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 3.7% (Formaldehyde solution, Sigma, USA)
- คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet dye, Sigma, USA)
- ไตรโซล (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)
- สารละลายดีเอ็นทีพี (Deoxynucleotide (dNTP) solution mix, Vivantis, Malaysia)
- โอลิโกไพรเมอร์ (Oligo (dT) 15 primer, Vivantis, Malaysia)
- ตัวยับยั้งอาร์เอ็นเอส (Recombinant RNasin® RNase inhibitor, Vivantis, Malaysia)
- ยาทาเม็อกซิเฟน (4-hydroxytamoxifen, Sigma, USA)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยนที่ปราศจากเชื้อ (Sterile phosphate buffer saline; PBS)
- เอสโตรเจน (Estradiol; E<sub>2</sub>, Sigma, USA)
- ยาดอกโซรูบิซิน (Doxorubicin, Sigma, USA)

#### เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO<sub>2</sub> incubator, Thermo Scientific, USA)
- ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar flow hood, Labconco, USA)
- เครื่องอ่านค่าบวมไมโครเพลท (Microplate reader, MTX Lab Systems, USA)
- เครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรม (Nanodrop, Thermo electron corporation, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Alc, UK)
- เครื่องเขย่าสาร (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)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงแบบเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast light microscope, Nikon, Japan)

- เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
- 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 0.1 มิลลิลิตร (PCR tube, Corning, USA)
- ทิปสำหรับไปเปตต์ขนาด 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 และ 1000 มิลลิลิตร (Glass bottle, Brand, USA)

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ได้แก่ MCF-7 และ เซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ด้วยอาหารชนิด Minimum Essential Media (MEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 5% penicillin & streptomycin 1% และ amphotericin B ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%, อุณหภูมิ 37 °C โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยง มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันและทำการ sub culture เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ของพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยง

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose ที่ประกอบด้วย FBS 10%, penicillin & streptomycin 1% ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยง มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันและทำการ sub culture เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ของพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยง

### การเตรียมสารละลาย ethoxy mansonone G (EMG)

ทำละลาย EMG ด้วย DMSO เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 50 mM เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และเมื่อทำการทดลองจึงนำ stock solution มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ โดยให้เซลล์ที่ได้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.2% เป็นกลุ่มควบคุม

### การศึกษาผลของ mansonone G (MG) และอนุพันธ์ของ mansonone G ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT assay

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) เป็นสารที่ใช้ทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยวัดจากความสามารถในการทำงานของ mitochondria ซึ่งมีหลักการ คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ mitochondrial reductase ที่สามารถเปลี่ยนสาร MTT (สีเหลือง) ให้เป็นผลึก formazan (สีม่วง) (Stockert, Blázquez-Castro, Cañete, Horobin, & Villanueva, 2012)

เมื่อเซลล์ MCF-7/LCC2 มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM จึงทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 96 well plates ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบความเข้มข้น 0.1 1 10 และ 100  $\mu\text{M}$  เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการวัดผลโดยวิธี MTT assay และคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสูตร ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มสารทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มควบคุม}}$$

จากนั้นนำมาคำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA).

### การศึกษาผลของ EMG ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT assay

เนื่องจากการศึกษานี้มีการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน estradiol ( $\text{E}_2$ ) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมให้คล้ายกับสภาวะปกติในร่างกาย จึงต้องมีการลดปริมาณฮอร์โมนสเตียรอยด์อื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อาจมีผลรบกวนการศึกษา ด้วยการเปลี่ยนชนิดอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากการ sub culture ทุก 2 วัน เริ่มจากอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ตามด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และสุดท้ายเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMEM ซึ่งไม่มี phenol red เนื่องจากการศึกษาพบว่า phenol red สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนและทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีการเจริญเติบโตได้และเติม charcoal stripped FBS 2% ซึ่งผ่านกระบวนการใช้ activated carbon ดูดซับ growth factor และฮอร์โมนต่าง ๆ ออ ก (Berthois, Katzenellenbogen, & Katzenellenbogen, 1986; Wesierska-Gadek, Schreiner, Maurer, Waringer, & Ranftler, 2007)

เมื่อเซลล์ MCF-7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMEM มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 จึงทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี  $\text{E}_2$  ความเข้มข้น 10 nM และ EMG ความเข้มข้น 0.125 0.25 และ 0.5  $\mu\text{M}$  ซึ่งเป็น  $\text{IC}_{25}$   $\text{IC}_{50}$  และ  $\text{IC}_{75}$  ที่เวลา 7 วัน โดยมี positive control คือ 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) ความเข้มข้น 0.1 1 และ 10  $\mu\text{M}$  จากนั้นทำการวัดผลโดยใช้ thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ต่อหลุม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงใช้ DMSO ละลายผลึก formazan ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

เมื่อเซลล์ MCF-7 MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM จึงทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 96 well plates ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี EMG ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 และ 10  $\mu\text{M}$  เมื่อครบ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการวัดผลโดยวิธี MTT assay และคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสูตร ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่ม EMG} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มควบคุม}}$$

จากนั้นนำมาคำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA).

### การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time PCR)

วิเคราะห์ผลของ EMG ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนที่เป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน ได้แก่ *PS2* *Cyclin D1* *Cathepsin D* และ *PR* ในเซลล์ MCF-7

วิเคราะห์ผลของ EMG ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนที่ติดต่อยา tamoxifen ได้แก่ *CCND1* *NCoA3* และ *NCoR1* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ *MMP-9* และ *uPA* ด้วยวิธี real-time PCR

เมื่อเซลล์ MCF-7 มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 6 well plates ความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol reagent และวัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำ RNA ที่สกัดได้มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA ด้วยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และทำการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน ได้แก่ *PS2* *Cyclin D1* *Cathepsin D* และ *PR* ดังตารางที่ 5 ตรวจสอบผลของ EMG ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง real-time PCR โดยมียีน glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น normalized control คำนวณผลด้วยวิธี  $\Delta\Delta\text{CT}$  ( $\Delta\text{Ct A} - \Delta\text{Ct B}$ ) โดย StepOnePlus™ software

เมื่อเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 6 well plates ความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ใน MCF-7/LCC2 และ 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ใน MCF-7/LCC9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลของ EMG ต่อการแสดงออกของยีนโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดต่อยา tamoxifen ได้แก่ *NCoA3* *NCoR1* และ *CCND1* และ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลาม ได้แก่ *MMP-9* และ *uPA* ดังตารางที่ 5 และมียีน GAPDH เป็น

normalized control คำนวณผลโดย StepOnePlus™ software

**Primer ที่ใช้ในการศึกษา** ประกอบด้วย

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของยีนที่ใช้ในการศึกษา

Target genes	Primer sequences
<i>GAPDH</i>	Reverse: 5'-AGT GAT GGC ATG GAC TGT GG -3' Forward: 5'-GAG AAG GCT GGG GCT CAT TT-3'
<i>CYCLIN D1</i>	Reverse: 5'-TGC TTC AAG AAG CGC AGA GA -3' Forward: 5'-TTC GCT TTC TGA CCG AC-3'
<i>PS2</i>	Reverse: 5'-CTA AAA TTC ACA CTC CTC TTC TGG -3' Forward: 5'-ATG GCC ACC ATG GAG AAC AAG G -3'
<i>CATHEPSIN D</i>	Reverse: 5'-GGG ACA GCT TGT AGC CTT TGC -3' Forward: 5'-TAC ATG ATC CCC TGT GAG AAG GT -3'
<i>MMP-9</i>	Reverse: 5'-TCG ACT CTC CAC GCA TCT CT -3' Forward: 5'-ACA CCT CTG CCC TCA CCA T -3'
<i>NCoA3</i>	Reverse: 5'-ACT TGT GCA AAA TCC GGT GC -3' Forward: 5'-AGC CAT CAG TGA AGG TGT GG -3'
<i>NCoR1</i>	Reverse: 5'-TGC TGT CAT TCA CCT GGG TC -3' Forward: 5'-GAC AGC GAA GTT GAA GCT GT-3'
<i>uPA</i>	Reverse: 5'-AGT TAA GCC TTG AGC GAC CC-3' Forward: 5'-GAC TCC AAA GGC AGC AAT GA -3'
<i>PR</i>	Reverse: 5'-TGG AAA TTC AAC ACT CAG TGC C -3' Forward: 5'-CCA TGT GGC AGA TCC CAC AGG AGT T-3'

**การศึกษาผลของ EMG ต่อการเจริญแบบไร้การยึดเกาะโดยวิธี soft agar assay**

Soft agar assay for colony formation เป็นวิธีที่ใช้ในการประเมินการเจริญของเซลล์มะเร็งแบบไร้การยึดเกาะ (anchorage-independent growth) ในระดับหลอดทดลอง โดยเป้าหมายในการทดสอบวิธีนี้คือ ทดสอบผลของสาร EMG ต่อการก่อตัวเป็นก้อนของเซลล์มะเร็ง (tumorigenesis)

เตรียม bottom layer ใน 24-well ultralow attachment plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี FBS 5% ผสมกับ Noble agar 1.2% หลังจากนั้นเตรียม top layer โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับ agar 0.6% ใส่ลงไปบน bottom layer ที่เตรียมไว้ เมื่อวันเริ่ม



แข็งตัว เติบโตอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย EMG ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์คือ 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 ลงบนวุ้น เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อครบกำหนดถ่ายรูปรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4X (นับเฉพาะ colonies ที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 ไมครอน) วิเคราะห์ขนาดของ colonies โดยใช้โปรแกรม Axiovision 4 และใช้โปรแกรม Image J ในการหาพื้นที่ของ colonies ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{สูตร \% anti-tumorigenesis} = \frac{\text{จำนวน colonies ที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 ไมครอนในกลุ่ม EMG} \times 100}{\text{จำนวน colonies ที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 ไมครอนในกลุ่มควบคุม}}$$

$$\text{สูตร \% anti-tumorigenesis} = \frac{\text{พื้นที่ colonies ในกลุ่ม EMG} \times 100}{\text{พื้นที่ colonies ในกลุ่มควบคุม}}$$

#### การศึกษาผลของ EMG ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยวิธี scratch assay

เมื่อเซลล์ MCF-7/LCC2 มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 6 well plates ความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความหนาแน่นของเซลล์ประมาณร้อยละ 90 แบบ monolayer และใช้ pipette tip ขนาด 200  $\mu\text{l}$  ขูดบริเวณภายในหลุม เพื่อทำให้เกิดรอยเป็นเส้นตรงจำนวน 3 รอย แล้วล้างด้วย serum-free media 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี EMG ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  โดยให้เซลล์มะเร็งที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุมและวัดผลโดยการวัดความกว้างของรอยในภาพที่ถูกบันทึกหลังจากให้ EMG ที่เวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยกล้อง invert microscope ที่กำลังขยาย 200 เท่า และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Image J ดังนี้

$$\text{สูตร \% cell migration} = \frac{\text{พื้นที่ที่มีการขูดเซลล์ออก} \times 100}{\text{พื้นที่ที่มีการขูดเซลล์ทั้งหมด}}$$

#### การศึกษาผลของ EMG ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยวิธี matrigel invasion assay

Matrigel invasion assay เป็นวิธีศึกษาการลุกลามของเซลล์มะเร็ง เพื่อประเมินการแพร่กระจายของมะเร็งในหลอดทดลอง ซึ่งใช้ invasion chambers ที่เคลือบด้วย matrigel ทำหน้าที่เสมือน basement membrane ป้องกันเซลล์ที่มีลักษณะเป็น non-invasive ไม่ให้มีการลุกลามผ่าน membrane ได้ โดยเซลล์ที่มีความสามารถในการลุกลามจะสามารถหลั่งเอนไซม์ protease มาทำลาย matrigel และลุกลามผ่าน membrane pore ได้

เจือจาง matrigel ในสัดส่วน 1:30 ลงใน invasion chamber ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำ rehydration matrigel ด้วย serum free media ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ใน 24-well plate (lower

chamber) แล้วนำ invasion chamber วางบน 24-well plate และเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7/LCC2 หรือ MCF-7/LCC9 ที่มีความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (serum free MEM media) ใน upper chamber พร้อมทั้งเติม EMG ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 โดยให้เซลล์มะเร็งที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำส่วน supernatant ออก ล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer และ fix เซลล์ด้วย formaldehyde (3.7% in PBS buffer pH 7.4) นำ formaldehyde ออกแล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS จากนั้นทำการ permeabilization เซลล์ด้วย absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer อีกครั้ง ย้อมเซลล์ด้วย crystal violet 0.1% ปิดด้วยกระดาษ foil ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำ crystal violet 0.1% ออกและล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer อีกครั้ง แล้วใช้ cotton swab เช็ดเซลล์ที่ไม่มีการลุกลามออก ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ลุกลามไปยังด้านล่างของ upper chamber ด้วยกล้อง light microscope คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{สูตร \% cell invasion} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่าน matrigel ในกลุ่ม EMG} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่าน matrigel ในกลุ่มควบคุม}}$$

#### การศึกษาความเป็นพิษของ EMG ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ทำการ sub culture นับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงใน 96 well plates ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี EMG หรือยาเคมีบำบัด doxorubicin ความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดผลโดยใช้ thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ต่อหลุม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่า Selectivity index (Badisa et al., 2009) ในการทดสอบความเป็นพิษของ EMG เปรียบเทียบกับยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม คือ doxorubicin โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{Selectivity index} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 (EMG)}}{\text{IC}_{50} \text{ ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (EMG)}}$$

$$\text{Selectivity index} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 (DOX)}}{\text{IC}_{50} \text{ ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (DoX)}}$$

### การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  standard error of mean) ร่วมกับการประเมินผลโดยใช้สถิติ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Tukey post hoc test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA) โดยพิจารณาความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

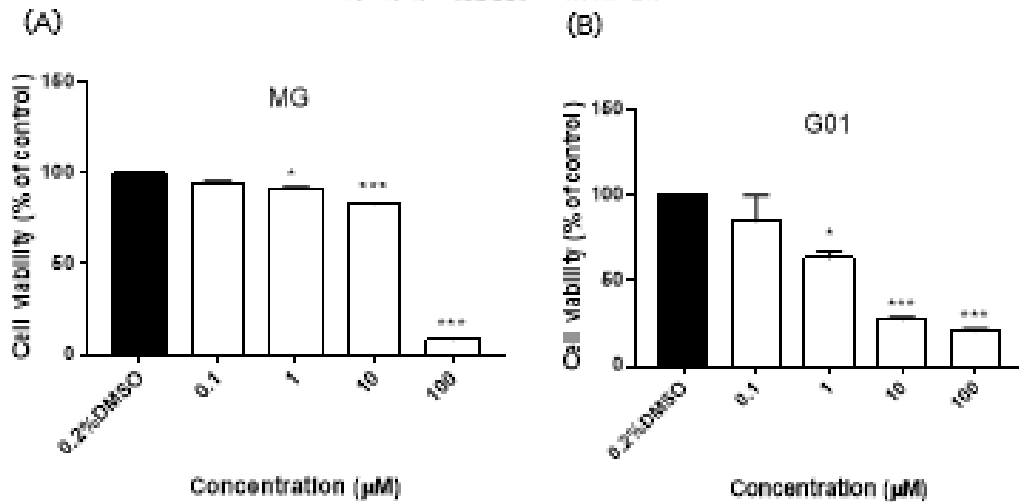


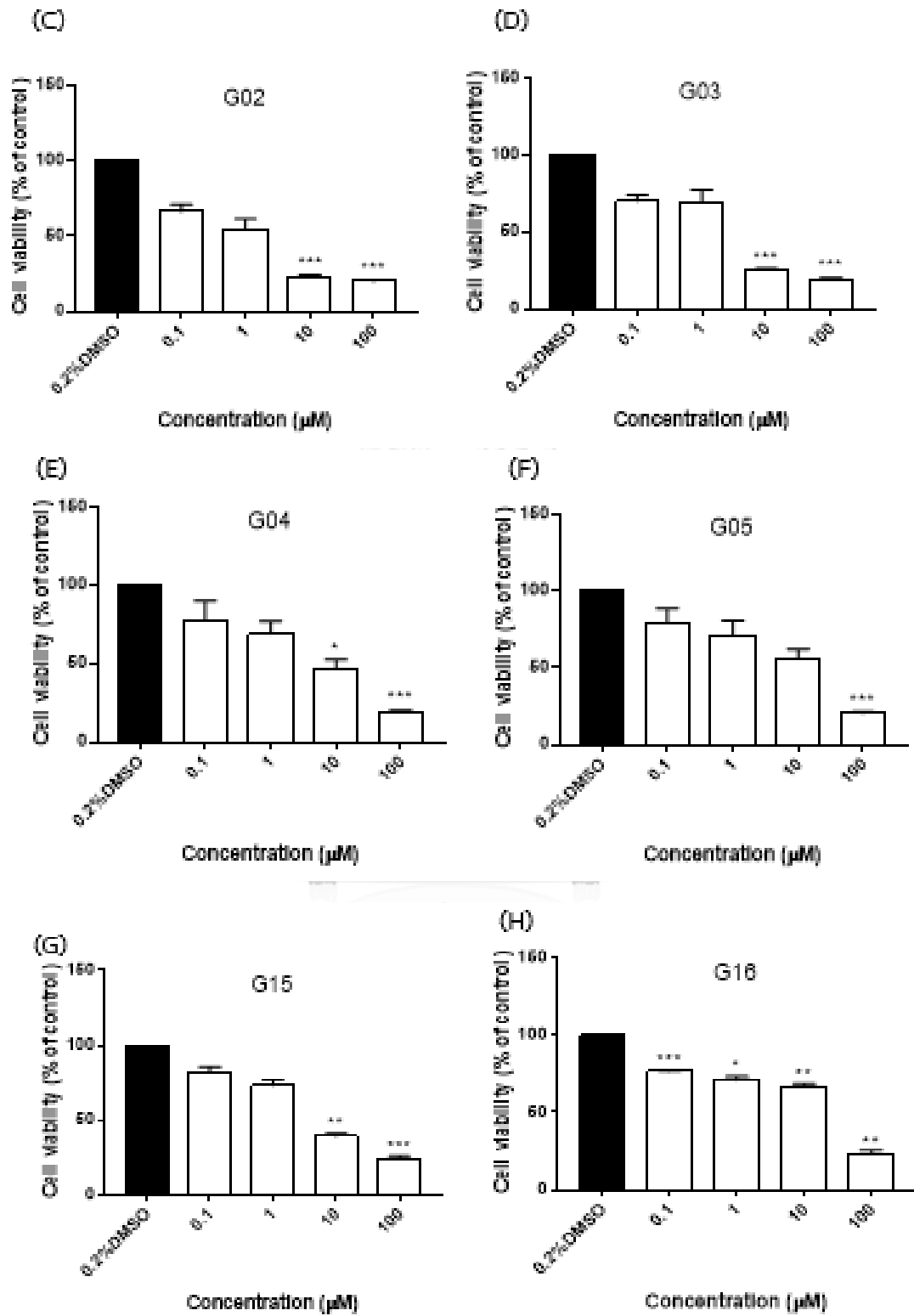
## บทที่ 4

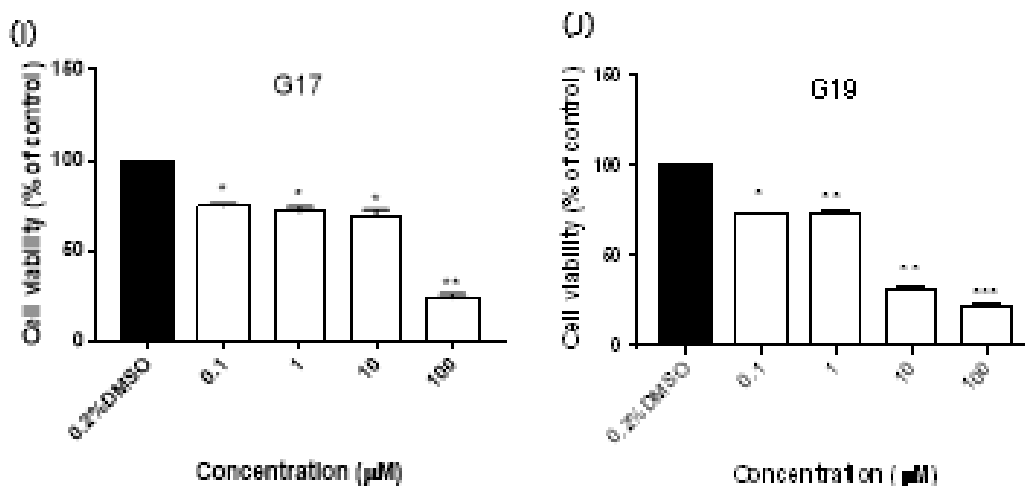
### ผลการทดลอง

การศึกษาผลของ mansonone G (MG) และอนุพันธ์ของ mansonone G ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT assay

ในการทดสอบสาร MG และอนุพันธ์ของ mansonone G ได้แก่ G01 G02 G03 G04 G05 G15 G16 G17 G19 ความเข้มข้น 0.1 1 10 และ 100  $\mu\text{M}$  ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อฮอร์โมน MCF-7/LCC2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าสารทดสอบทุกตัวมีฤทธิ์ลดการเจริญของเซลล์ MCF-7/LCC2 และเมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมร้อยละ 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) ได้ค่าดังนี้ MG มีค่าเท่ากับ 26.19  $\mu\text{M}$  G01 2.28  $\mu\text{M}$  G02 1.24  $\mu\text{M}$  G03 2.51  $\mu\text{M}$  G04 8.4  $\mu\text{M}$  G05 12.62  $\mu\text{M}$  G15 5.5  $\mu\text{M}$  G16 19.47  $\mu\text{M}$  G17 21.62  $\mu\text{M}$  และ G19 3.67  $\mu\text{M}$  ดังรูปที่ 9 (A-J) และตารางที่ 6 ซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า G02 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารทดสอบทั้งหมด จึงเลือกใช้ G02 หรือ EMG ในการศึกษาต่อไป







รูปที่ 9 MG และอนุพันธ์ของ MG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7/LCC2 กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อได้รับ 0.2% DMSO MG และอนุพันธ์ของ MG ความเข้มข้น 0.1 1 10 และ 100 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A-J) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$ )

ตารางที่ 6 แสดงค่า  $IC_{50}$  ของ MG และอนุพันธ์ของ MG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Compound (S)	$IC_{50}$ (μM)
Mansonone G (MG)	26.19
G01	2.28
G02 (EMG)	1.24
G03	2.51
G04	8.4
G05	12.62
G15	5.5
G16	19.47
G17	21.62
G19	3.67

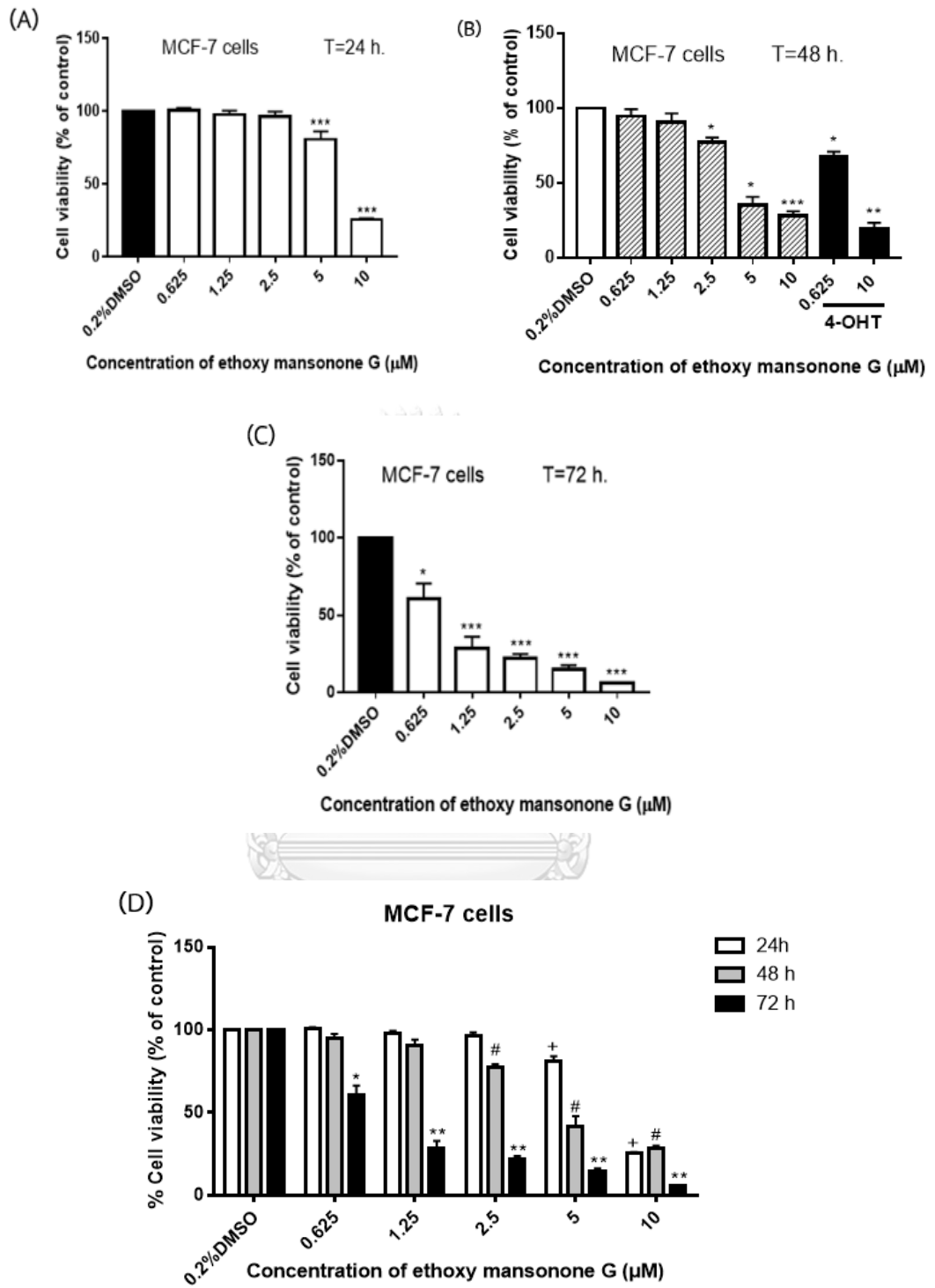
ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย

## การศึกษาผลของ EMG ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน

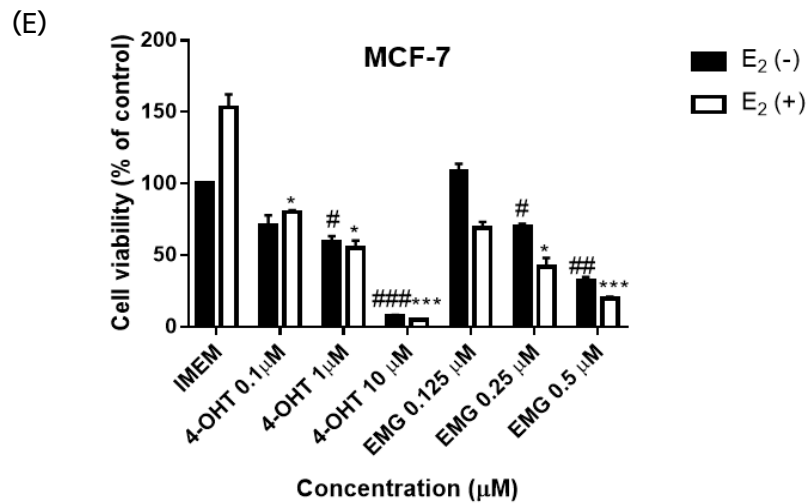
Mansonone G มีฤทธิ์ในการแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจน (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany et al., 2011) ทำให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนไม่สามารถจับกับตัวรับและเกิดกระบวนการ transcription ของยีนเป้าหมายได้ตามปกติ ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเจริญ (B. Huang et al., 2015; Osborne et al., 2001) ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของ EMG ซึ่งเป็นสารกึ่งสังเคราะห์จาก mansonone G ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ได้แก่ เซลล์ MCF-7 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ เซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 โดยวิธี MTT assay

ในการทดสอบให้ EMG ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 และ 10  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า EMG มีฤทธิ์ลดการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของ EMG ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมร้อยละ 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) ในเซลล์ MCF-7 มีค่าเท่ากับ 10.58 5.37 และ 0.72  $\mu\text{M}$  ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ **ผังรูปที่ 10** และในเซลล์ MCF-7/LCC2 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 4.5 3.35 และ 0.75  $\mu\text{M}$  ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ **ผังรูปที่ 11** และในเซลล์ MCF-7/LCC9 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 5.5 1.92 และ 1.71  $\mu\text{M}$  ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ **ผังรูปที่ 12** จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สาร (dose and time dependent manner) **ผังตารางที่ 7**

ในการทดสอบฤทธิ์ของ EMG เพื่อยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Estradiol ( $\text{E}_2$ ) ใช้ค่าความเข้มข้นของ EMG ที่คำนวณจากระยะเวลาในการให้ 7 วันเท่ากับระยะเวลาในการให้ 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (Ma et al., 2015) ซึ่งจากการทดสอบได้ค่า  $\text{IC}_{50}$  ของ EMG คือ 0.26  $\mu\text{M}$  ดังนั้นจึงเลือกใช้ EMG ที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 และ 0.5  $\mu\text{M}$  ในการศึกษาครั้งนี้ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้  $\text{E}_2$  เซลล์ MCF-7 สามารถเจริญเพิ่มขึ้น 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ เซลล์ที่เลี้ยงใน IMEM และไม่ได้รับสารทดสอบใด ๆ และในเซลล์ที่ได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5  $\mu\text{M}$  สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 ลงได้ประมาณ 0.3 และ 0.68 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม IMEM และในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย  $\text{E}_2$  เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5  $\mu\text{M}$  สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 ลงได้ประมาณ 0.58 และ 0.8 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ  $\text{E}_2$  ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม **รูปที่ 10(E)**

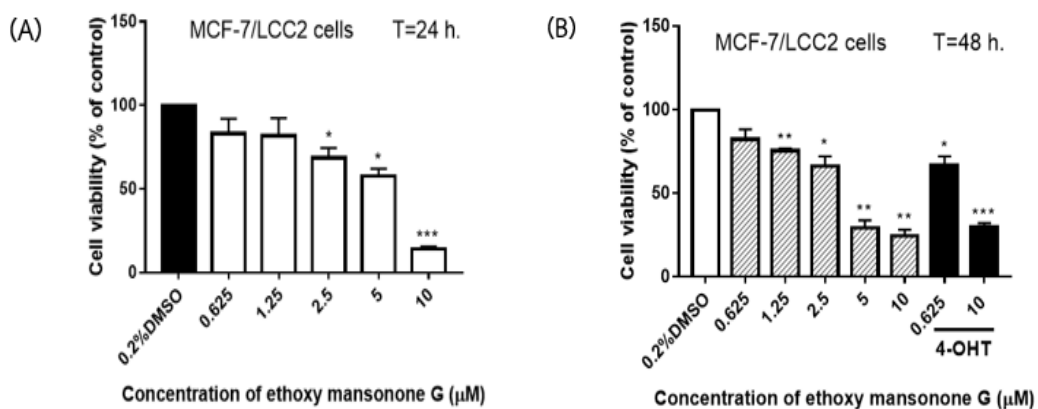


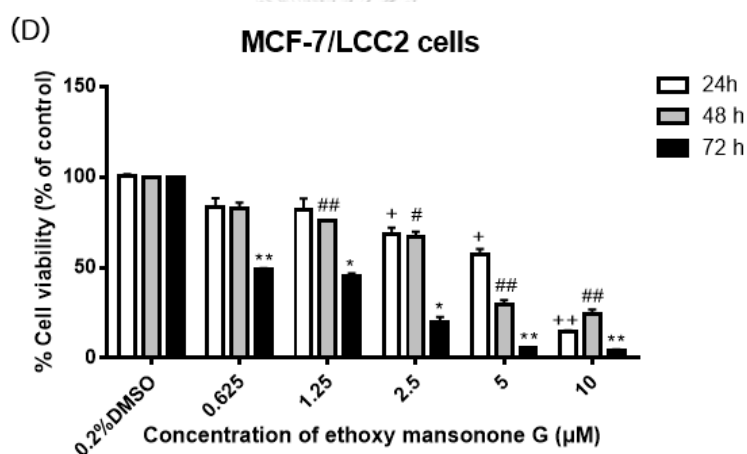
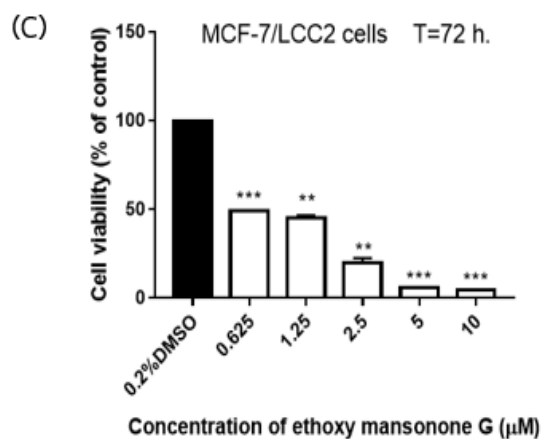




### รูปที่ 10 EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7

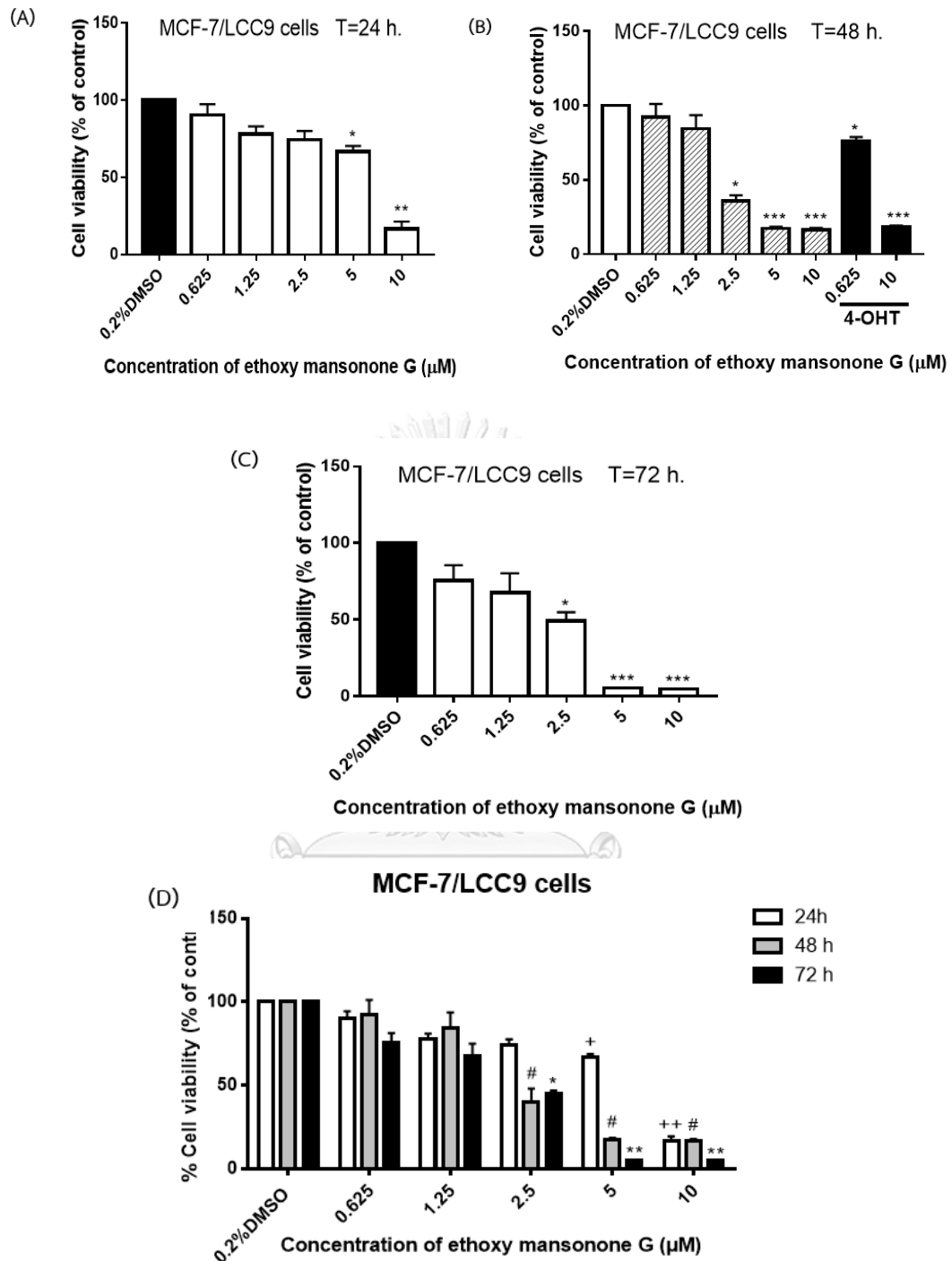
กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 และ 10  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 (A) 48 (B) และ 72 (C) ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $*p < 0.05$   $**p < 0.01$  และ  $***p < 0.001$ ) และกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (D) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $*p < 0.01$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง) ( $#p < 0.01$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง) และ ( $*p < 0.01$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง) และ ( $**p < 0.001$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง) และกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ EMG ที่เวลา 7 วัน (E) เปรียบเทียบกับ IMEM ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ( $#p < 0.05$   $##p < 0.01$  และ  $###p < 0.001$ ) และในกลุ่มที่ได้รับ EMG ในสภาวะที่มี E<sub>2</sub> เปรียบเทียบเซลล์ที่ได้รับ E<sub>2</sub> ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ( $*p < 0.05$  และ  $***p < 0.001$ ) ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน





รูปที่ 11 EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7/LCC2

กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 และ 10 μM เป็นเวลา 24 (A) 48 (B) และ 72 (C) ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$ ) และกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (D) ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง) (+ $p < 0.01$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง) (# $p < 0.01$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง) (\*\* $p < 0.01$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง) และ (++) $p < 0.001$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง) (## $p < 0.001$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง) (\*\*\*) $p < 0.001$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง)



รูปที่ 12 EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 และ 10  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 (A) 48 (B) และ 72 (C) ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  และ \*\*\* $p < 0.001$ ) และกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (D) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูป

ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $^*p < 0.01$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง  $^{\#}p < 0.01$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง  $^*p < 0.01$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง) และ ( $^{++}p < 0.001$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง  $^{**}p < 0.001$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง)

**ตารางที่ 7** แสดงค่า  $IC_{50}$  ของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ เซลล์ MCF-7/LCC2 และเซลล์ MCF-7/LCC9 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

Cells type	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )		
	24 (h)	48 (h)	72 (h)
MCF-7	10.58 $\pm$ 0.70	5.37 $\pm$ 0.16	0.72 $\pm$ 0.06
MCF-7/LCC2	4.5 $\pm$ 0.54	3.35 $\pm$ 0.18	0.75 $\pm$ 0.03
MCF-7/LCC9	5.5 $\pm$ 0.44	1.92 $\pm$ 0.01	1.71 $\pm$ 0.26

ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

## การศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับ เอสโตรเจน (ER-targeted genes) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน

เนื่องจากการศึกษาพบว่า mansonone G สามารถแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจนและยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ ซึ่งส่งผลต่อการ transcription ของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน เช่น *PS2* *PR* *CTSD* และ *CCND1* เป็นต้น (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany et al., 2013) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่ศึกษาฤทธิ์ของ EMG ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ mansonone G ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของ *CCND1* เป็น 0.85 0.65 และ 0.22 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ IMEM ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *CCND1* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และเมื่อกระตุ้นด้วย  $E_2$  พบว่า EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของ *CCND1* เป็น 0.66 0.48 และ 0.28 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ  $E_2$  ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมและลดการแสดงออกของยีน *CCND1* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ดังรูป 13(A)

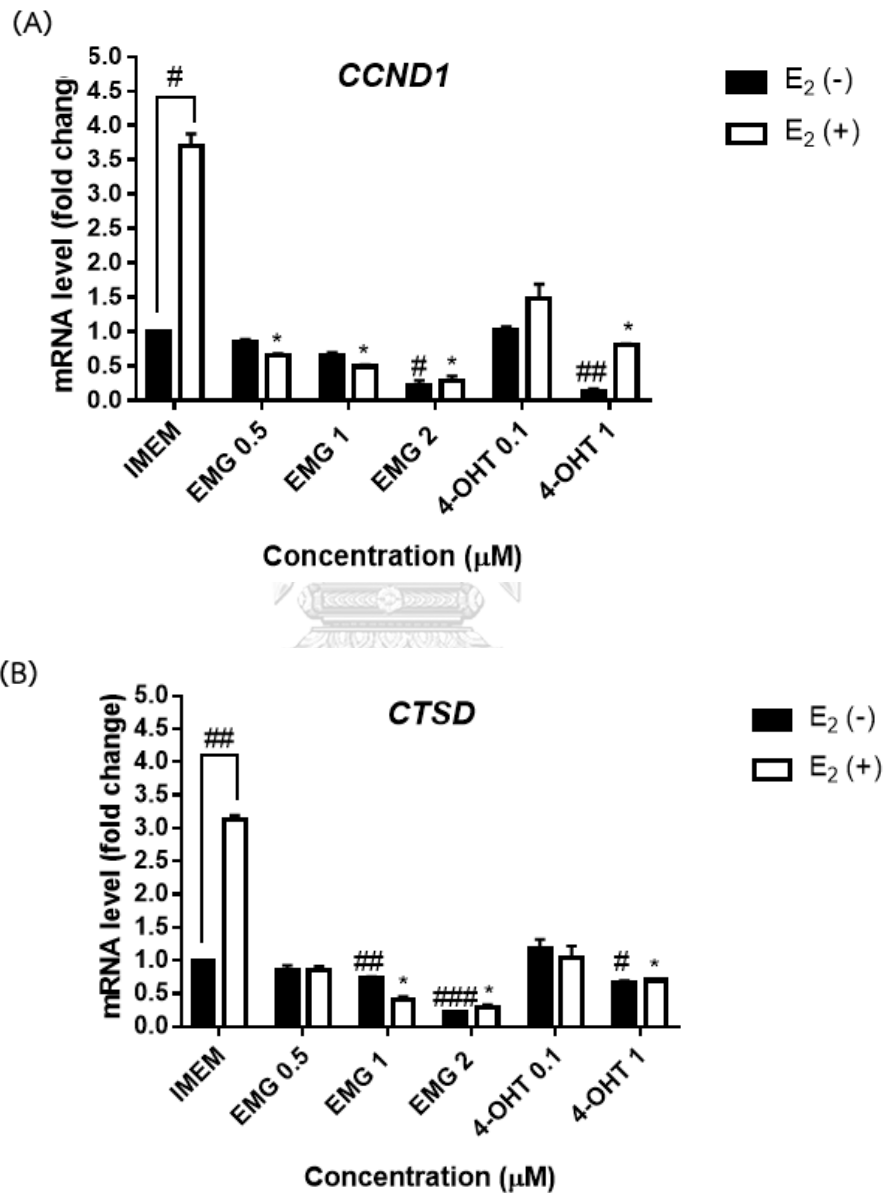
ผลการศึกษายีน *CTSD* พบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีนเป็น 0.85 0.74 และ 0.22 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ IMEM ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *CTSD* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  และเมื่อกระตุ้นด้วย  $E_2$  พบว่า EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของ *CTSD* เป็น 0.85 0.4 และ 0.29 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ  $E_2$  ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมและ EMG ความเข้มข้น 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *CTSD* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$   $p < 0.01$  และ  $p < 0.001$  ดังรูป 13(B)

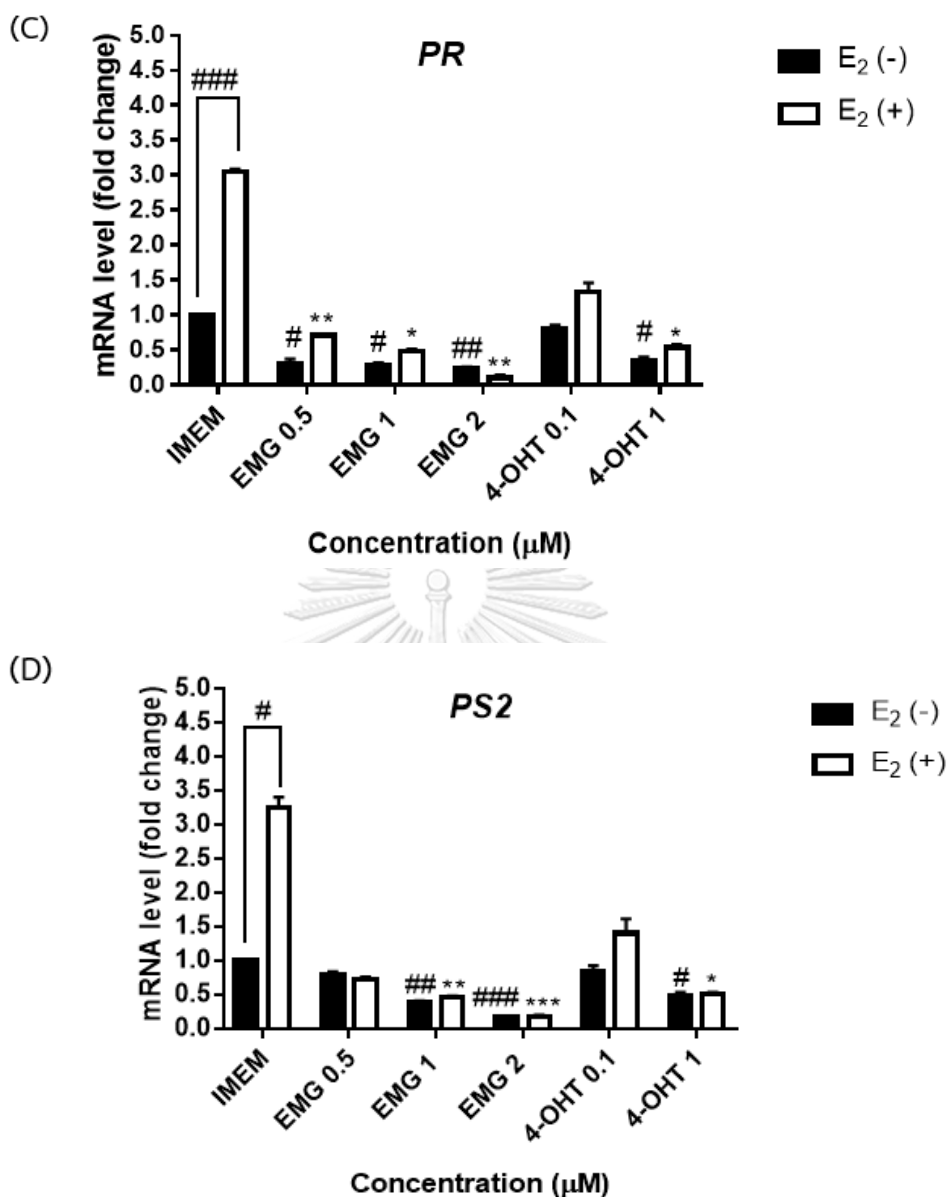
ในการศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *PS2* พบว่า EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของ *PS2* เป็น 0.79 0.39 และ 0.18 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ IMEM ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *PS2* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  และเมื่อกระตุ้นด้วย  $E_2$  พบว่า EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *PS2* เป็น 0.72 0.47 และ 0.18 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ  $E_2$  ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมและ EMG ความเข้มข้น 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *PS2* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$   $p < 0.01$  และ  $p < 0.001$  ดังรูป 13(D)

ผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *PR* พบว่า EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของ *PR* เป็น 0.3 0.27 และ 0.23 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ IMEM ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *PR* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  และเมื่อกระตุ้นด้วย  $E_2$  พบว่า EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของ *PR* เป็น 0.71 0.48 และ 0.1 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ  $E_2$  ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมและ EMG ความเข้มข้น 0.5

1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *PR* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$   $p < 0.01$  และ  $p < 0.001$  ดังรูป 13(C)

สรุปได้ว่า EMG สามารถลดการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจนในระดับ mRNA ได้แก่ *CCND1* *CTSD* *PS2* และ *PR* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย  $E_2$





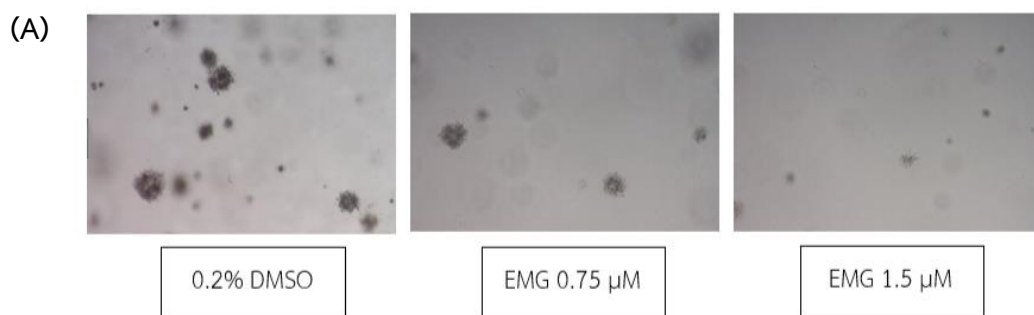
รูปที่ 13 EMG ลดการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน (ER-targeted genes)

ได้แก่ *CCND1*, *CTSD*, *PS2* และ *PR* ในเซลล์ MCF-7

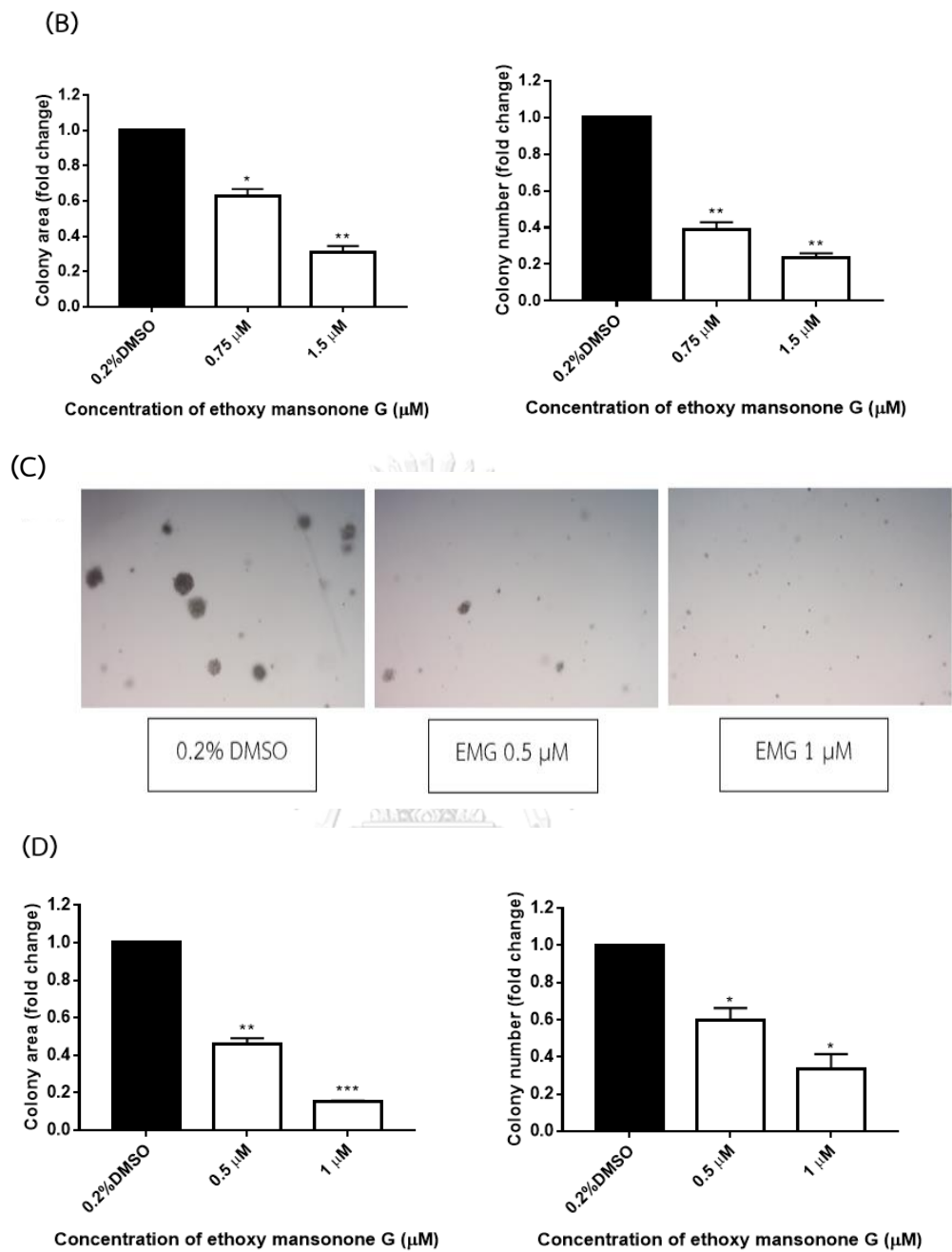
การแสดงออกของ *CCND1* (A), *CTSD* (B), *PR* (C), *PS2* (D) ในเซลล์ MCF-7 หลังได้รับและไม่ได้  
รับ E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10 nM และ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง  
เปรียบเทียบกับ IMEM ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อน  
มาตรฐาน ( $^{\#}p < 0.05$   $^{\#\#}p < 0.01$  และ  $^{\#\#\#}p < 0.001$ ) และในกลุ่มที่ได้รับ EMG ในสภาวะที่มี E<sub>2</sub>  
เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ E<sub>2</sub> เป็นกลุ่มควบคุม ( $^*p < 0.05$   $^{**}p < 0.01$  และ  $^{***}p < 0.001$ ) โดยมี  
GAPDH เป็น internal control และทำการทดลอง 3 ครั้ง

**การศึกษาผลของ EMG ต่อการยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะ (Anchorage-independent growth) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดต่อด้านฮอริโมนด้วยวิธี Soft agar assay**

เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการเจริญและแบ่งตัวแบบไร้การยึดเกาะ ถือเป็นลักษณะที่สำคัญของการก่อก้อนมะเร็ง ซึ่งสามารถพบคุณลักษณะนี้ใน cell line ที่เพาะเลี้ยงใน soft agar (Bhummaphan & Chanvorachote, 2015) งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบฤทธิ์ของ EMG ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อด้านฮอริโมนทั้งสองชนิดด้วยความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลัง soft agar แข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษาพบว่า EMG สามารถลดขนาดและจำนวนของ colony ได้ในเซลล์ทั้งสองชนิด โดยเมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 สามารถลดขนาดของ colony ได้ถึงร้อยละ 40 และร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ 0.01 ตามลำดับและ EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  สามารถลดจำนวนของ colony ได้ถึงร้อยละ 60 และร้อยละ 80 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  ตามลำดับดังรูปที่ 14(A) และ 14(B) เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 พบว่าสามารถลดขนาดของ colony ได้ถึงร้อยละ 60 และร้อยละ 80 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  และ 0.001 ตามลำดับและ EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  สามารถลดจำนวนของ colony ได้ถึงร้อยละ 40 และร้อยละ 60 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมดังรูปที่ 14(C) และ 14(D) แสดงให้เห็นว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อด้านฮอริโมน ดังรูปที่ 14







รูปที่ 14 EMG ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4X หลังได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 14(A) และให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 14(C) เป็นเวลา 21 วัน กราฟแสดงอัตราส่วนของขนาดและจำนวนของ colony ในเซลล์ MCF-7/LCC2 14(B) และเซลล์ MCF-7/LCC9 14(D) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$ )

## การศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen (tamoxifen-resistant genes) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน

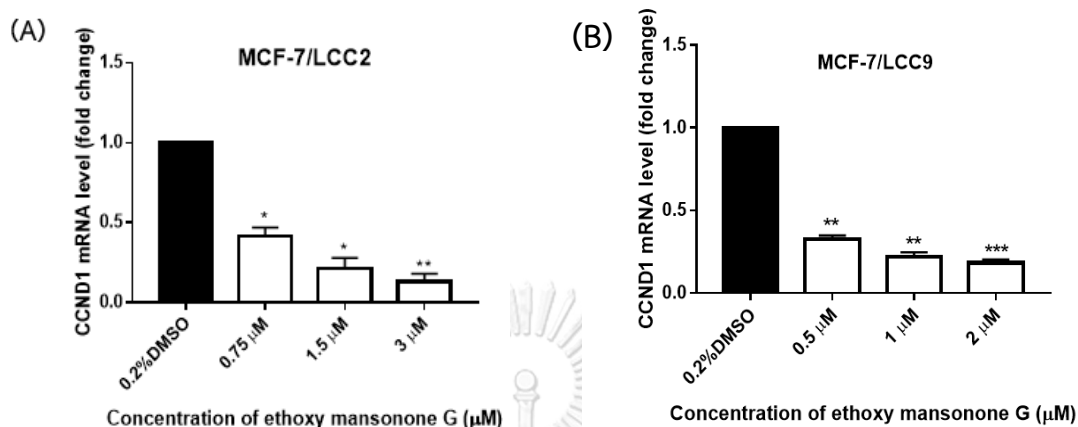
การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฤทธิ์ของสารในกลุ่ม mansonone มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Tiew et al., 2003; Wu et al., 2011) และจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า EMG สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนได้ทั้งเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ดังนั้นเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ EMG ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการดื้อยาในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนทั้งสองชนิด จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ได้แก่ *Cyclin D1 (CCND1)* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ *NCoA3* และ *NCoR1*

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ได้แก่ *CCND1* พบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *CCND1* ในเซลล์ MCF-7/LCC2 เป็น 0.42 0.22 และ 0.22 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *CCND1* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ EMG ความเข้มข้น 3  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.01$  **รูปที่ 15(A)** และ เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 การแสดงออกของยีน *CCND1* ลดลงเป็น 0.33 0.22 และ 0.18 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *CCND1* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  และ EMG ความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.001$  **รูปที่ 15(B)**

การศึกษาผลของ EMG ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ *NCoR1* ซึ่งทำหน้าที่เป็น ER-corepressor จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 พบว่าการแสดงออกของยีน *NCoR1* มีการเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 1.31 1.24 และ 1.15 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม **รูปที่ 16(A)** และ เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 การแสดงออกของยีน *NCoR1* มีการลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 0.82 1 และ 0.79 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม **รูปที่ 16(B)** โดย EMG ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *NCoR1* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ เซลล์ MCF-7/LCC9

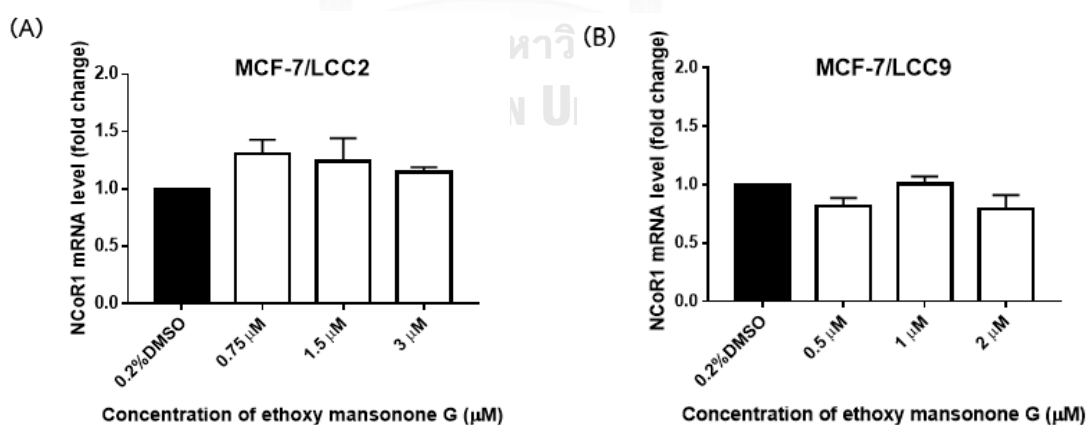
นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ศึกษาผลของ EMG ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *NCoA3* ซึ่งเป็นยีนที่มีการเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน (Sakunrangsit et al., 2016) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 พบว่าการแสดงออกของยีน *NCoA3* ลดลงเป็น 0.4 0.26 และ 0.21 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  มีผลให้การแสดงออกของยีน *NCoA3* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ EMG ความเข้มข้น 3  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.01$  **รูปที่ 17(A)** และเมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 สามารถลดการแสดงออกของยีน *NCoA3* เป็น 0.37 0.29 และ 0.30 เท่า

ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 1  $\mu\text{M}$  มีผลให้การแสดงออกของยีน *NCoA3* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และ EMG ความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.01$  รูปที่ 17(B)



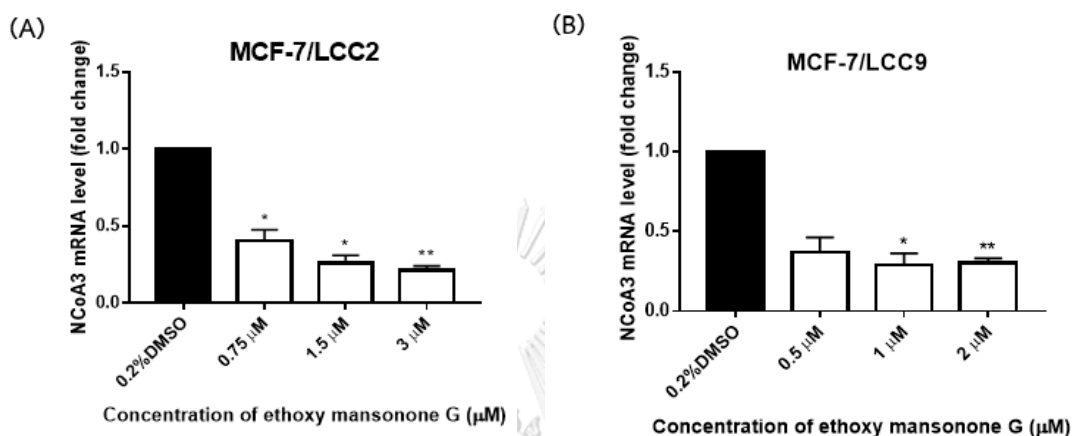
รูปที่ 15 EMG สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *CCND1* ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

การแสดงออกของ *CCND1* ในเซลล์ MCF-7/LCC2 หลังได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี GAPDH เป็น internal control และทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$ )



รูปที่ 16 EMG ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ *NCoR1* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อ ยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

การแสดงออกของยีน *NCoR1* หลังได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์ MCF-7/LCC2 (A) และในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี GAPDH เป็น internal control และทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



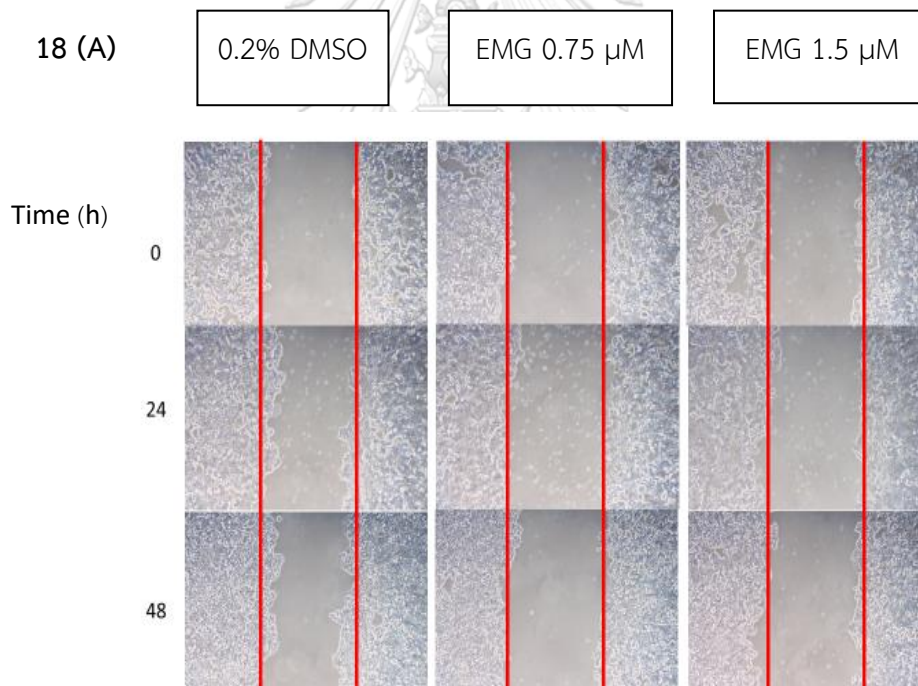
รูปที่ 17 EMG สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *NCoA3* ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

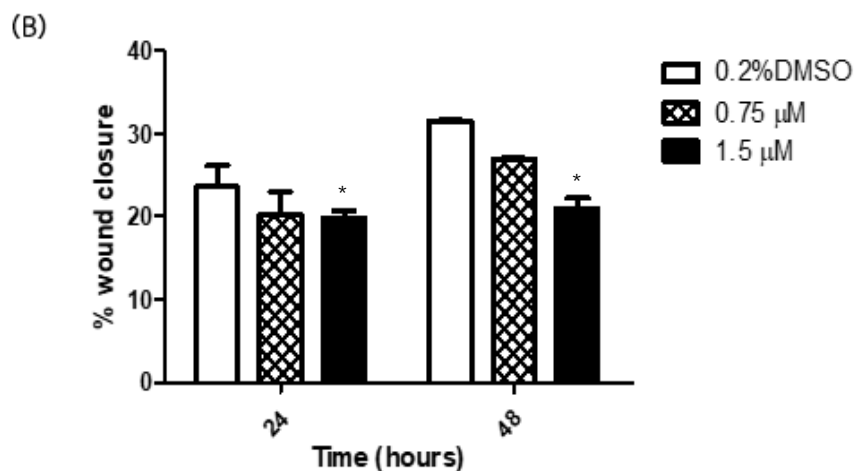
ผลของ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *NCoA3* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์ MCF-7/LCC2 (A) และ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม มี GAPDH เป็น internal control และทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  และ \*\* $p < 0.01$ )

## การศึกษาผลของ EMG ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน โดยวิธี scratch assay

เซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนมีความสามารถในการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้สูง (Brunner et al., 1997; Zwart et al., 2015) จึงนำมาสู่การศึกษาฤทธิ์ของ EMG ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 ด้วยวิธี scratch assay โดยให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  ซึ่งเป็นค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมงและเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีการบันทึกภาพการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 18

จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็ง MCF-7/LCC2 สามารถเคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่ถูกขูดไว้ด้วยปลายปิเปตต์มากขึ้นในกลุ่มควบคุม 0.2% DMSO และเมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 1.5  $\mu\text{M}$  พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมมีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  โดยลดลงร้อยละ 45 ในเวลา 24 ชั่วโมงและร้อยละ 41 ในเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 18(B)





รูปที่ 18 EMG ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2  
 รูปแสดงความกว้างของรอยขีดบริเวณกันجانเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับ 0.2% DMSO และ EMG ความ  
 เข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu$ M เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยบันทึกภาพหลังขีดทันทีและที่เวลา 24  
 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (A) กราฟแสดงร้อยละการปิดของรอยขีดเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ  
 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (B) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่า  
 ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.01$ )

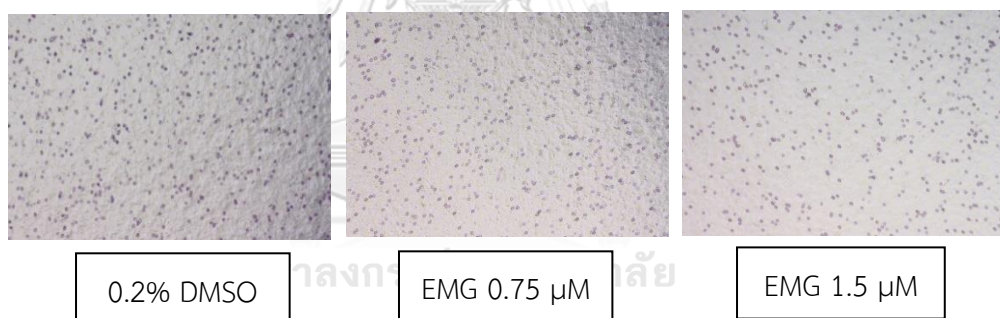
## การศึกษาผลของ EMG ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนโดยวิธี matrigel invasion

จากผลการทดลองด้วยวิธี scratch assay พบว่า EMG สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน แต่ผลที่พบอาจเป็นผลจาก EMG สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง จึงต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลของ EMG ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนโดยวิธี matrigel invasion ซึ่งใช้ matrigel เพื่อให้เกิดสภาวะที่คล้ายกับ ECM

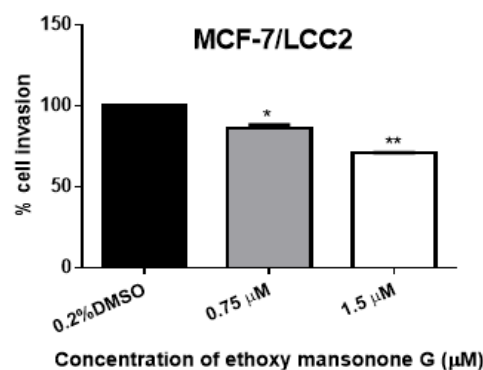
ผลการศึกษาพบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75  $\mu\text{M}$  เซลล์ MCF-7/LCC2 มีการลุกลามผ่าน matrigel ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  โดยลดลงร้อยละ 14 และ EMG ความเข้มข้น 1.5  $\mu\text{M}$  สามารถลดการลุกลามผ่าน matrigel อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.001$  โดยลดลงร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 พบว่าความเข้มข้น 1  $\mu\text{M}$  สามารถลดการลุกลามลงร้อยละ 31 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า EMG มีความสามารถในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนได้ รูปที่ 19

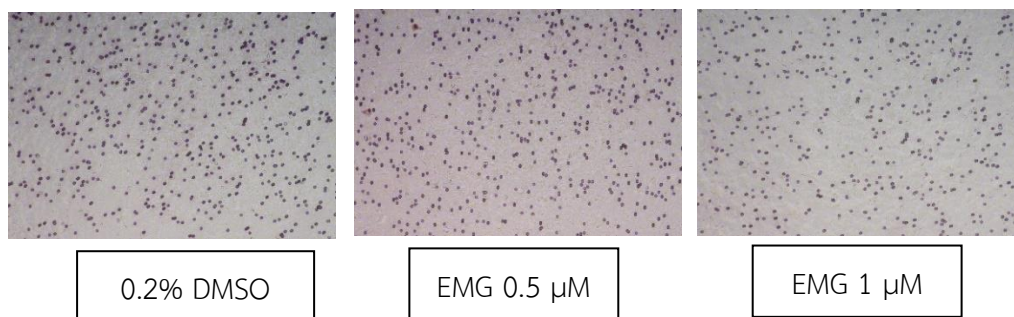
19 (A)



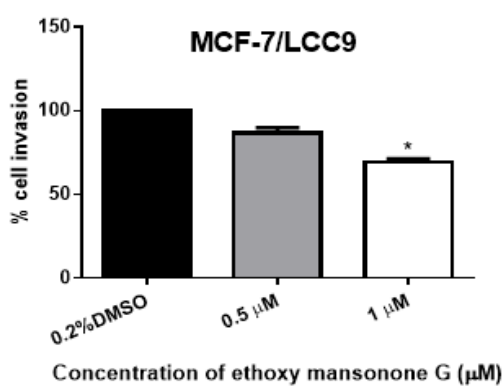
(B)



(C)



(D)



**รูปที่ 19** EMG ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

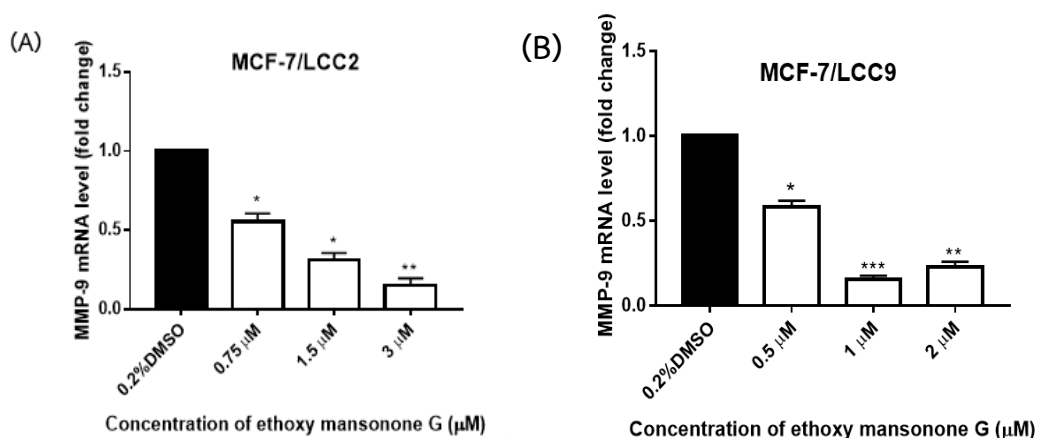
กราฟแสดงร้อยละการลุกลามของเซลล์ MCF-7/LCC2 เมื่อได้รับ 0.2% DMSO และ EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu$ M (A) และ (B) และในเซลล์ MCF-7/LCC9 ที่ได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu$ M (C) และ (D) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าร้อยละการลุกลามของเซลล์จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  และ \*\* $p < 0.001$ )



## การศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย และลูกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน

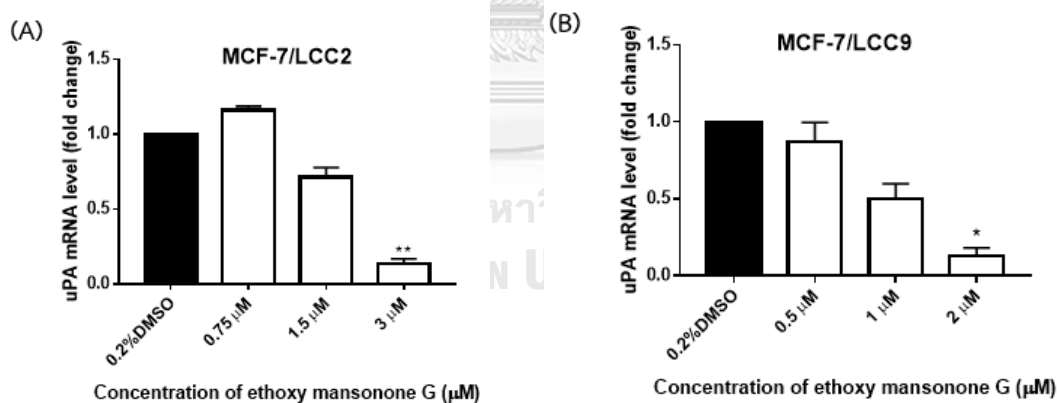
เมื่อให้ EMG ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์พบว่า สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และลูกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนได้ จึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ EMG ต่อการแพร่กระจายและลูกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน โดยทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *MMP-9* และ *uPA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลูกลามของเซลล์มะเร็งเต้านม **รูปที่ 20, 21** ผลการศึกษาพบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 สามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP-9* เป็น 0.55 0.31 และ 0.15 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5  $\mu\text{M}$  มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *MMP-9* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และความเข้มข้น 3  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.01$  **รูปที่ 20(A)** และในเซลล์ MCF-7/LCC9 เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP-9* เป็น 0.58 0.15 และ 0.23 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{M}$  มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *MMP-9* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และความเข้มข้น 1  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.001$  และความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  ที่  $p < 0.01$  **รูปที่ 20(B)**

จากการศึกษาผลของ EMG ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *uPA* พบว่า เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC2 สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป็น 1.16 0.71 และ 0.22 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 3  $\mu\text{M}$  มีผลลดการแสดงออกของยีน *uPA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  **รูปที่ 21(A)** และในเซลล์ MCF-7/LCC9 เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  สามารถลดการแสดงออกของยีนเป็น 0.87 0.5 และ 0.17 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดย EMG ความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  มีผลให้การแสดงออกของยีน *uPA* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  **รูปที่ 21(B)**



รูปที่ 20 EMG สามารถลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *MMP-9* ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

ผลของ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *MMP-9* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์ MCF-7/LCC2 (A) และ EMG ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี GAPDH เป็น internal control และทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$ )



รูปที่ 21 EMG เปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *uPA* ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

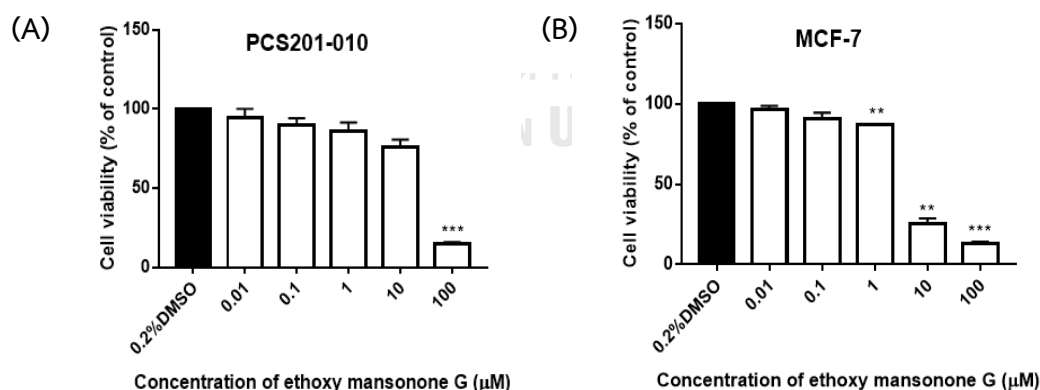
ผลของ EMG ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3  $\mu\text{M}$  ต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *uPA* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์ MCF-7/LCC2 (A) และ EMG ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2  $\mu\text{M}$  ในเซลล์ MCF-7/LCC9 (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมี GAPDH เป็น internal control และทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  และ \*\* $p < 0.01$ )

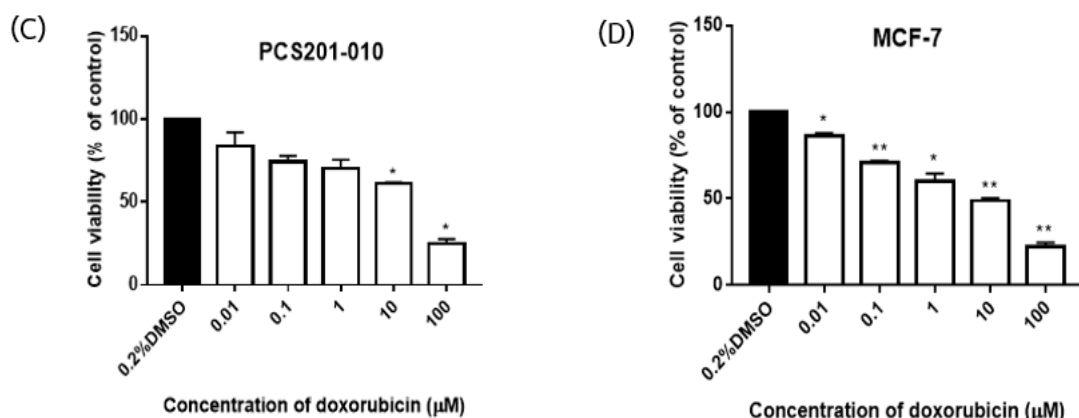
## การศึกษาความเป็นพิษของ EMG ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010

เนื่องจาก EMG เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ตัวใหม่ จึงยังไม่มีรายงานหรือการศึกษาเรื่องความปลอดภัยของสารตัวนี้ในเซลล์หรือสัตว์ทดลอง จึงได้นำ EMG มาทดสอบในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของทารกแรกเกิด เพื่อหาดัชนีความจำเพาะในการเกิดพิษ selectivity index (SI) ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 หลังจากนั้นจึงนำค่า SI ที่ได้ไปเทียบกับยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม เพื่อพิจารณาเปรียบเทียบความเป็นพิษ

เมื่อให้ EMG ความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า EMG มีฤทธิ์ลดการเจริญของเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ประมาณ 5  $\mu\text{M}$  ดังรูป 22(B) และในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 23.88  $\mu\text{M}$  ดังรูป 22(A) และคำนวณหา SI จากค่า  $\text{IC}_{50}$  ของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 ได้เท่ากับ 5.78

เมื่อให้ยา Doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100  $\mu\text{M}$  ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า DOX มีฤทธิ์ลดการเจริญของเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 6.13  $\mu\text{M}$  ดังรูป 22(D) และในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 13.95  $\mu\text{M}$  ดังรูป 22(C) เมื่อคำนวณหา SI ได้ค่าเท่ากับ 2.27 เพื่อพิจารณาความเป็นพิษของ EMG จึงนำค่า SI ของ EMG ไปเปรียบเทียบกับค่า SI ของ DOX ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่า EMG มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 มากกว่า DOX และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 น้อยกว่า DOX รูปที่ 22





รูปที่ 22 EMG มีความเป็นพิษน้อยกว่า DOX ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อได้รับ EMG ความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 (A) เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (B) และกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ DOX ที่ความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100 μM ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ PCS201-010 (C) เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (D) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$ ) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้ 0.2% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

#### อภิปรายผลการทดลอง

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดในผู้หญิงและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตลำดับที่สองรองจากมะเร็งปอด (Siegel Rebecca et al., 2018) มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนเป็นชนิดที่พบประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด (Girault et al., 2003; B. Huang et al., 2015) โดยมะเร็งเต้านมชนิดนี้อาศัยฮอร์โมนเอสโตรเจนในการเจริญเติบโต (Anbalagan & Rowan, 2015; B. Huang et al., 2015; Musgrove & Sutherland, 2009) แพทย์จึงสามารถใช้ยาต้านฮอร์โมนในการรักษาได้ tamoxifen (TAM) เป็นยาในกลุ่ม selective estrogen receptor modulators (SERMs) มีฤทธิ์ต้านฮอร์โมนเอสโตรเจนในเนื้อเยื่อเต้านม จึงเป็นยาที่ให้หลังการผ่าตัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน แต่ในปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลามมีปัญหาการดื้อยา tamoxifen มากถึงร้อยละ 40 (Musgrove & Sutherland, 2009; Ring & Dowsett, 2004; Viedma-Rodriguez et al., 2014) ส่งผลให้มีการกลับเป็นซ้ำและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนายาตัวใหม่สำหรับผู้ป่วยกลุ่มที่มีการดื้อยา ทั้งนี้ยาที่ถูกพัฒนาขึ้นควรมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติหรือเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์น้อยที่สุด

สารสกัดของต้นจันทน์หอมสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด HTB 123 (triple negative breast cancer; TNBC) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ (Tiew et al., 2003) และการศึกษาเกี่ยวกับสารสำคัญในสารสกัดจากแก่นของต้นจันทน์หอม พบว่า mansonone G เป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดในกลุ่ม mansonone โดย mansonone G สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนและต้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany et al., 2011; El-Halawany et al., 2013) ต่อมา มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ตัวใหม่เป็น ethoxy mansonone G (EMG) ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า EMG มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Hairani et al., 2016) และฤทธิ์ต้านการสะสมไขมัน (Kim et al., 2017) แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการทดสอบฤทธิ์ของ EMG ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน โดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ การลุกลาม การยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะและความเป็นพิษในเซลล์ปกติ

ผลการศึกษาพบว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน ได้แก่ MCF-7 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 โดยมีค่า IC50 ในระดับไมโครโมลาร์ ( $\mu\text{M}$ ) ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้ EMG มีผลลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมทุกชนิดลง (dose and time dependent manner) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของสารสกัดจากต้นจันทน์หอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด TNBC (Tiew et al., 2003) และ

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า mansonone G มีคุณสมบัติในการต้านการทำงานของฮอร์โมน เอสโตรเจน (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany et al., 2013; H. Huang et al., 2018) จึงนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ของ EMG ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol (E<sub>2</sub>) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกกระตุ้นการเจริญด้วย E<sub>2</sub> ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ EMG ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนที่ถูกกระตุ้นการเจริญด้วย E<sub>2</sub> ผ่านการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนที่เป็นเป้าหมายตัวรับเอสโตรเจน (ER-targeted genes) ประกอบด้วย *PS2 PR CCND1* และ *CTSD* ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญ แบ่งตัวและแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งเต้านม (Bach et al., 2015; Clarke et al., 1987; Hopp et al., 2004; Stack et al., 1988) พบว่า สาร E<sub>2</sub> มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน *PS2 PR CCND1* และ *CTSD* ในเซลล์ MCF-7 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกกระตุ้นการเจริญด้วย E<sub>2</sub> พบว่าสาร EMG สามารถลดการแสดงออกของทุกยีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Lim และคณะว่า gercmacrone สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 ผ่านการเปลี่ยนแปลงของ ER-targeted genes ในระดับ mRNA (Lim, Choung, & Jeong, 2016) แสดงให้เห็นว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 โดยการลดยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลามที่ต้องอาศัยฮอร์โมนเป็นจำนวนมาก (Musgrove & Sutherland, 2009; Ring & Dowsett, 2004; Viedma-Rodriguez et al., 2014) และจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต้องอาศัยฮอร์โมนได้ คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต้องอาศัยฮอร์โมนผ่านการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านม คือ ยีน *CCND1* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (Abukhdeir & Park, 2008; Musgrove et al., 2011; O'Leary et al., 2016) และพบว่าในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต้องอาศัยฮอร์โมนมีการแสดงออกของ *CCND1* ในระดับ mRNA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ไม่มีการดื้อยา (Abukhdeir & Park, 2008) และในการศึกษานี้พบว่า เมื่อให้ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต้องอาศัยฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ส่งผลลดการแสดงออกของ *CCND1* ลงในระดับ mRNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจาก *CCND1* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านฮอร์โมนแล้ว มีการศึกษาพบว่า *NCoA3* ซึ่งทำหน้าที่เป็น ER co-activator มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต้องอาศัยฮอร์โมน (Sakunrangsit et al., 2016) และจากการศึกษาทางคลินิกพบว่า ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ *NCoA3* สูงมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกที่น้อยกว่าหรือไม่มีการแสดงออกเลย (Burandt et al., 2013) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า EMG สามารถลดการแสดงออกของ *NCoA3* ในระดับ mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการศึกษาของสารธรรมชาติตัวอื่นในกลุ่ม naphthoquinone คือ plumbagin ที่สามารถยับยั้งการเจริญและลดการดื้อ

ยาของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต้านฮอโมนผ่านการลด *NCoA3* ในระดับ mRNA (Gupta et al., 2016; Sakunrangsit et al., 2016) สำหรับ *NCoR1* ทำหน้าที่เป็น ER co-repressor ของกระบวนการ transcription ในเซลล์มะเร็งเต้านม มีการศึกษาทางคลินิกพบว่า ผู้ป่วยที่ต่อต้านฮอโมนจะมีการแสดงออกของ *NCoR1* ลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ลดลง (Fozzatti, Park, Zhao, Willingham, & Cheng, 2013; Girault et al., 2003) โดยในการศึกษานี้พบว่า EMG ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ *NCoR1* ในระดับ mRNA และจากผลการทดลองพบว่า EMG สามารถลดการเจริญและการติดยาในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต้านฮอโมนโดยการลดการแสดงออกของ *CCND1* และ *NCoA3* ในระดับ mRNA

จากการศึกษาของ Liew และคณะในปีคริสต์ศักราช 2014 พบคุณสมบัติของสารในกลุ่ม naphthoquinone คือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) ในการยับยั้งการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน โพรเจสเทอโรนและ HER2 (TNBC) (Liew, Yong, Lim, Navaratnam, & Ho, 2014) ผู้วิจัยจึงทดสอบฤทธิ์ของ EMG ในการต้านการเคลื่อนที่และลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต้านฮอโมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ในการทดลองนี้ใช้ matrigel เคลือบ invasion chamber โดย matrigel ทำหน้าที่คล้ายกับ extracellular matrix (ECM) ของเซลล์ ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีความสามารถในการลุกลามจะหลั่งเอนไซม์ protease เพื่อย่อย ECM เช่น matrix metalloproteinase (MMP) เป็นต้น ทำให้เซลล์มะเร็งลุกลามผ่าน matrigel ไปยังบริเวณ lower chamber ได้ จากการทดลองพบว่า EMG สามารถลดการเคลื่อนที่และลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมผ่าน matrigel ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาคือ สารในกลุ่ม naphthoquinone เช่น plumbagin สามารถยับยั้งกระบวนการเคลื่อนที่และลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต้านฮอโมน กระบวนการ epithelial mesenchymal transition (EMT) (Sakunrangsit et al., 2016) นอกจากนี้ shikonin ซึ่งเป็นสารอีกตัวในกลุ่ม naphthoquinone ก็สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและลุกลามในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากผ่านการลดของ *VEGF* และ *MMP-9* ในระดับ mRNA (Jang, Lee, Jang, Jeong, & Kim, 2014; Liew et al., 2014) ในการศึกษาพบว่า EMG สามารถลดการแสดงออกของ *MMP-9* และ *uPA* ในระดับ mRNA ซึ่งยีนทั้งสองชนิดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลาม ทั้งยังเป็น prognostic factor ที่สำคัญในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลาม (Dovnik & Takac, 2017; Duffy, Duggan, Mulcahy, McDermott, & O'Higgins, 1998; Duffy et al., 2014) โดยผลของ EMG ต่อ *uPA* ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่พบว่า EMG สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *uPA* ในระดับ mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ *uPA* ในเลือดสูง มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าผู้ป่วยที่มี *uPA* ในเลือดต่ำกว่า และมีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า *uPA* มีบทบาทสำคัญในการทำนายโรคของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เริ่มมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะข้างเคียง [85, 86] สรุปได้ว่า EMG สามารถลดการแพร่กระจายและลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต้านฮอโมนโดยการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *MMP-9* และ *uPA* ในระดับ mRNA ซึ่งเป็น invasive factor ที่สำคัญของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

เมื่อเซลล์ไม่ยึดติดอยู่กับ ECM ส่งผลให้สามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณอื่นได้ ร่างกายจึงมีกลไกในการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติด้วยการตายแบบ anoikis (Gilmore, 2005) แต่เซลล์มะเร็งสามารถหลีกเลี่ยงการตายแบบ anoikis และเจริญในบริเวณที่เซลล์เคลื่อนที่ไปได้ (Paoli, Giannoni, & Chiarugi, 2013; Simpson, Anyiwe, & Schimmer, 2008) ดังนั้นการศึกษาการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งที่นอกจากจะเกี่ยวข้องกับการก่อก้อนมะเร็ง (tumorigenesis) แล้ว ยังเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็ง (Bhummaphan & Chanvorachote, 2015) จากการศึกษาด้วยวิธี colony formation assay พบว่า ramentaceone ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone สามารถยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (ER-negative breast cancer) [87] ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของ EMG ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone เช่นเดียวกันในการยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอร์โมนด้วยวิธี soft agar assay พบว่า EMG สามารถลดจำนวนและขนาดของ colony ใน soft agar ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอร์โมนทั้งสองชนิด แสดงว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะในระดับหลอดทดลองผ่านการลดจำนวนและขนาดของ colony ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอร์โมน

เนื่องจาก EMG เป็นสารสังเคราะห์ใหม่ จึงยังไม่มีผู้ศึกษาถึงความปลอดภัยทั้งในระดับเซลล์และสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยจึงทดสอบฤทธิ์ของ EMG โดยการคำนวณหาค่า selectivity index (SI) จาก IC<sub>50</sub> ของ EMG ในเซลล์ปกติ คือ เซลล์เยื่อปิว PCS201-010 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 โดยเทียบกับยา doxorubicin (DOX) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Bagla, McGaw, Elgorashi, & Eloff, 2014; Oliveira et al., 2015) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าค่า SI ของ EMG มากกว่า DOX แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของ EMG ต่อเซลล์เยื่อปิว PCS201-010 น้อยกว่า DOX สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ ในปีคริสต์ศักราช 2017 ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ของ EMG ในการลดการสะสมของเซลล์ไขมัน โดยเริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษของ EMG ต่อเซลล์ไขมันพบว่า EMG ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 cells (Kim et al., 2017)

สรุปได้ว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 ทั้งที่กระตุ้นการเจริญด้วย E<sub>2</sub> หรือไม่มี E<sub>2</sub> ผ่านการลดยีนที่เป็นเป้าหมายตัวรับเอสโตรเจน *PS2 PR CCND1* และ *CTSD* ในระดับ mRNA และ EMG สามารถลดการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอร์โมนผ่านการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ *CCND1* และ *NCoA3* ซึ่งการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มขึ้นเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญของการดื้อยาต้านฮอร์โมน นอกจากนี้ EMG ยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอร์โมนผ่านการลดการแสดงออกของ *MMP-9* และ *uPA* ในระดับ mRNA ทั้งยังสามารถลดขนาดและจำนวนของ colony ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอร์โมนและ EMG ยังมีความเป็นพิษน้อยกว่ายาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

EMG มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่ไม่ดื้อยา และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกกระตุ้นการเจริญด้วย E<sub>2</sub> ได้ คล้าย



กับการออกฤทธิ์ของ mansonone G ในการต้านการทำงานของฮอริโมนเอสโตรเจน (El-Halawany et al., 2007; El-Halawany et al., 2013; H. Huang et al., 2018) ซึ่งนอกจากคุณสมบัติข้างต้น mansonone G ยังมีฤทธิ์ในการแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจน (El-Halawany et al., 2007) โดยผลของ EMG ต่อการยับยั้งการเจริญและการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย  $E_2$  ดีกว่าการให้ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ไม่ได้รับ  $E_2$  ดังนั้นผลนี้อาจเกิดจาก EMG มีฤทธิ์ต้านการทำงานของฮอริโมนเอสโตรเจนเช่นเดียวกับ mansonone G แล้วส่งผลยับยั้งการเจริญมากกว่าฤทธิ์จากความเป็นพิษของ EMG อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่า EMG สามารถแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจนและออกฤทธิ์ต้านฮอริโมนเอสโตรเจน จึงต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี ER-alpha competitor assay ต่อไป เพื่อแสดงให้เห็นถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน

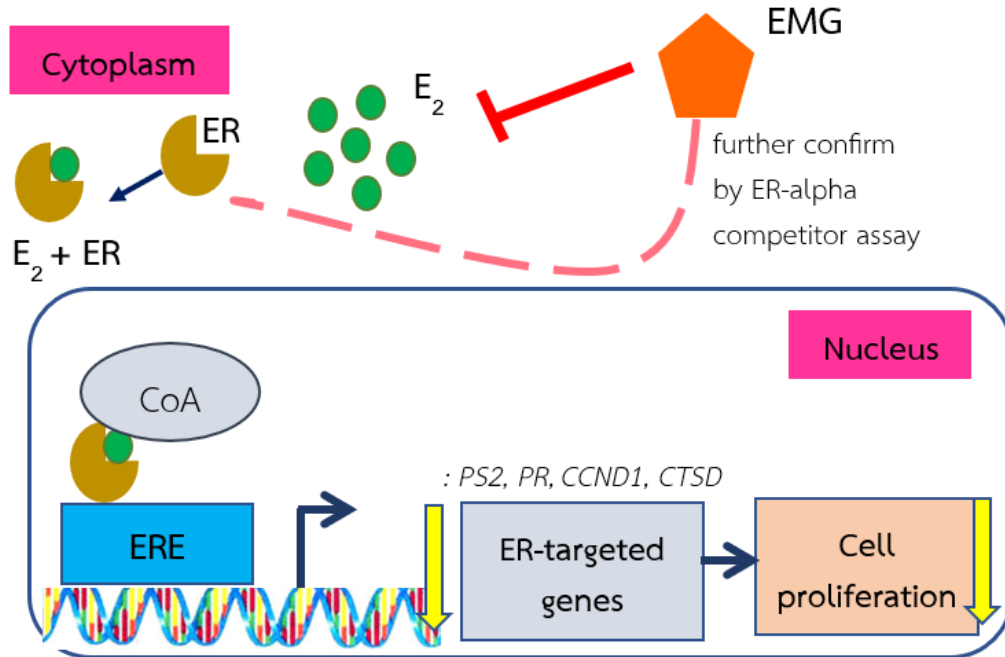
ในการศึกษานี้รายงานผลของ EMG ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอริโมนผ่านการลดยีน *CCND1* และ *NCoA3* ซึ่งเป็นเพียงกลไกหนึ่งในการต่อต่อยาต้านฮอริโมนของมะเร็งเต้านมเท่านั้น โดยยังไม่ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ EMG ต่อกลไกการต่อต่อยาต้านฮอริโมนอื่น ๆ เนื่องจาก EMG เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone ซึ่งมีการศึกษาจำนวนมากรายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตผ่าน survival pathway อื่น ๆ เช่น PI3K/Akt pathway และ Ras/ERK pathway (Kawiak & Lojkowska, 2016) และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ผ่านการสร้าง reactive oxygen species (ROS) (H. Huang et al., 2018) นอกจากนี้ EMG ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมผ่านการลดยีน *MMP-9* และ *uPA* ซึ่งเป็นเพียงหนึ่งในกลไกสำคัญในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม ทั้งนี้ EMG อาจจะสามารถยับยั้งการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งผ่านทางกลไกอื่น ๆ ด้วย เนื่องจาก menadione ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งช่องปาก (oral squamous carcinoma) ผ่านการเพิ่มขึ้นของยีน E-cadherin และการลดลงของยีน vimentin และ fibronectin ในกระบวนการ EMT ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็ง (Suresh, Raghun, & Karunakaran, 2013)

EMG ยังสามารถลดขนาดและจำนวนของ colony ด้วยวิธี soft agar ซึ่งเป็นการทดลองเพื่อยับยั้งการก่อก้อนมะเร็งในระดับหลอดทดลอง โดยจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า EMG อาจจะสามารถยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลองได้ (Bhummaphan & Chanvorachote, 2015)

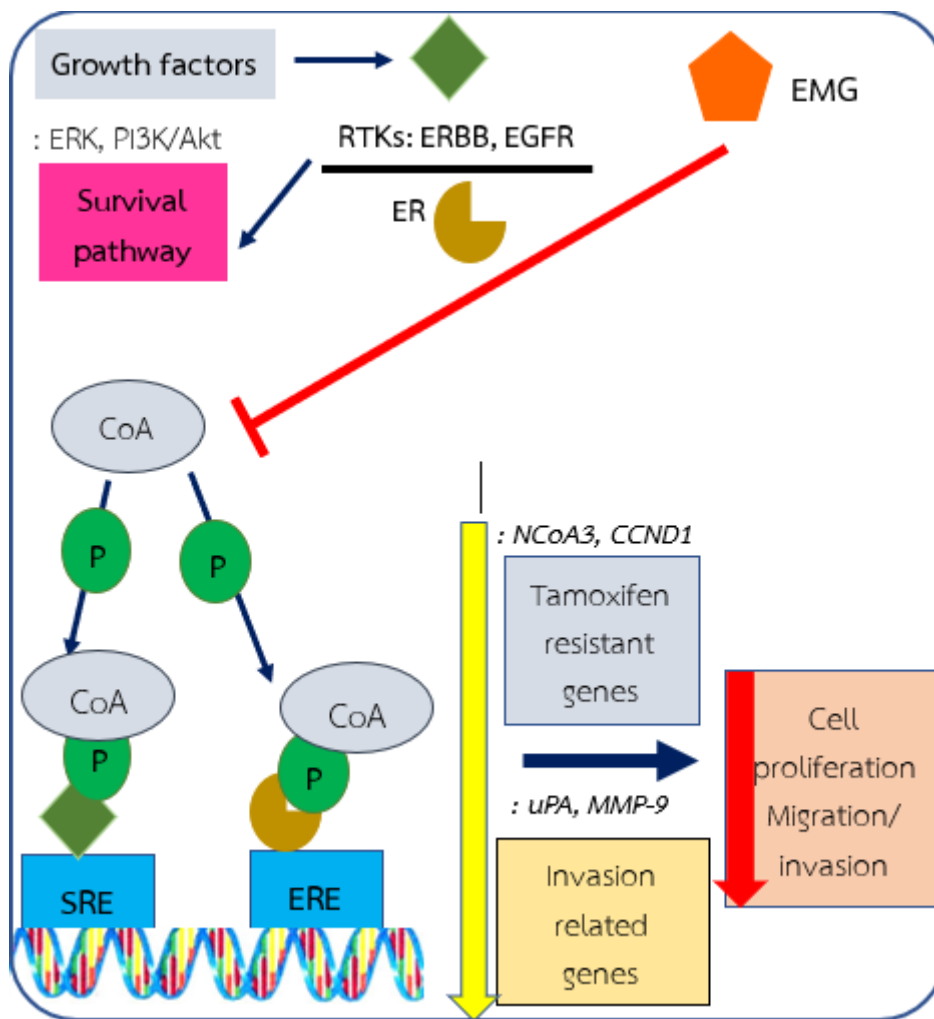
ดังนั้นในการศึกษานี้สามารถสรุปกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของ EMG ได้ดังนี้ EMG สามารถต้านการทำงานของฮอริโมนเอสโตรเจน ทำให้ไม่สามารถไปจับกับตัวรับเอสโตรเจน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงยีนที่เป็นเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจนและลดการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7 ได้ **รูปที่ 23**

สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต่อยาต้านฮอริโมน EMG ยับยั้งการทำงานของ NCoA3 ซึ่งเป็น coactivator ที่มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโต เนื่องจาก NCoA3 สามารถไปกระตุ้นการทำงานของ E2F เพื่อให้เกิด cell cycle progression (Ma, Ren, Wang, & He, 2011) ซึ่งการยับยั้งการ

ทำงานของ NCoA3 อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ CCND1 ในวัฏจักรเซลล์ได้ นอกจากนี้ NCoA3 ยังเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยมีการศึกษาพบว่าการลดการทำงานของ NCoA3 จะสามารถลด MMP-9 promoter activity (Xu et al., 2010) ซึ่ง MMP-9 เป็นเอนไซม์ protease ที่สามารถย่อย Extracellular matrix เพื่อให้เกิดการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ รูปที่ 24



รูปที่ 23 Proposed mechanism of EMG in ER-positive breast cancer cells



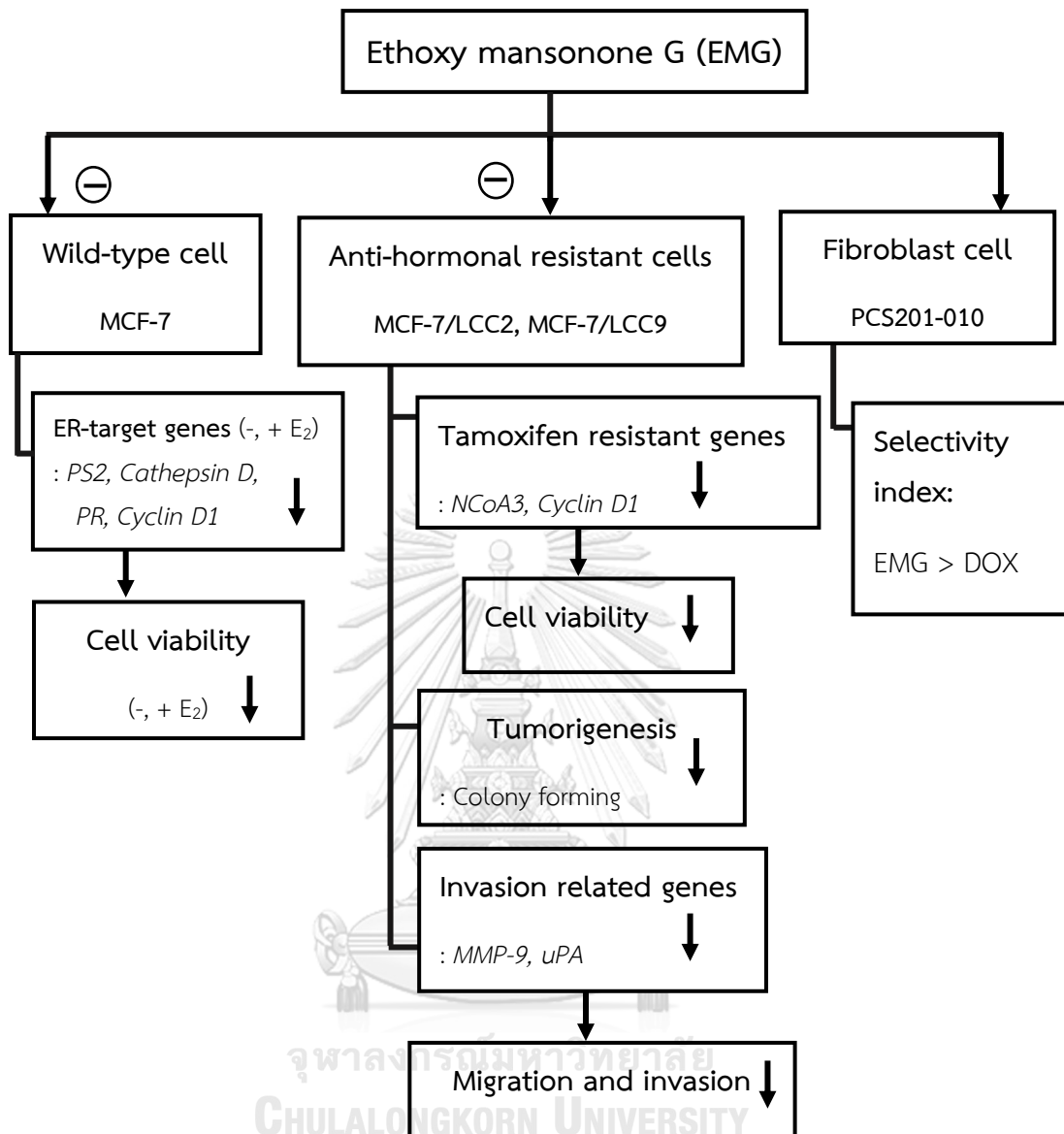
รูปที่ 24 Proposed mechanism of EMT in anti-hormonal resistant breast cancer cells

## สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านม ทั้งชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนและชนิดที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน รวมไปถึงการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยพบว่า EMG สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนผ่านการลดลงในระดับ mRNA ของยีนที่เป็นเป้าหมายตัวรับเอสโตรเจน *PS2 PR CCND1* และ *CTSD* และลดการเจริญ การติดต่อยาในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมนผ่านการลดลงของ *NCoA3* และ *CCND1* ในระดับ mRNA แต่ไม่มีผลต่อ *NCoR1* ทั้งยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และลุกลามผ่านการลดลงของยีน *MMP-9* และ *uPA* ในระดับ mRNA และลดการเจริญแบบไร้การยึดเกาะผ่านการลดขนาดและจำนวนของ colony แสดงถึงการยับยั้งการก่อก้อนมะเร็งของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมน และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่ายาเคมีบำบัด doxorubicin

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของ EMG ในเซลล์มะเร็งเต้านมแต่ละชนิดได้อย่างสมบูรณ์ จึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ศึกษาการจับของ EMG กับตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน MCF-7, ศึกษาผลของ EMG ในการยับยั้งการเจริญ การแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ติดต่อยาต้านฮอร์โมนผ่านทางกลไกอื่น ๆ ที่สำคัญในเซลล์มะเร็งเต้านม และศึกษาความเป็นพิษ รวมไปถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลองต่อไป

ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ผ่านทางยีนต่าง ๆ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ของ EMG ในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต



## บรรณานุกรม

- Abukhdeir, A. M., & Park, B. H. (2008). p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert reviews in molecular medicine*, 10, e19.
- Ackermann, T. F., Hortnagl, H., Wolfer, D. P., Colacicco, G., Sohr, R., Lang, F., Lang, U. E. (2008). Phosphatidylinositide dependent kinase deficiency increases anxiety and decreases GABA and serotonin abundance in the amygdala. *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6), 735-744.
- Ahmad, A. (2013). Pathways to Breast Cancer Recurrence. *ISRN Oncology*, 2013, 16.
- Anbalagan, M., & Rowan, B. G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 418 Pt 3, 264-272.
- Ayyagari, R., Tang, D., Patterson-Lomba, O., Zhou, Z., Xie, J., Chandiwana, D., Niravath, P. A. (2018). Progression-free Survival With First-line Endocrine-based Therapies Among Postmenopausal Women With HR+/HER2- Metastatic Breast Cancer: A Network Meta-analysis. *Clin Ther*, 40(4), 628-639.
- Bach, A. S., Derocq, D., Laurent-Matha, V., Montcourrier, P., Sebti, S., Orsetti, B., Liaudet-Coopman, E. (2015). Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(29), 28084-28103.
- Bachman, K. E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Park, B. H. (2004). The PIK3 CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 3(8), 772-775.
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M., & Goodman, C. B. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res*, 29(8), 2993-2996.
- Bagla, V. P., McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., & Eloff, J. N. (2014). Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. *BMC Complement Altern Med*, 14, 383.
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8), 2496-2500.
- Bevan, P., & Mala, C. (2008). The Role of uPA and uPA Inhibitors in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 3(Suppl 2), 1-2.

- Bhummaphan, N., & Chanvorachote, P. (2015). Gigantol Suppresses Cancer Stem Cell-Like Phenotypes in Lung Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 1-10.
- Brunner, N., Boysen, B., Jirus, S., Skaar, T. C., Holst-Hansen, C., Lippman, J., Clarke, R. (1997). MCF7/LCC9: an antiestrogen-resistant MCF-7 variant in which acquired resistance to the steroidal antiestrogen ICI 182,780 confers an early cross-resistance to the nonsteroidal antiestrogen tamoxifen. *Cancer Res*, 57(16), 3486-3493.
- Brunner, N., Frandsen, T. L., Holst-Hansen, C., Bei, M., Thompson, E. W., Wakeling, A. E., Clarke, R. (1993). MCF7/LCC2: a 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant that retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res*, 53(14), 3229-3232.
- Burandt, E., Jens, G., Holst, F., Janicke, F., Muller, V., Quaas, A., Lebeau, A. (2013). Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 137(3), 745-753.
- Cathcart, J., Pulkoski-Gross, A., & Cao, J. (2015). Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis*, 2(1), 26-34.
- Chen, I. C., Hsiao, L. P., Huang, I. W., Yu, H. C., Yeh, L. C., Lin, C. H., Lu, Y. S. (2017). Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitors, Buparlisib and Alpelisib, Sensitize Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells to Tamoxifen. *Sci Rep*, 7(1), 9842.
- Chumsri, S., Howes, T., Bao, T., Sabnis, G., & Brodie, A. (2011). Aromatase, Aromatase Inhibitors, and Breast Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 125(1-2), 13-22.
- Clarke, C. L., Feil, P. D., & Satyaswaroop, P. G. (1987). Progesterone receptor regulation by 17 beta-estradiol in human endometrial carcinoma grown in nude mice. *Endocrinology*, 121(5), 1642-1648.
- Daniel, A. R., Hagan, C. R., & Lange, C. A. (2011). Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 6(3), 359-369.
- de Lima, M., Hajj, G., de Lima, V., & Alves, F. A. (2018). Breast cancer patients have increased risk of developing mTOR inhibitor-associated stomatitis. *Oral Dis*, 24(1-2), 207-209.
- Dey, N., De, P., & Leyland-Jones, B. (2017). PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. *Pharmacol Ther*, 175, 91-106.
- Dovnik, N. F., & Takac, I. (2017). Prognostic significance of uPA/PAI-1 level, HER2 status, and traditional histologic factors for survival in node-negative breast cancer patients. *Radiol Oncol*, 51(1), 65-73.
- Duffy, M. J., Duggan, C., Mulcahy, H. E., McDermott, E. W., & O'Higgins, N. J. (1998).

- Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease. *Clin Chem*, 44(6 Pt 1), 1177-1183.
- Duffy, M. J., McGowan, P. M., Harbeck, N., Thomssen, C., & Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res*, 16(4), 428.
- [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group \(EBCTCG\)](#). (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 365(9472), 1687-1717.
- El-Halawany, A. M., Chung, M. H., Ma, C. M., Komatsu, K., Nishihara, T., & Hattori, M. (2007). Anti-estrogenic activity of mansorins and mansonones from the heartwood of *Mansonia gagei* DRUMM. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55(9), 1332-1337.
- El-Halawany, A. M., El Dine, R. S., Chung, M. H., Nishihara, T., & Hattori, M. (2011). Screening for estrogenic and antiestrogenic activities of plants growing in Egypt and Thailand. *Pharmacognosy Res*, 3(2), 107-113.
- El-Halawany, A. M., Salah El Dine, R., & Hattori, M. (2013). Anti-estrogenic activity of mansonone G and mansorin A derivatives. *Pharm Biol*, 51(8), 948-954.
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707.
- Farooq, A. (2015). Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(14), 1372-1384.
- Finn, R. S., Aleshin, A., & Slamon, D. J. (2016). Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res*, 18(1), 17.
- Fozzatti, L., Park, J. W., Zhao, L., Willingham, M. C., & Cheng, S. Y. (2013). Oncogenic Actions of the Nuclear Receptor Corepressor (NCOR1) in a Mouse Model of Thyroid Cancer. *PLoS One*, 8(6), e67954.
- Gampenrieder, S. P., Rinnerthaler, G., & Greil, R. (2016). CDK4/6 inhibition in luminal breast cancer. *Memo*, 9, 76-81.
- Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death And Differentiation*, 12, 1473.
- Girard, B. J., Daniel, A. R., Lange, C. A., & Ostrander, J. H. (2014). PELP1: A review of PELP1 interactions, signaling, and biology. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), 10-16
- 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.
- Gohji, K., Fujimoto, N., Hara, I., Fujii, A., Gotoh, A., Okada, H., Nakajima, M. (1998). Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer*, 79(1), 96-101.
- Green, K. A., & Carroll, J. S. (2007). Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat Rev Cancer*, 7(9), 713-722.
- Gupta, A., Hossain, M. M., Miller, N., Kerin, M., Callagy, G., & Gupta, S. (2016). NCOA3 coactivator is a transcriptional target of XBP1 and regulates PERK-eIF2alpha-ATF4 signalling in breast cancer. *Oncogene*, 35(45), 5860-5871.
- Hairani, R., Mongkol, R., & Chavasiri, W. (2016). Allyl and prenyl ethers of mansonone G, new potential semisynthetic antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 26(21), 5300-5303.
- Haldosen, L. A., Zhao, C., & Dahlman-Wright, K. (2014). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), 665-672.
- Hare, S. H., & Harvey, A. J. (2017). mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am J Cancer Res*, 7(3), 383-404.
- Holmes, D. (2011). PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nat Rev Drug Discov*, 10(8), 563-564.
- Hopp, T. A., Weiss, H. L., Hilsenbeck, S. G., Cui, Y., Allred, D. C., Horwitz, K. B., & Fuqua, S. A. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res*, 10(8), 2751-2760.
- Huang, B., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2015). Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol Cell Endocrinol*, 418 Pt 3, 240-244.
- Huang, H., Xie, H., Pan, Y., Zheng, K., Xia, Y., & Chen, W. (2018). Plumbagin Triggers ER Stress-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Induction of ROS. *Cell Physiol Biochem*, 45(1), 267-280.
- Huang, Y., Jiang, D., Sui, M., Wang, X., & Fan, W. (2017). Fulvestrant reverses doxorubicin resistance in multidrug-resistant breast cell lines independent of estrogen receptor expression. *Oncol Rep*, 37(2), 705-712.
- Jang, S. Y., Lee, J. K., Jang, E. H., Jeong, S. Y., & Kim, J. H. (2014). Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation. *Oncol Rep*, 31(6), 2827-2833.
- Jordan, V. C. (2004). Selective estrogen receptor modulation: Concept and consequences in cancer. *Cancer Cell*, 5(3), 207-213.
- Kawiak, A., & Lojkowska, E. (2016). Ramentaceone, a Naphthoquinone Derived from

- Drosera sp., Induces Apoptosis by Suppressing PI3 K/Akt Signaling in Breast Cancer Cells. *PLoS One*, 11(2), e0147718.
- Kim, H. K., Hairani, R., Jeong, H., Jeong, M. G., Chavasiri, W., & Hwang, E. S. (2017). CBMG, a novel derivative of mansonone G suppresses adipocyte differentiation via suppression of PPARgamma activity. *Chem Biol Interact*, 273, 160-170.
- 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.
- Lee, H. R., Kim, T. H., & Choi, K. C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res*, 28(2), 71-76.
- Lewis, J. S., & Jordan, V. C. (2005). Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res*, 591(1-2), 247-263.
- Liew, K., Yong, P. V., Lim, Y. M., Navaratnam, V., & Ho, A. S. (2014). 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicol In Vitro*, 28(3), 335-339.
- Lim, M. S., Choung, S. Y., & Jeong, K. W. (2016). Germacrone Inhibits Estrogen Receptor alpha-Mediated Transcription in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Phytother Res*, 30(12), 2036-2043.
- Lippman, M. E., Krueger, K. A., Eckert, S., Sashegyi, A., Walls, E. L., Jamal, S., Cummings, S. R. (2001). Indicators of lifetime estrogen exposure: effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in the multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants. *J Clin Oncol*, 19(12), 3111-3116.
- List, H. J., Lauritsen, K. J., Reiter, R., Powers, C., Wellstein, A., & Riegel, A. T. (2001). Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem*, 276(26), 23763-23768.
- List, H. J., Reiter, R., Singh, B., Wellstein, A., & Riegel, A. T. (2001). Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, 68(1), 21-28.
- Ma, G., Pan, Y., Zhou, C., Sun, R., Bai, J., Liu, P., He, J. (2015). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is involved in tamoxifen resistance in MCF7 cells. *Oncol Rep*, 34(5), 2423-2430.
- Maira, S. M. (2011). PI3K inhibitors for cancer treatment: five years of preclinical and clinical research after BEZ235. *Mol Cancer Ther*, 10(11), 2016.

- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D. C., & Radisky, E. S. (2014). Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(9), 2736-2749.
- Michaloglou, C., Crafter, C., Siersbaek, R., Delpuech, O., Curwen, J. O., Carnevalli, L. S., Cosulich, S. C. (2018). Combined Inhibition of mTOR and CDK4/6 Is Required for Optimal Blockade of E2F Function and Long-term Growth Inhibition in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.*,17(5), 908-920.
- 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.
- Muranen, T., Meric-Bernstam, F., & Mills, G. B. (2014). Promising rationally derived combination therapy with PI3K and CDK4/6 inhibitors. *Cancer Cell*, 26(1), 7-9.
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., & Sutherland, R. L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(8), 558-572.
- Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(9), 631-643.
- O'Leary, B., Finn, R. S., & Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(7), 417-430.
- Oliveira, P. F. d., Alves, J. M., Damasceno, J. L., Oliveira, R. A. M., Dias, H. J., Crotti, A. E. M., & Tavares, D. C. (2015). Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 183-188.
- Ortiz-Maldonado, V., García-Morillo, M., & Delgado, J. (2015). The biology behind PI3K inhibition in chronic lymphocytic leukaemia. *Ther Adv Hematol*, 6(1), 25-36.
- 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.
- Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3481-3498.
- Pearce, S. T., & Jordan, V. C. (2004). The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50(1), 3-22.
- Petrosian, K., Nguyen, D., Lo, C., Kanaya, N., Somlo, G., Cui, Y. X., Chen, S. (2018). Use of dual mTOR inhibitor MLN0128 against everolimus-resistant breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 170(3), 499-506.
- Ring, A., & Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat*

- Cancer*, 11(4), 643-658.
- Ronckers, C. M., Erdmann, C. A., & Land, C. E. (2005). Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res*, 7(1), 21-32.
- Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep*, 21(5), 1323-1333.
- Sakunrangsit, N., Kalpongukul, N., Pisitkun, T., & Ketchart, W. (2016). Plumbagin Enhances Tamoxifen Sensitivity and Inhibits Tumor Invasion in Endocrine Resistant Breast Cancer through EMT Regulation. *Phytother Res*, 30(12), 1968-1977.
- Siegel Rebecca, L., Miller Kimberly, D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68(1), 7-30.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1), 7-30.
- Simpson, C. D., Anyiwe, K., & Schimmer, A. D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*, 272(2), 177-185.
- Stack, G., Kumar, V., Green, S., Ponglikitmongkol, M., Berry, M., Rio, M. C., et al. (1988). Structure and function of the pS2 gene and estrogen receptor in human breast cancer cells. *Cancer Treat Res*, 40, 185-206.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg Oncol Clin N Am*, 10(2), 383-392.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785-796.
- Suresh, S., Raghu, D., & Karunakaran, D. (2013). Menadione (Vitamin K3) induces apoptosis of human oral cancer cells and reduces their metastatic potential by modulating the expression of epithelial to mesenchymal transition markers and inhibiting migration. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(9), 5461-5465.
- Tiew, P., Ioset, J. R., Kokpol, U., Chavasiri, W., & Hostettmann, K. (2003). Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Phytother Res*, 17(2), 190-193.
- Tiew, P., Ioset, J. R., Kokpol, U., Schenk, K., Jaiboon, N., Chaichit, N., Hostettmann, K. (2002). Four new sesquiterpenoid derivatives from the heartwood of *Mansonia gagei*. *J Nat Prod*, 65(9), 1332-1335.
- Tiew, P., Puntumchai, A., Kokpol, U., & Chavasiri, W. (2002). Coumarins from the heartwoods of *Mansonia gagei* Drumm. *Phytochemistry*, 60(8), 773-776.

- Viedma-Rodriguez, R., Baiza-Gutman, L., Salamanca-Gomez, F., Diaz-Zaragoza, M., Martinez-Hernandez, G., Ruiz Esparza-Garrido, R., Arenas-Aranda, D. (2014). Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep*, 32(1), 3-15.
- Vora, S. R., Juric, D., Kim, N., Mino-Kenudson, M., Huynh, T., Costa, C., Engelman, J. A. (2014). CDK 4/6 inhibitors sensitize PI3K CA mutant breast cancer to PI3K inhibitors. *Cancer Cell*, 26(1), 136-149.
- Wang, Y., Wang, Y., Liu, S., Liu, Y., Xu, H., Liang, J., Guo, Q. (2018). Upregulation of EID3 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation-induced cellular senescence. *Biomed Pharmacother*, 107, 606-614.
- Wesierska-Gadek, J., Schreiner, T., Maurer, M., Waringer, A., & Ranftler, C. (2007). Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 12(2), 280-293.
- Wilkins-Port, C. E., Higgins, S. P., Higgins, C. E., Kobori-Hotchkiss, I., & Higgins, P. J. (2012). Complex Regulation of the Pericellular Proteolytic Microenvironment during Tumor Progression and Wound Repair: Functional Interactions between the Serine Protease and Matrix Metalloproteinase Cascades. *Biochem Res Int*, 2012, 1-8.
- Wu, W. B., Ou, J. B., Huang, Z. H., Chen, S. B., Ou, T. M., Tan, J. H., Huang, Z. S. (2011). Synthesis and evaluation of mansonone F derivatives as topoisomerase inhibitors. *Eur J Med Chem*, 46(8), 3339-3347.
- Yeh, W. L. (2013). Fulvestrant-Induced Cell Death and Proteasomal Degradation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Protein in MCF-7 Cells Require the CSK c-Src Tyrosine Kinase. *PLOS ONE*, 8(4), e 60889.
- Zhang, J., He, L., Geng, X. F., Firestone, R. A., Hong, Y. P., & Li, Y. (2014). Anti-cancer effects of novel doxorubicin prodrug PDOX in MCF-7 breast cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 34(4), 521-528.
- Zhao, C., Yasui, K., Lee, C. J., Kurioka, H., Hosokawa, Y., Oka, T., & Inazawa, J. (2003). Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer*, 98(1), 18-23.
- Zwart, W., Terra, H., Linn, S. C., & Schagen, S. B. (2015). Cognitive effects of endocrine therapy for breast cancer: keep calm and carry on?. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(10), 597-606.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พริยา ชนสุด
วัน เดือน ปี เกิด	5 ธันวาคม 2534
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลราษฎร์ยินดี จังหวัดสงขลา
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนรัตนศึกษา และระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัยนครศรีธรรมราช ในปี พ.ศ.2552 เข้าศึกษาต่อในสำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงและสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีการแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต ในปี พ.ศ.2556
ที่อยู่ปัจจุบัน	76 หมู่ 2 ตำบลท่ายาง อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY