

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเบต้าแลพพาโซนต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอริโมนและเซลล์มะเร็งที่มีการ
แสดงออกของตัวรับเฮอรัท



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The anti-cancer effects of β -lapachone in anti-hormonal resistant and HER-2 over-expressed breast cancer cells



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเบต้าแลพพาโซนต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา ต้านฮอริโมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับ เฮอ์ทู
โดย	น.ส.ชญานิน สุขสนอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณศรีมี เกตุชาติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณศรีมี เกตุชาติ)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิ ลิมปณสิทธิ์กุล)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา ลีวนิช)	

ชญาณิน สุขสนอง : ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเบต้าแลพพาโซนต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน. (The anti-cancer effects of β -lapachone in anti-hormonal resistant and HER-2 over-expressed breast cancer cells) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ.ดร. พญ.วราภรณ์ศรีเมธิตา เกตุชาติ

ปัญหาที่สำคัญในการรักษามะเร็งเต้านมคือการดื้อยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal therapy) ซึ่งจะทำให้เกิดการกลับมาเป็นซ้ำและการลุกลามของมะเร็ง โดยมีการศึกษารายงานว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนจะมีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนบางรายยังต้องการรักษาที่จำเพาะต่อตัวรับฮอร์โมน (target therapy) ดังนั้นจึงมียาที่ใช้กับมะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนอยู่เพียงไม่กี่ชนิด β -lapachone (β -lap) เป็นสารธรรมชาติในกลุ่ม naphthoquinone ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า β -lap มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ MCF-7, SKBR3 และ MDA-MB-231 แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF7/LCC2 และ MCF7/LCC9) และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนสูง (SKBR3) พบว่า β -lap ลดอัตราการมีชีวิตรอดและลดการเจริญแบบไร้การยึดเกาะทั้งการลดจำนวนและขนาดของ colony ในเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิด นอกจากนี้ β -lap สามารถยับยั้ง downstream signaling ของ HER-2 ผ่านการยับยั้ง pERK และยังมีฤทธิ์ลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ Cyclin D1 และ ER-co-activator ได้แก่ NCOA3 เฉพาะในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF7/LCC2 และ MCF7/LCC9) แต่ β -lap ไม่มีผลต่อ pHER-2/HER-2 จึงไม่มีผลยับยั้งกระบวนการ epithelial- mesenchymal transition (EMT) และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ถึงแม้ว่าการศึกษาจะพบว่า β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน (SKBR3) แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9) ที่มีการเพิ่มขึ้นของตัวรับฮอร์โมนมีความแตกต่างกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน (SKBR3) การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของกลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ซึ่งหากทำการศึกษาเพิ่มเติมแล้ว β -lap น่าจะสามารถพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในผู้ป่วยที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน และยังมีความปลอดภัยเนื่องจากมีการศึกษา β -lap ในระดับคลินิกแล้ว

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6074055430 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: β -LAPACHONE, ANTI-HORMONAL RESISTANT BREAST CANCER CELLS, EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION (EMT), HER-2 OVER-EXPRESSED BREAST CANCER CELLS

Chayanin Suksanong : The anti-cancer effects of β -lapachone in anti-hormonal resistant and HER-2 over-expressed breast cancer cells. Advisor: Asst. Prof. WANNARASMI KETCHART, M.D.

One of the challenges in breast cancer treatment is anti-hormonal resistance which causes tumor recurrence and metastasis. In previous studies, HER-2 overexpression was observed in tamoxifen resistant tumors. It was also reported that some patients develop resistance to the HER-2 receptor-specific treatment. Thus, the treatment for anti-hormonal resistant patients is very limited. β -lapachone (β -lap), a naphthoquinone compound, has been studied on anti-cancer effects in some breast cancer cell lines such as MCF-7, SKBR3 and MDA-MB-231. However, the study of β -lap in anti-hormonal resistant cells has never been reported. This study aimed to investigate anti-cancer effects and inhibitory mechanism of β -lap in anti-hormonal resistant breast cancer cells (MCF-7/LCC2, and MCF-7/LCC9) and HER-2 over-expressed cells (SKBR3). The results showed that β -lap significantly decreased cell viability and anchorage-independent growth in all three cell lines. The inhibitory effects of β -lap were also observed in downstream signaling of HER-2 by the reduction of p-ERK1/2. Moreover β -lap was able to reduce Cyclin D1 (tamoxifen resistant protein) and NCOA3 (ER-coactivator) in anti-hormonal resistant breast cancer cells (MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9). However, β -lap had no effect on pHER-2/HER-2 protein level, resulted in β -lap did not inhibit epithelial- mesenchymal transition (EMT) and cancer cell invasion. As mentioned, β -lap demonstrated the inhibitory effect on cell viability in HER-2 over-expressed breast cancer cells (SKBR3), but the mechanism of β -lap was not identified in this cell line. Although, anti-hormonal-resistant breast cancer cells (MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9) exhibited the upregulation of HER-2 expression, the inhibitory mechanism of β -lap was different with HER-2 overexpressed breast cancer cells (SKBR3). Therefore, β -lap should be further studied to develop as a novel anticancer drug for anti-hormonal resistant breast cancer patients.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผศ.ดร. พญ.วรรณศรีศรี เกตุชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้แนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบแก้ไขความเรียบร้อย ตลอดจนคำแนะนำที่ดีเสมอมาและขอขอบพระคุณประธานและคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ ผศ.ดร.วัชรวิ ลิมปณสิทธิกุล ผศ.ดร. เดภิชา จินดาทิพย์ และ ผศ.ดร. ปัทมา ล้วนนิช รวมถึงอาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้และแนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ให้แก่ข้าพเจ้า

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

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ที่หน่วยปฏิบัติการเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และเพื่อนร่วมศึกษาในสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่ได้ให้ความสนับสนุนในทุก ๆ เรื่องเป็นอย่างดี ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จไปได้ด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชญาณิน สุขสนอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย (Background and rationale)	1
คำถามงานวิจัย (Research questions).....	3
วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives).....	3
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	3
กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	4
รูปแบบการทดลอง (Experimental design).....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
มะเร็งเต้านม (Breast cancer).....	6
กลไกการเกิดมะเร็งเต้านม	7
ชนิดของมะเร็งเต้านม	7
ระยะของโรคมะเร็งเต้านม	8
พยาธิกำเนิดและปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งเต้านม	9
ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen hormone).....	9

ตัวรับเอสโตรเจน (Estrogen receptor, ER).....	10
โครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจน	10
กลไกการทำงานของตัวรับเอสโตรเจน	11
ER coregulator protein	11
แนวทางการรักษา.....	12
ฮอร์โมนบำบัด (Anti-hormonal therapy)	12
1. Selective estrogen receptor modulators (SERMs)	13
2. Selective estrogen-receptor down-regulators (SERDs).....	13
3. Aromatase inhibitors (AIs).....	13
การดื้อยาต้านฮอร์โมน (Anti-hormonal resistance).....	14
Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2).....	16
Downstream signaling ของเฮอรัฟุ.....	17
• กลไกของ PI3K pathway	17
• กลไกของ MAPK pathway.....	17
HER2 และการดื้อยาต้านฮอร์โมน.....	19
การเพิ่มขึ้นของ HER2 ในเซลล์ที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน.....	20
การลุกลามและแพร่กระจายของมะเร็ง (Invasion and Metastasis)	21
กระบวนการ epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) และการลุกลามของมะเร็ง (Invasion).....	22
β-lapachone (β-lap)	24
การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ β-lapachone	25
Cell cycle arrest	25
การชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS)	26
ความปลอดภัยของ β-lapachone	27

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
เซลล์ทดสอบ	30
สารทดสอบ	30
สารเคมี.....	30
เครื่องมือและอุปกรณ์	31
วิธีการทดลอง.....	32
1. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการ ต่อต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน.....	32
2. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการยับยั้ง anchorage-independent growth ด้วยวิธี Soft agar เพื่อประเมินการเจริญของเซลล์มะเร็งแบบไร้การยึดเกาะ (anchorage-independent growth) ในระดับหลอดทดลอง	33
3. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ (migration) และการ ลุกลาม (invasion) ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการต่อต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็ง เต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน.....	35
4. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การต่อต้านฮอร์โมนและกระบวนการเปลี่ยนแปลง รูปร่างของเยื่อหุ้ม ด้วยวิธี RT-PCR.....	37
5. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการแสดงออกของโปรตีน downstream signaling ของ HER-2 และกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มที่มีผลต่อการ แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี western blot analysis.....	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	40
β -lapachone สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ต่อต้านฮอร์โมนและ เซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน.....	40
β -lapachone สามารถยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะ (Anchorage-independent growth) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการต่อต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ ตัวรับฮอร์โมน.....	45

β -lapachone ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของยีน P21 ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีตัวรับฮอร์โมน	52
β -lapachone ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน	54
β -lapachone ไม่มีผลในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน	57
β -lapachone ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้ม การแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของฮอร์โมน	62
ผลของ β -lapachone ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen (tamoxifen-resistant protein) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน	65
ผลของ β -lap ต่อ Cyclin D1	65
ผลของ β -lap ต่อ NCOA3	69
ผลของ β -lap ต่อระดับของโปรตีน HER-2 และ downstream signaling ของ HER-2	72
ผลของ β -lap ต่อ pHER-2/HER-2	72
ผลของ β -lap ต่อ pAKT/AKT	74
ผลของ β -lap ต่อ pERK/ERK	78
ผลของ β -lap ต่อ pJNK/JNK	82
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย	86
อภิปรายผลการทดลอง	86
บรรณานุกรม	94
ประวัติผู้เขียน	103

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงระยะของมะเร็งเต้านมตามการจัดกลุ่มของ American Joint Committee on Cancer (AJCC) (28).....	8
ตารางที่ 2 แสดงค่า IC ₅₀ ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ได้แก่ SKBR3.....	44
ตารางที่ 3 แสดงค่า IC ₅₀ ของ β -lap Lapatinib และ Palbociclib ที่ 48 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ได้แก่ SKBR3 (17, 75).....	44



สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมทั่วโลก ในปี 2018 (1).....	6
รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจน (32, 33).....	10
รูปที่ 3 แสดงการออกฤทธิ์ของ anti-hormonal therapy drugs (46).....	14
รูปที่ 4 แสดงกลไกการดื้อยาต้านฮอร์โมน (Mechanisms of anti-hormonal resistance) (50)..	15
รูปที่ 5 แสดงการทำงานของ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (51).....	16
รูปที่ 6 แสดง PI3K/AKT/mTOR and RAS/RAF/MEK/MAPK pathways (52)	19
รูปที่ 7 แสดงกลไกการดื้อยา tamoxifen (Tamoxifen Resistance) (7).....	20
รูปที่ 8 แสดงกระบวนการบุกรุกและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (59).....	22
รูปที่ 9 แสดงกระบวนการ Epithelial-to-mesenchymal transition (61)	23
รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ β -lapachone (66).....	24
รูปที่ 11 β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2.....	41
รูปที่ 12 β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC9.....	42
รูปที่ 13 β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3.....	43
รูปที่ 14 β -lap ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2	46
รูปที่ 15 β -lap ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC9	48
รูปที่ 16 β -lap ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3	50
รูปที่ 17 β -lap ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ P21 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้าน ฮอร์โมน MCF-7/LCC9 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอร์ทู SKBR3.....	53
รูปที่ 18 β -lap ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC9	56
รูปที่ 19 β -lap ไม่มีผลในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2	58
รูปที่ 20 β -lap ไม่มีผลในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3	60

รูปที่ 21 β -lap ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ <i>E-Cadherin</i> , <i>Vimentin</i> , <i>MMP-9</i> และ <i>uPA</i> ในเซลล์ MCF-7/LCC9	63
รูปที่ 22 β -lap ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ <i>E-Cadherin</i> , <i>Vimentin</i> , <i>MMP-9</i> และ <i>uPA</i> ในเซลล์ SKBR3	64
รูปที่ 23 β -lap ลดระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ MCF-7/LCC2	66
รูปที่ 24 β -lap ลดระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ MCF-7/LCC9	67
รูปที่ 25 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ SKBR3	68
รูปที่ 26 β -lap สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC2	70
รูปที่ 27 β -lap สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC9	71
รูปที่ 28 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pHER2/HER2 ในเซลล์ MCF-7/LCC2, MCF-7/LCC9 และ SKBR3	73
รูปที่ 29 β -lap เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ MCF-7/LCC2	75
รูปที่ 30 β -lap เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ MCF-7/LCC9	76
รูปที่ 31 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ SKBR3	77
รูปที่ 32 β -lap ลดระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC2	79
รูปที่ 33 β -lap ลดระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC9	80
รูปที่ 34 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ SKBR3	81
รูปที่ 35 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ MCF-7/LCC2	83
รูปที่ 36 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ MCF-7/LCC9	84
รูปที่ 37 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ SKBR3	85
รูปที่ 38 กลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน	92
รูปที่ 39 กลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน	93

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$\mu\text{g/mL}$	Microgram per milliliter
μL	Microliter
μM	Micromolar
AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
AIB1	Amplified in breast cancer 1
AI	Aromatase Inhibitor
ANOVA	Analysis of variance
ATCC	American Type Culture Collection
<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer Type 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast Cancer Type 2</i>
CCND1	Cyclin D1
CDK4/6	Cyclin Dependent Kinase 4 Or 6
CoA	Co-Activator
E2	Estrogen
E2F	E2 Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ERE	Estrogen Response Element
ER	Estrogen Receptor
ER- α	Estrogen Receptor Alpha
ER- β	Estrogen Receptor Beta
ER-Targeted Gene	Estrogen Receptor Targeted Gene
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphase dehydrogenase
h	Hour
H12	Helix 12
HATS	Histone Acetyl Transferase
HDAC	Histone Deacetylase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IC ₅₀	Half inhibitory concentration
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Human breast cancer cell lines
MCF-7/LCC2	Tamoxifen-resistant breast cancer cell lines

MCF-7/LCC9	Tamoxifen/Fluvestant-resistant breast cancer cell lines
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide
p-AKT	phospho-AKT
p-ERK	phospho-ERK1/2
PBS	Phosphate buffer saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PR	Progesterone Receptor
SERDS	Selective Estrogen Receptor Down Regulators
SERMS	Selective Estrogen Receptor Modulators
TAM	Tamoxifen
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
ROS	Reactive oxygen species



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย (Background and rationale)

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 1 ในผู้หญิง ในปีคริสต์ศักราช 2018 พบผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ทั่วโลกประมาณ 2 ล้านราย และในประเทศไทยพบประมาณ 2 หมื่นราย โดยมะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 2 ของมะเร็งในผู้หญิงไทย และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (1) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีอัตราการแพร่กระจายสูง ซึ่งการแพร่กระจายของมะเร็งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการกลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต (2, 3) ในปัจจุบันการรักษามะเร็งเต้านมจะทำได้โดยการผ่าตัดและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา เพื่อใช้ประเมินความรุนแรงของโรคและเลือกการให้ยาที่เหมาะสมกับชนิดของมะเร็ง (Adjuvant therapy) โดยการตรวจตัวรับฮอร์โมน (hormone receptor) และตัวรับฮอร์โมน (HER-2 receptor) (4) ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจะพบการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนประมาณร้อยละ 70 หรือพบการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนประมาณร้อยละ 20 (5) จากการศึกษาพบว่า ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเมื่อพบการดื้อต่อยาต้านฮอร์โมน (hormonal therapy) จะมีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้น (6) และยังพบว่า การส่งสัญญาณของตัวรับฮอร์โมนสามารถ crosstalk กับการส่งสัญญาณของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ จึงส่งผลให้การรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน tamoxifen ซึ่งเป็นการรักษามาตรฐาน (standard treatment) ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนไม่ได้ผลและเกิดการดื้อยา (7) นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนบางรายยังต้องการรักษาที่จำเพาะต่อตัวรับฮอร์โมน (target therapy) เช่น trastuzumab และ lapatinib อีกด้วย (8, 9) แม้ว่าการพัฒนายาเพื่อรักษามะเร็งจากปัญหาการดื้อยาต้านฮอร์โมนยังมีอยู่อย่างต่อเนื่อง แต่ก็ยังมียาที่ใช้สำหรับมะเร็งเต้านมที่ดื้อยาเพียงไม่กี่ชนิด เช่น PI-3K inhibitor หรือ CDK 4/6 inhibitor ซึ่งก็พบอัตราการดื้อยาและการกลับมาเป็นซ้ำเพิ่มขึ้น (10, 11)

β -lapachone (β -lap) เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone ซึ่งสกัดได้จากเปลือกของต้นแลพพาโช (Lapacho tree; *Tabebuia avellanedae*) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมถึงเซลล์มะเร็งเต้านมโดยผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (12) มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสารในกลุ่ม naphthoquinone เช่น rementaceone shikonin biflorin และ plumbagin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการส่งสัญญาณผ่าน PI3K/Akt pathway ซึ่งเป็น downstream ของตัวรับฮอร์โมน ในเซลล์มะเร็ง

เต้านมชนิด BT474, SKBR-3 และ MDA-MB-231 (13-15) นอกจากนี้การศึกษาของ Yang ในปี 2017 ยังแสดงให้เห็นว่า β -lap สามารถยับยั้งการกระบวนการ epithelial-mesenchymal transition (EMT) ที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนที่ (migration) และลุกลาม (invasion) ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 และ MDA-MB-231) (16) และจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อ ยาด้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9) มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนที่สูงขึ้นกว่าเซลล์ที่ไม่ดื้อยา (17) ดังนั้น β -lap อาจมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาด้านฮอร์โมนและมีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนสูง นอกจากนี้ β -lap ยังมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมารักษาผู้ป่วยมะเร็งได้ โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาทางคลินิก (clinical trial phase I) ในมะเร็งหลายชนิด (18-21)

ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ β -lap ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อยาด้านฮอร์โมน (MCF7/LCC2 และ MCF7/LCC9) และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนสูง (SKBR3) และกลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ต่อการยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน downstream signaling ของตัวรับฮอร์โมน

คำถามงานวิจัย (Research questions)

1. β -lapachone มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal resistant breast cancer cells) และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททู (HER2/ErbB2 positive) หรือไม่
2. β -lapachone มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อเมซอทีเลียลซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย (EMT) ของเซลล์มะเร็งเต้านมหรือไม่
3. β -lapachone มีฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน downstream signaling ของตัวรับเฮอรัททูหรือไม่

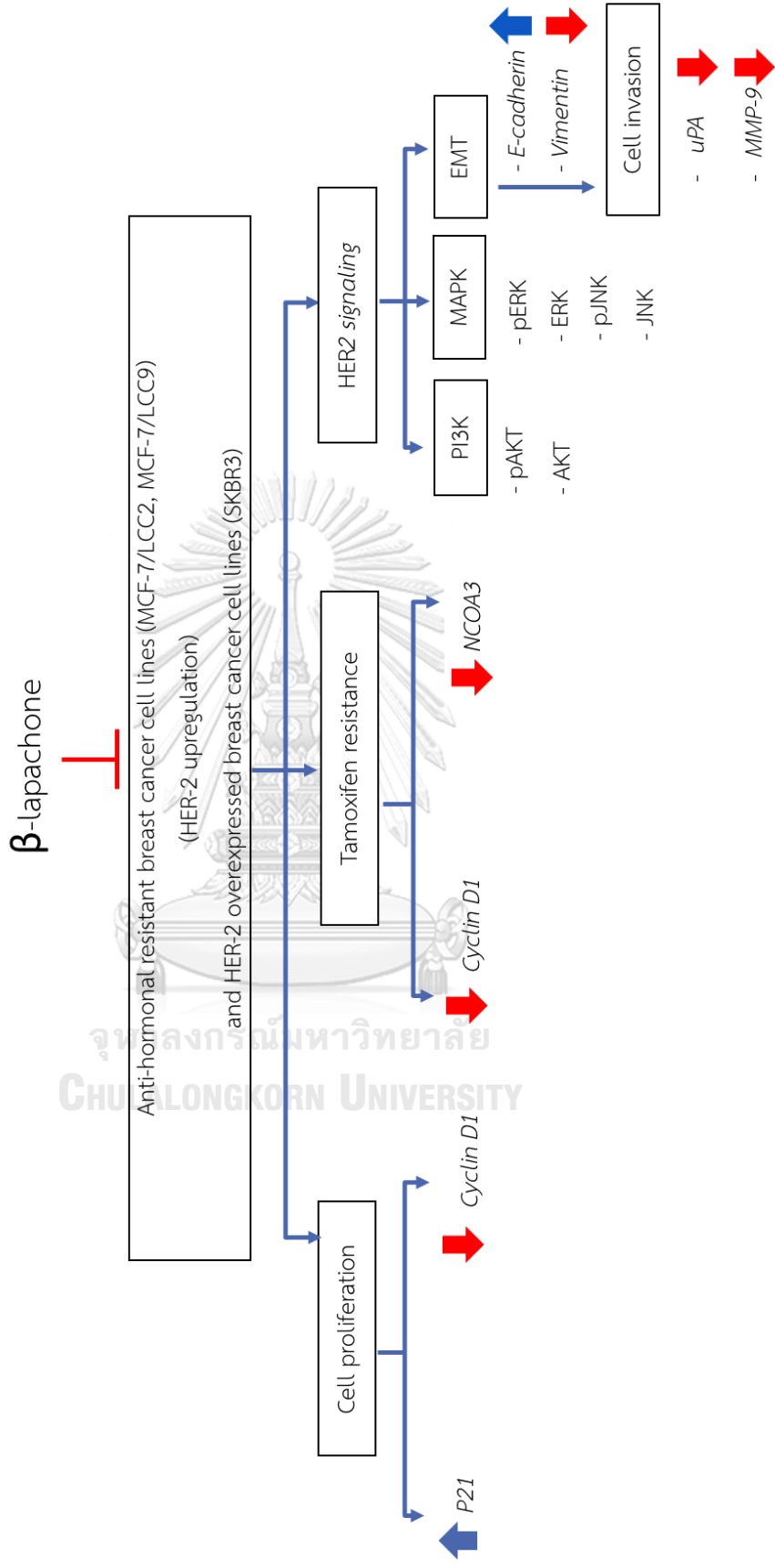
วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal resistant breast cancer cells) ที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททูเพิ่มขึ้น และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททู (HER2/ErbB2 positive)
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการแสดงออกในระดับ mRNA และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) การดื้อยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal resistance) และกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อเมซอทีเลียลที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง epithelial-mesenchymal transition (EMT)
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน downstream signaling ของตัวรับเฮอรัททูในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททู

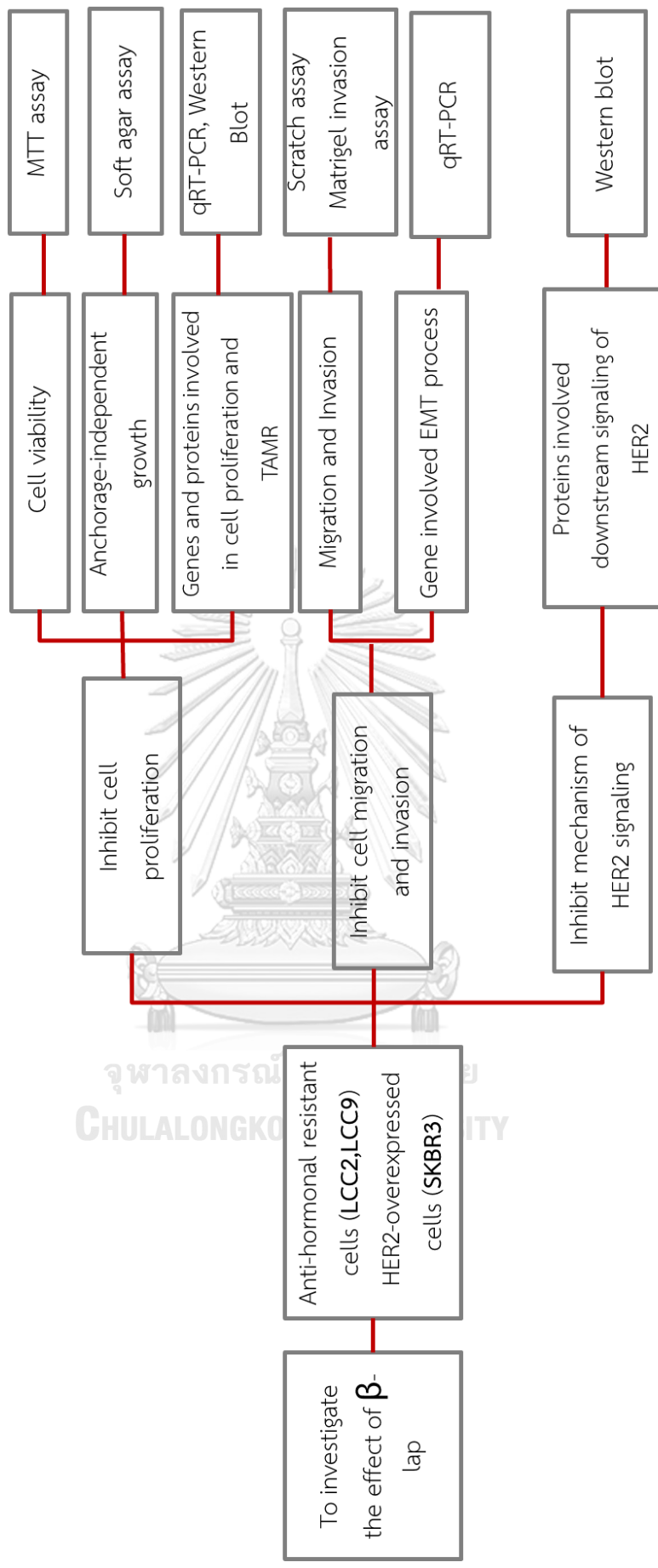
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

β -lapachone มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal resistant breast cancer cells) และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททู (HER2/ErbB2 positive) และมีกลไกยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อเมซอทีเลียลซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์ (EMT) และยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน downstream signaling ของตัวรับเฮอรัททู

กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



รูปแบบการทดลอง (Experimental design)



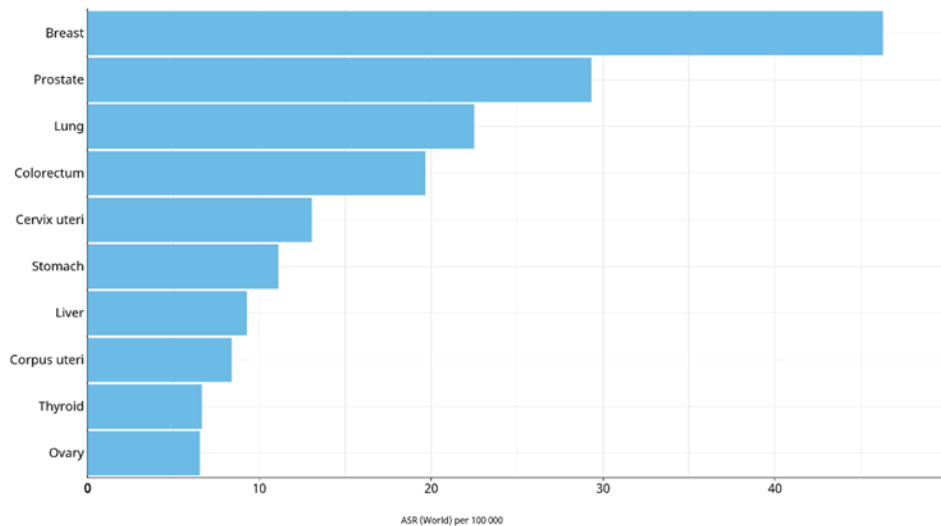
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งเต้านม (Breast cancer)

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 1 ในผู้หญิง และพบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย โดยผู้ชายมีโอกาสพบได้เพียงร้อยละ 1 ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด ปี 2018 พบผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ทั่วโลกประมาณ 2 ล้านราย คิดเป็นร้อยละ 11 และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 6 แสนราย คิดเป็นร้อยละ 6.6 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั่วโลก จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลก (WHO) รายงานว่า อัตราผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่และอัตราการเสียชีวิตพบในชาวเอเชียมากเป็นอันดับ 1 (1) ดังแสดงในรูปที่ 1

สำหรับประเทศไทยมะเร็งเต้านมจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ จากข้อมูลในปี 2018 พบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 2 หมื่นรายในขณะที่อัตราการเสียชีวิตสูงถึง 5 พันคน และยังพบอีกว่ามะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 2 ของมะเร็งในผู้หญิงไทย และมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (1)



รูปที่ 1 แสดงอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมทั่วโลก ในปี 2018 (1)

กลไกการเกิดมะเร็งเต้านม

การเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) เป็นกระบวนการที่มีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้องทำให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม (genetic alteration) ทั้งในระดับยีน (genetic) และระดับเหนือยีน (epigenetic) จนกระทั่งเซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยพบความผิดปกติที่กระบวนการควบคุมการเจริญเติบโต (proliferation) การพัฒนาให้มีความจำเพาะของเซลล์ (differentiation) หรือการเข้าสู่ความตายของเซลล์ (senescence and apoptosis) เป็นต้น (22)

ชนิดของมะเร็งเต้านม

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่มีความซับซ้อนและมีคุณสมบัติแตกต่างกันในแต่ละชนิด ซึ่งแบ่งตามพยาธิวิทยาจากการย้อม immunohistochemistry ได้ 3 ชนิด (23) ดังนี้

1. เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน และ/หรือตัวรับโปรเจสเตอโรน (estrogen receptor (ER) and/or progesterone receptor (PR) positive) พบได้ประมาณร้อยละ 75 โดยมีการพยากรณ์ของโรคดีที่สุดและตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน (adjuvant anti-hormonal therapy) (24-26) โดยมะเร็งเต้านมชนิดนี้มีการแบ่งการตรวจ gene expression profile ได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

1.1 กลุ่มลูมินัล เอ (luminal A) เป็นกลุ่มที่มีตัวรับเอสโตรเจน และตัวรับโปรเจสเตอโรนในระดับสูง พบประมาณร้อยละ 50-60 ซึ่งในกลุ่มนี้มีพยากรณ์โรคดีที่สุด (27)

1.2 กลุ่มลูมินัล บี (luminal B) เป็นกลุ่มที่มีตัวรับเอสโตรเจน และตัวรับโปรเจสเตอโรนในระดับต่ำ และมีการแสดงออกของตัวรับเฮอร์ทู (HER2 positive) พบประมาณร้อยละ 15-20 ซึ่งมีการพยากรณ์ที่แย่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มลูมินัล เอ เนื่องจากตัวรับเฮอร์ทู เป็นยีนที่ส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง (oncogene) มากขึ้น (27)

2. กลุ่มเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอร์ทู (HER2/ErbB2 positive) เท่านั้น พบประมาณร้อยละ 20 ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด โดยมีการดำเนินโรครุนแรงและการพยากรณ์ของโรคแยกว่ากลุ่มที่ไม่มี HER2/ErbB2 receptor (27)

3. กลุ่มเซลล์มะเร็งที่ไม่พบการแสดงออกทั้งตัวรับเอสโตรเจน ตัวรับโปรเจสเตอโรน และตัวรับเฮอร์ทู หรือเรียกว่า ทริปเปิลเนกาติฟ (triple-negative breast cancer) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 15

ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด ถือเป็นกลุ่มที่มีการพยากรณ์ของโรคที่แย่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น (23-27)

ระยะของโรคมะเร็งเต้านม

การพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจะขึ้นอยู่กับระยะของโรค ซึ่งปัจจุบันจะแบ่งระยะของโรคตามระบบ American Joint Committee on Cancer (AJCC) (28) โดยแบ่งตาม

1. T- tumor size หรือขนาดของก้อนมะเร็ง กำหนดจาก ขนาดก้อน จำนวนก้อน และตำแหน่งของก้อนมะเร็ง แบ่งได้เป็น 4 ระยะคือ T1-4
2. N- lymph node การลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง กำหนดจากจำนวน และตำแหน่งต่อมน้ำเหลืองที่มะเร็งลุกลาม แบ่งได้เป็น 3 ระยะย่อยคือ N1-3
3. M- metastasis การแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น แบ่งได้เป็น 2 ระยะคือ M0 คือไม่มีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น และ M1 คือมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น

เรียกระบบนี้ว่า TNM staging ดังแสดงในตารางที่ 1 (29)

ตารางที่ 1 แสดงระยะของมะเร็งเต้านมตามการจัดกลุ่มของ American Joint Committee on Cancer (AJCC) (28)

Anatomic stage	Prognostic groups		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIC	T4	N2	M0
	Any T	N3	M0
IV	Any T	Any N	M1

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งมะเร็งเต้านมได้เป็นระยะเริ่มต้น และระยะลุกลาม ในระยะเริ่มต้นจะครอบคลุม anatomical stage 0-I ก่อนมะเร็งจะมีขนาดเล็ก และพบการแพร่กระจายเฉพาะต่อมน้ำเหลืองบริเวณใต้รักแร้ ผู้ป่วยที่ตรวจพบในระยะเริ่มต้นมักจะมีการพยากรณ์โรคที่ดี และมีอัตราการรอดชีวิตในช่วง 5 ปี ประมาณร้อยละ 90 สำหรับมะเร็งเต้านมระยะลุกลามจะครอบคลุม anatomical stage II ขึ้นไป ก่อนมะเร็งจะมีขนาดใหญ่ขึ้นจนสามารถคลำพบได้ และมักพบการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ผู้ป่วยที่ตรวจพบในระยะลุกลามมักจะมีการพยากรณ์โรคไม่ดี และมีอัตราการรอดชีวิตในช่วง 5 ปีประมาณร้อยละ 50 (28)

พยาธิกำเนิดและปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งเต้านม

พยาธิกำเนิดของมะเร็งเต้านมจะขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอก (29)

1. ปัจจัยภายใน (intrinsic factors) เป็นปัจจัยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ได้แก่ อายุ เพศ ฮอร์โมน หรือพันธุกรรม โดยโรคมะเร็งเต้านมมักพบในเพศหญิงวัยหมดประจำเดือนอายุเฉลี่ยระหว่าง 40-59 ปี และจะตรวจพบตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็ง ซึ่งเกิดจากการสะสมของฮอร์โมนจึงแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน เพศ และอายุต่างมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง (30) นอกจากนี้พันธุกรรมยังเป็นปัจจัยภายในที่สำคัญ โดยพบว่าผู้ป่วยกว่าร้อยละ 40 มีการกลายพันธุ์ของ *P53* และร้อยละ 10 พบการกลายพันธุ์ของ *PTEN* และยังพบการกลายพันธุ์ของ *Breast cancer 1 (BRCA1)*, *Breast cancer 2 (BRCA2)* ในผู้ป่วยร้อยละ 2-3 ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้อีกด้วย (29)
2. ปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สามารถปรับเปลี่ยนได้ ได้แก่ พฤติกรรมการบริโภคอาหาร ภาวะอ้วน และการดื่มแอลกอฮอล์ โดยปัจจัยเหล่านี้อาจส่งเสริมให้เซลล์ในต่อมน้ำนมเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้องอกได้ (29)

ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen hormone)

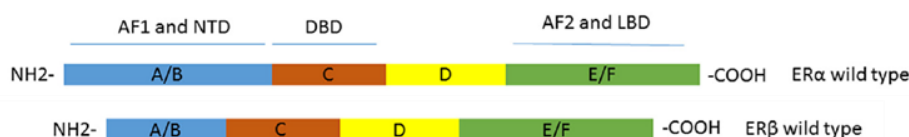
เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะพัฒนาการทางเพศในเพศหญิง ซึ่งถูกสร้างจากรังไข่และมักพบในรูปแบบ 17β -estradiol (E_2) โดยหลังเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อไปควบคุมการทำงานของอวัยวะเป้าหมาย (31) เอสโตรเจนสามารถออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งตัวรับของเอสโตรเจนนั้นเป็น transcription factors ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมขบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ตัวรับเอสโตรเจน (Estrogen receptor, ER)

ตัวรับเอสโตรเจนจัดอยู่ในกลุ่ม nuclear receptor ทำหน้าที่เป็น transcription factor แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ER- α (ER-alpha) และ ER- β (ER-beta) ER α พบในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ มดลูกและรังไข่ เต้านม ไต กระดูก เนื้อเยื่อไขมัน และตับ ส่วน ER- β พบได้ในรังไข่ อัณฑะ ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบประสาทส่วนปลาย เยื่อหุ้มหลอดเลือด กล้ามเนื้อเรียบ ปอด ต่อมลูกหมาก เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าการลดลงหรือการหายไปของ ER นั้นอาจสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือความผิดปกติของร่างกายได้ (32)

โครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจน

ตัวรับเอสโตรเจนทั้ง ER- α (ER-alpha) และ ER- β (ER-beta) ER α ถูกสร้างขึ้นจากยีนที่แตกต่างกัน โดย ER- α สร้างจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ตำแหน่ง q25.1 (6q25.1) และ ER- β สร้างจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14 ตำแหน่ง q23.2 (14q23.2) (30) แต่โครงสร้างของตัวรับทั้งสองชนิดนี้ยังมีความคล้ายคลึงกันซึ่งประกอบด้วย 6 domain คือ A-F ส่วนปลายสุดเรียกว่า F-domain จะอยู่ติดกับ ligand binding domain หรือ E-domain ในบริเวณนี้จะเป็นบริเวณที่ทำให้ตัวรับเกิด dimerization นอกจากนี้บริเวณนี้ยังมี domain ที่เรียกว่า activator function-2 (AF-2) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้น promoter elements บนสาย DNA ได้ D-domain จะเป็นบริเวณต่อเชื่อมที่คั่นกลางระหว่าง E-domain และ C-domain ใน C-domain จะเป็นบริเวณที่มี DNA binding domain ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันมาก ในตัวรับเอสโตรเจนทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับ estrogen response elements บน DNA ได้ดีพอ ๆ กัน ในส่วนปลายทางด้าน NH₂-terminus จะเป็นบริเวณที่มี A-domain และ B-domain ในบริเวณนี้จะมี AF1-domain ซึ่งมีหน้าที่ในการกระตุ้นหรือยับยั้งขบวนการ transcription โดยไม่ต้องอาศัยการจับกับ ligand (independent of ligand binding) (32, 33) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวรับเอสโตรเจน (32, 33)

กลไกการทำงานของตัวรับเอสโตรเจน

การทำงานของตัวรับเอสโตรเจนประกอบไปด้วย 2 กลไก ดังนี้

1. Ligand - dependent pathway ซึ่งจะทำงานโดยการเข้าคู่กัน (homodimerization) ของฮอร์โมนเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจน ซึ่งเมื่อตัวรับเอสโตรเจนเข้าคู่กันแล้วเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส โดยไปจับบน estrogen response element (ERE) ซึ่งอยู่ในบริเวณ promoter ของ ER-targeted gene และมี การ recruit ER-co-activator เช่น Nuclear receptor coactivator 3 (NCOA3) จากนั้นจะเกิดการ transcription ของยีนเป้าหมายของเอสโตรเจน เช่น Cyclin D 1, c-myc ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ (32, 34)
2. Ligand - independent pathway ทำงานโดย ER จะถูกกระตุ้นด้วย ERK ซึ่งเป็นโปรตีนใน MAPK pathway ส่งผลให้เกิดการ phosphorylate ของ ER เมื่อ ER ถูกกระตุ้นแล้วจะเคลื่อนเข้าสู่ nucleus และ เกิดการ transcription ของยีนเป้าหมายเช่นเดียวกันโดยไม่ต้องอาศัยการจับของ ligand กับตัวรับซึ่งกลไกการทำงานแบบ Ligand - independent pathway นี้เป็นกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาต้านฮอร์โมนได้ (32, 34)

ER coregulator protein

ในปี 1998 Lavinsky และคณะ รายงานว่า การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมากของ ER co-activators เช่น nuclear receptor coactivator 3 (NCOA3) หรือ steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) หรือ amplified in breast cancer 1 (AIB1) สามารถเพิ่มฤทธิ์ agonist ของ estrogen ใน เซลล์มะเร็ง ซึ่งทำให้เกิดการดื้อต่อยา tamoxifen ได้ (35) โดยการเพิ่มขึ้นของ ER co-activators นี้จะไปกระตุ้นกระบวนการ transcription เพื่อให้เซลล์มะเร็งต้านมเจริญเติบโตได้ โดยฮอร์โมนเอสโตรเจนจับกับตัวรับเอสโตรเจนที่บริเวณ hydrophobic pocket จะทำให้ helix 12 (H12) เลื่อนมาปิดบริเวณที่มีการจับของฮอร์โมนเอสโตรเจนกับตัวรับ ทำให้การจับเสถียรยิ่งขึ้นและแสดงส่วน LXXL motif เพื่อให้ coactivator เข้ามาจับและเกิดการ transcription ดังที่กล่าวมาข้างต้น (36)

จากการศึกษาของ Sakunrangsit และคณะ ในปี 2020 พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน tamoxifen ชนิด MCF7/LCC9 มีการแสดงออกของ Co-activator ได้แก่ NCOA3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ไม่ดื้อยา MCF-7 (17) และการศึกษาทางคลินิกของ Burandt และคณะ ในปี 2013 พบการแสดงออกของ NCOA3 สูงถึงร้อยละ 60 ในก้อนมะเร็งเต้านม โดยสัมพันธ์กับการพยากรณ์ของโรคที่แย่งลง (37)

นอกจากการเพิ่มขึ้นของ Co-activator ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาต้านฮอร์โมนแล้ว การลดการแสดงออกของ co-repressor ได้แก่ nuclear receptor co-repressor 1 (NCOR1) เกี่ยวข้องกับการทำงานของ histone deacetylase complex (HDAC) ส่งผลให้เกิด chromatin condensation (38) ซึ่ง co-repressor ทำงานโดยการเข้าจับที่ ยีนเป้าหมายของเอสโตรเจนตรงตำแหน่ง promoter ส่งผลต่อการลดการ transcription และการแสดงออกของ gene ที่มีผลเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (39)

แนวทางการรักษา

ในปัจจุบันการรักษามะเร็งเต้านมโดยทั่วไปจะมีทั้งหมด 5 วิธี คือ การผ่าตัด การใช้รังสีรักษา การให้ยาต้านฮอร์โมน การให้เคมีบำบัด และการรักษาแบบมุ่งเป้า ซึ่งการผ่าตัดจะเป็นวิธีการรักษาหลักของมะเร็งเต้านม ร่วมกับการใช้รังสีรักษา การให้ยาต้านฮอร์โมน และการให้เคมีบำบัดเพื่อเสริมการรักษา โดยจะพิจารณาจากชนิดของมะเร็งเต้านม และระยะการเป็นโรค นอกจากนี้ยังมีการพิจารณาให้การรักษาแบบมุ่งเป้าในผู้ป่วยบางรายที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เหมาะสม (40)

ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอร์ทูจะสามารถใช้การรักษาแบบมุ่งเป้าได้ เช่น trastuzumab หรือ lapatinib การรักษาแบบมุ่งเป้าจะมีกลไกการออกฤทธิ์โดยการจับโปรตีนต่าง ๆ ใน downstream signaling ของ HER2 pathway และส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งการรักษาแบบมุ่งเป้าถือว่าเป็นการรักษาที่มีประสิทธิภาพและมีผลข้างเคียงต่ำ แต่มีข้อจำกัดในการรักษาได้เพียงผู้ป่วยบางราย และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง (41)

ฮอร์โมนบำบัด (Anti-hormonal therapy) มหาวิทยาลัย

การเจริญเติบโต และการทำงานของเต้านมมีความสัมพันธ์กับการทำงานของฮอร์โมนเพศ โดยฮอร์โมนที่มีความสำคัญกับการทำงานของเต้านมคือ เอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรนซึ่งจะทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการสร้างและความสมบูรณ์ของทั้งท่อน้ำนมและถุงน้ำนม (42) และฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดมีความเกี่ยวข้องกับกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งอีกด้วย (43)

ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ตรวจพบว่ามีแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนจะสามารถให้การรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน หรือฮอร์โมนบำบัดได้ โดยกลไกของยาต้านฮอร์โมนจะทำงานโดยการลดยับยั้ง หรือขัดขวางการจับกันของเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1. Selective estrogen receptor modulators (SERMs)

ยาในกลุ่ม SERMs ได้แก่ tamoxifen และ raloxifene ทำงานโดยไปแย่งจับที่ตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ทั้งชนิด α และ β ของเซลล์เต้านม ทำให้เอสโตรเจนไม่สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนและออกฤทธิ์ (estrogen antagonist) จึงส่งผลต่อการลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง **รูปที่ 3** อีกทั้งยาในกลุ่มนี้ สามารถช่วยเพิ่มการทำงานของเอสโตรเจนที่เซลล์เยื่อบุมดลูก กระดูก และระบบหัวใจและหลอดเลือดอีกด้วย (7) จากรายงานผลการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน พบว่า tamoxifen สามารถลดอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรค (recurrence) ประมาณร้อยละ 50 (44)

นอกจากนี้ยาในกลุ่ม SERMs เช่น raloxifene ยังช่วยลดอัตราการหักของกระดูกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่มีภาวะกระดูกพรุนถึงร้อยละ 30 ผลข้างเคียงทำให้เกิดอาการคล้ายกับอาการที่เกิดขึ้นเมื่อหมดประจำเดือน เช่น ร้อนวูบวาบ (hot flush) และปวดขา (leg cramps) (45)

2. Selective estrogen-receptor down-regulators (SERDs)

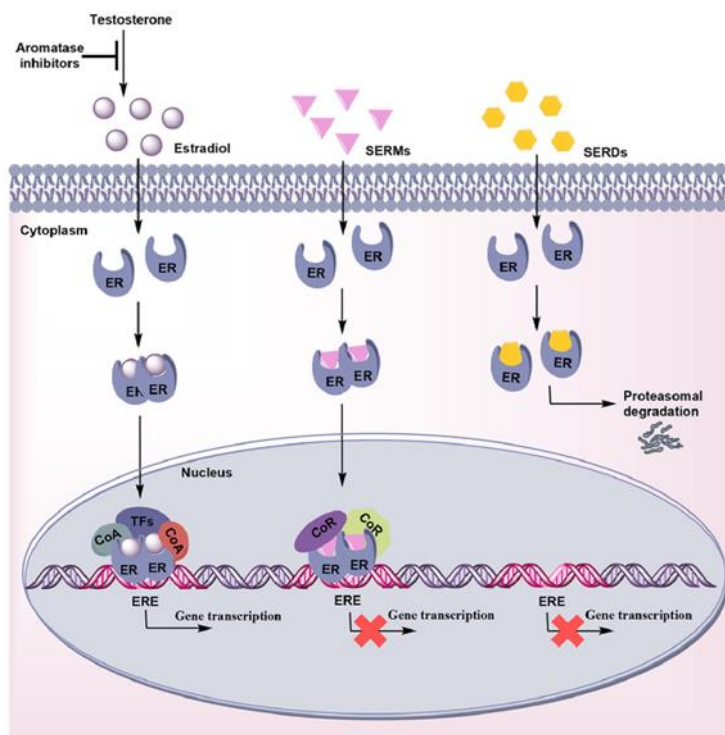
Fulvestrant เป็นยาในกลุ่ม SERDs ออกฤทธิ์โดยขัดขวางการจับกันระหว่างเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจน เช่นเดียวกับ tamoxifen แต่หลังจากจับกับตัวรับเอสโตรเจนแล้ว fulvestrant จะทำให้ตัวรับเอสโตรเจนไม่สามารถทำงานได้อีก Fulvestrant จึงมักใช้ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่ไม่สามารถรักษาด้วยยาในกลุ่ม SERMs หรือ Aromatase inhibitors (46)

3. Aromatase inhibitors (AIs)

ปกติเอนไซม์อโรมาเตส (Aromatase) จะพบอยู่ในเซลล์ไขมัน เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์มะเร็งเต้านม มีหน้าที่เปลี่ยนแอนโดรเจนเป็นเอสโตรเจน ซึ่งยาในกลุ่ม Aromatase inhibitors ได้ถูกพัฒนาในรุ่นที่ 3 (third generation) ได้แก่ letrozole, anastrozole และ exemestane โดยการทำงานแตกต่างจากยา tamoxifen คือการยับยั้งการสร้าง estrogen โดยไม่มีผลในการกระตุ้นการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน (no partial estrogen agonist activity) (47)

จากการศึกษาพบว่า AIs รุ่นที่ 3 ทั้งหมด สามารถยับยั้งกระบวนการ aromatization ได้ดีมาก อย่างไรก็ตามการใช้ยา AIs เพียงอย่างเดียวยังคงเป็นข้อห้ามในหญิงที่ยังไม่หมดประจำเดือน เนื่องจากส่งผลให้มีการสร้างเอสโตรเจนมากขึ้นจากการทำงานของ

ต่อมใต้สมองเนื่องจากไปกระตุ้นปฏิกิริยาย้อนกลับของการสร้างฮอร์โมน (negative feedback) (48)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงการออกฤทธิ์ของ anti-hormonal therapy drugs (46)

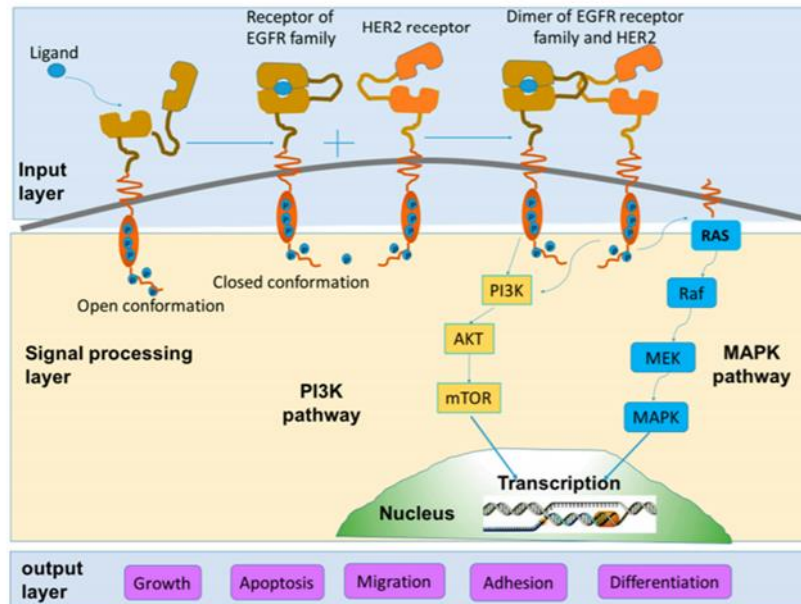
การดื้อยาต้านฮอร์โมน (Anti-hormonal resistance)

การรักษาโดยการให้ยาต้านฮอร์โมนถือว่าการรักษาพื้นฐานในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน แต่ก็พบว่าผู้ป่วยในระยะลุกลามมากถึงร้อยละ 50 มีการตอบสนองต่อยาต้านฮอร์โมนน้อยลง และในผู้ป่วยระยะเริ่มต้นมีการตอบสนองต่อยาสูงถึงร้อยละ 90 แต่ก็พบการกลับมาเป็นซ้ำได้มากถึงร้อยละ 30 (49) โดยการดื้อยาต้านฮอร์โมนโดยปัจจัยภายใน (de novo or intrinsic resistance) หรือเกิดขึ้นในภายหลังเนื่องจากกลไกการปกป้องตนเองของเซลล์มะเร็ง (acquired resistance)

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

Human Epidermal Growth Factor (HER) เป็นหนึ่งใน epithelial tyrosine kinases โดย human epidermal growth factor receptor (HER) มีทั้งหมด 4 ชนิด คือ HER-1, HER-2, HER-3, และ HER-4 หรืออาจเรียกว่า ErbB1, ErbB2, ErbB3 และ ErbB4 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งเต้านม โดยมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต การมีชีวิตรอด หรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์มะเร็งจากเดิมเป็นเซลล์ epithelium ให้มีลักษณะคล้ายเซลล์ mesenchyme (51)

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมประมาณร้อยละ 20-25 มีการแสดงออกของ HER2/neu หรือ ErbB2 ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้มีการดำเนินโรคที่รุนแรงและการพยากรณ์ของโรคไม่ดี โดยกลไกการทำงานของตัวรับฮอร์โมนจะเริ่มจากการที่ growth factor มาจับที่ extracellular domain จากนั้นตัวรับฮอร์โมนจะเข้าคู่กันซึ่งอาจเกิดได้ทั้งแบบ homodimerization หรือ heterodimerization และเกิดกระบวนการ autophosphorylation เพื่อกระตุ้น signaling pathways ทั้ง PI3K และ mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (51) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการทำงานของ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (51)

Downstream signaling ของเฮอรัท

• กลไกของ PI3K pathway

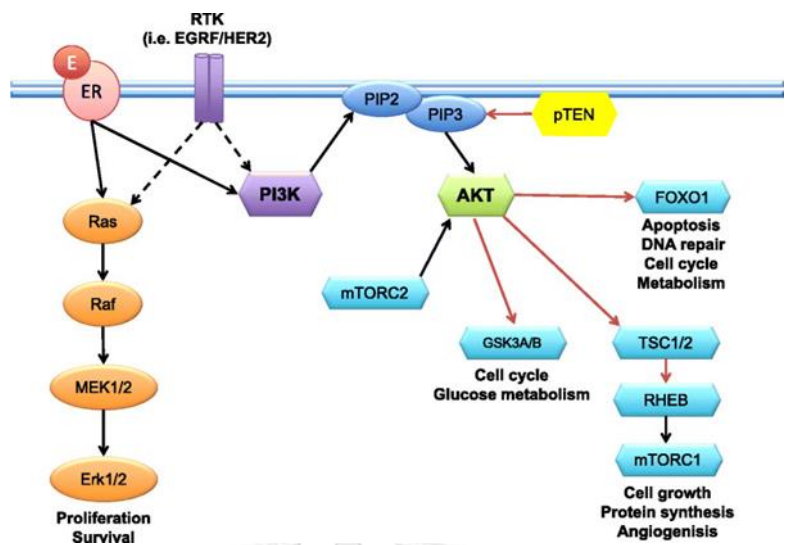
เมื่อตัวรับเฮอรัทได้รับการกระตุ้น phosphatidylinositol-3,4,5-tris phosphate (PI3K) จะถูกชักนำให้มาจับบริเวณ intracellular domain และทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) เปลี่ยนไปเป็น Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) จากนั้น PIP3 จะทำหน้าที่ส่งสัญญาณต่อไปโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง threonine 308 และ serine 473 ของ AKT หลังจากได้รับการกระตุ้น AKT จะทำหน้าที่กระตุ้นและยับยั้งโปรตีนอื่น ๆ ใน downstream signaling เช่น mTOR หรือ IKB Kinase α (IKK α) ต่อไปจึงส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ (52)

• กลไกของ MAPK pathway

ตัวรับเฮอรัทจะกระตุ้น RAS protein โดยการเปลี่ยน guanosine diphosphate (GDP) ของ RAS ให้เป็น guanosine triphosphate (GTP) จากนั้น RAS จะทำหน้าที่เติมฟอสเฟตให้กับ MAP kinase kinase kinase (RAF) ต่อมา RAF จะเติมฟอสเฟตให้กับ MAP kinase kinase (MEK) จากนั้น MEK จะเติมฟอสเฟตให้กับ MAP kinase (ERK) และ ERK จะทำหน้าที่ activate protein อื่น ๆ ใน downstream signaling เช่น receptor tyrosine kinase (RTK), G protein-coupled receptors และ transcription factor อื่น ๆ ต่อไป ซึ่งจะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ การยึดเกาะและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์รวมถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis ดังแสดงในรูปที่ 6 (51-53) ในโรคมะเร็ง มีหลายกระบวนการที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MAPK pathway ได้ เช่น การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของ chromosome ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับ MAPK pathway เช่น BCR-ABL การกลายพันธุ์ของ cytokine เช่น Fms related tyrosine kinase 3 (Flt-3) และการ overexpression ของ receptors เช่น EGFR เป็นต้น (54) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ MAPK pathway โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ERK ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ใน MAPK super family และถือได้ว่าเป็นโปรตีนสำคัญใน MAPK pathway โดย ERK มีความสามารถในการ phosphorylate โปรตีนได้มากกว่า 160 ชนิด ซึ่งรวมไปถึง transcript factor หลายชนิด เช่น Ets-1, c-Jun, c-Myc และ NF- κ B จะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตที่เร็วขึ้น และมีการรอดชีวิตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกของ MAPK pathway มีผลต่อการดื้อยาต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น 5-FU, doxorubicin และ paclitaxel

ในปัจจุบันมียาหลายชนิดที่สามารถลดการทำงานของ MAPK pathway และใช้เพื่อการรักษาโรคมะเร็งแบบมุ่งเป้าได้ เช่น vemurafenib, dabrafenib และ encorafenib ซึ่งมุ่งเป้าที่ BRAF ยา trametinib และ binimetinib ซึ่งจำเพาะต่อ MEK1/2 cobimetinib ซึ่งมุ่งเป้าที่ MEK1 และ ulixertinib ซึ่งมุ่งเป้าที่ ERK นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงสารประกอบหลายชนิดเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการรักษาเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อยา เช่น สารในกลุ่ม flavonoid, alkaloid และ quinone เป็นต้น

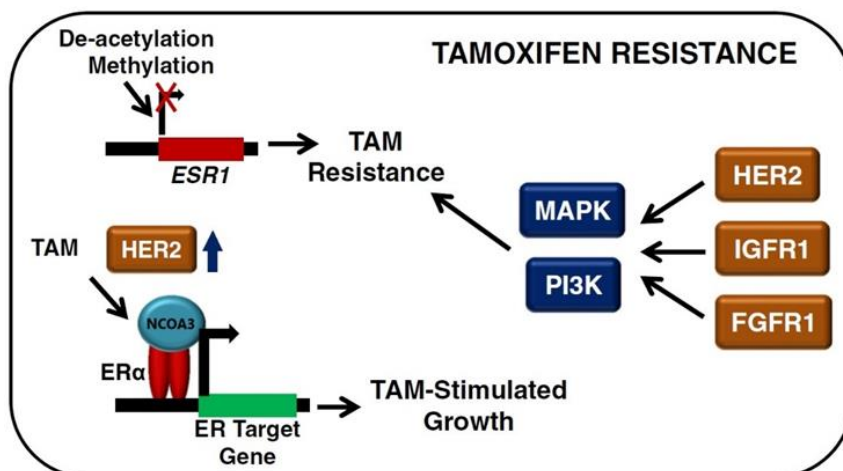
จากการศึกษาของ Kawiak และคณะ ในปี 2019 ซึ่งศึกษาผลของ 3-Chloroplumbagin (ChPL) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม quinone ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-468 พบว่า ChPL สามารถลดระดับโปรตีนของ MEK และ ERK โดยยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตในโปรตีนทั้งสองชนิด และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis (55) นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าของ quinalizarin ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, T47D และ MDA-MB-231 และจากการศึกษาของ Zang และคณะในปี 2019 พบว่า quinalizarin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ผ่าน reactive oxygen species (ROS) และการยับยั้ง MAPK, STAT3 และ NF- κ B signaling pathways (56) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2019 โดยศึกษาผลของ 1,4-naphthoquinone derivatives, 2-(butane-1-sulfinyl)-1,4-naphthoquinone และ 2-(octane-1-sulfinyl)-1,4-naphthoquinone ต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร 8 ชนิด (AGS, MKN 45, NCI N87, SUN 5, KATO 3, YCC 1, YCC 6, YCC 16 and SNU 5) พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านกระบวนการ ROS เพิ่มการแสดงออก p38 และ JNK และลดการแสดงออกของ ERK และ STAT3 (56)



รูปที่ 6 แสดง PI3K/AKT/mTOR and RAS/RAF/MEK/MAPK pathways (52)

HER2 และการดื้อยาต้านฮอร์โมน

Tamoxifen สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ในเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้นของ receptor tyrosine kinases (RTKs) เช่น human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) โดยการกระตุ้น co-activator เช่น nuclear receptor coactivator 3 (NCOA3) จึงส่งผลให้เกิดการ transcription ของยีนเป้าหมายของตัวรับเอสโตรเจน (ER-targeted gene) (17) ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงกลไกการดื้อยา tamoxifen (Tamoxifen Resistance) (7)

การเพิ่มขึ้นของ HER2 ในเซลล์ที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน

การศึกษาในเซลล์ที่ดื้อยา Tamoxifen (MCF-7/TAM) พบการเพิ่มขึ้นของ EGFR HER2 และ ER- α 36 เมื่อยับยั้ง HER2 ด้วย lapatinib หรือยับยั้ง ER- α 36 ด้วย brousoflavonol B พบว่าสามารถเพิ่ม Tamoxifen sensitivity ได้ แสดงให้เห็นว่า HER2 และ ER- α 36 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมดื้อยาต้านฮอร์โมน (6)

นอกจากนี้ในการศึกษาก่อนหน้าพบว่า MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 cell line ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (Tamoxifen และ Tamoxifen/Fulvestrant) ตามลำดับ จากการศึกษาการแสดงออกของ *ErbB2* ในเซลล์ดื้อยาต้านฮอร์โมนด้วยวิธี RT-PCR และการศึกษาปริมาณของโปรตีน HER2 ด้วยวิธี western blot พบมีปริมาณโปรตีน HER2 สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ไม่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7 cell line) (17) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ HER2 ซึ่งเป็น receptor tyrosine kinases (RTKs) จึงเป็นกลไกที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน ดังที่กล่าวมาข้างต้น

ในปี 2005 Peterson และคณะ ศึกษาการดื้อยา Tamoxifen และการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนในหนูที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งเต้านมด้วยการให้รังสี (Ionizing Radiation) พบว่า หนูที่เป็นมะเร็งเต้านมและได้รับยา tamoxifen เป็นระยะเวลาานาน จะพบการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

ดังนั้นการศึกษานี้อาจแสดงให้เห็นว่าการดื้อยา tamoxifen ถูกเหนี่ยวนำจาก HER2 pathway และสัมพันธ์กับการล้มเหลวจากการใช้ยา tamoxifen ใน rat mammary carcinoma model (57)

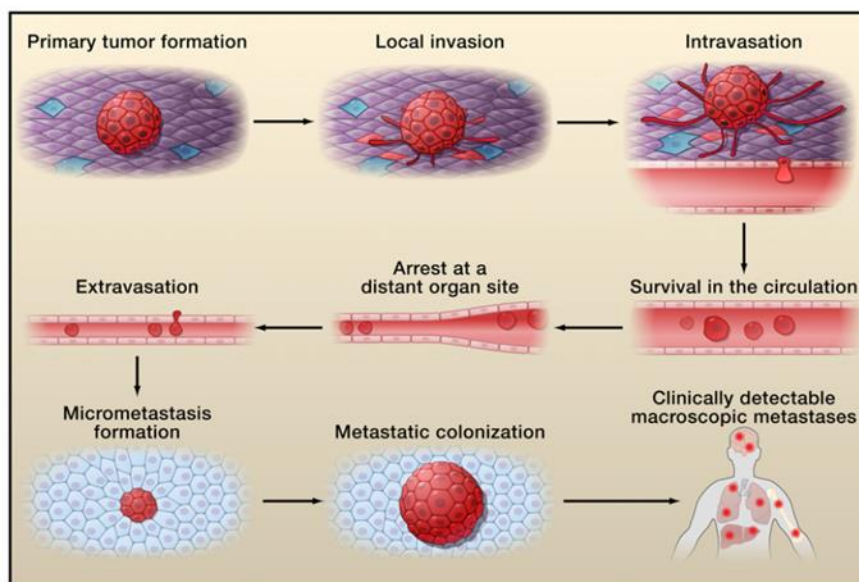
ในปี 2015 Moey และคณะ รายงานประวัติผู้ป่วย invasive ductal breast carcinoma (IDC) ชาว African วัย 49 ปี และมีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ER+/PR-/HER2- ได้รับการรักษาด้วย anti-hormonal therapy (Tamoxifen) เป็นระยะเวลาไม่นาน ต่อมาพบว่าก้อนมะเร็งไม่ตอบสนองต่อยาต้านฮอร์โมน เมื่อตรวจตัวรับฮอร์โมนอีกครั้งพบการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเพิ่มขึ้น (HER2 receptor) และพบการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนลดลง (ER) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปที่ตับและสมอง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของตัวรับฮอร์โมนอาจเกี่ยวข้องกับดื้อยาต้านฮอร์โมน การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (58)

การลุกลามและแพร่กระจายของมะเร็ง (Invasion and Metastasis)

เซลล์มะเร็งในระยะลุกลามจะพัฒนาความสามารถที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย โดยเริ่มจากเซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการ epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) ทำให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่และลุกลามมากขึ้น เซลล์มะเร็งจะลุกลามเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตหรือระบบน้ำเหลืองและเจริญเติบโตในอวัยวะใหม่ โดยขั้นตอนการแพร่กระจายของมะเร็ง (invasion-metastasis cascade) (59) ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนี้

1. เซลล์มะเร็งที่ผ่านกระบวนการ EMT สามารถเคลื่อนที่จากก้อนมะเร็ง (primary tumor) ผ่าน extracellular matrix (ECM) ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลาม (invasion) และหลุดออกจากอวัยวะต้นกำเนิดได้
2. เมื่อเซลล์มะเร็งหลุดจากก้อนมะเร็งจะเข้าสู่หลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลือง (intravasation) แล้วเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือด
3. เมื่อมีการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมในเนื้อเยื่อที่เหมาะสม เซลล์มะเร็งจะเคลื่อนตัวออกจากผนังหลอดเลือด (extravasation) ผ่านเข้าไปยังอวัยวะใหม่ โดยมะเร็งเต้านมมักจะกระจายไป กระจุกปอด ตับ และสมอง
4. เมื่อมีการเตรียมสภาพแวดล้อมที่บริเวณอวัยวะใหม่แล้ว (pre-metastatic niche) จากนั้นเซลล์มะเร็งจะเกิดการ colonization โดยเซลล์มะเร็งจะมีความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่

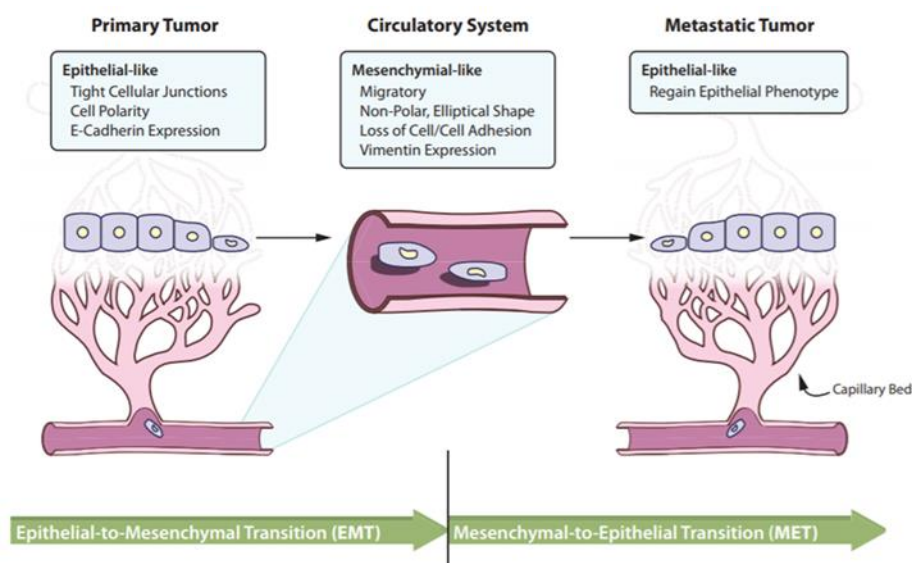
(angiogenesis) และหลังสารกระตุ้นการสร้างหลอดเลือด (proangiogenic factor) และเติบโตจนเป็นก้อนมะเร็งตามอวัยวะใหม่ที่ลุกลามไป (metastasis)



รูปที่ 8 แสดงกระบวนการบุกรุกและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (59)

กระบวนการ epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) และการลุกลามของมะเร็ง (Invasion)

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) เป็นกระบวนการสำคัญในการลุกลามของมะเร็ง (metastasis) คือกระบวนการที่ epithelial cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและคุณสมบัติจนมีความคล้ายคลึงกับ mesenchymal cell โดยเซลล์มะเร็งจะมีความสามารถในการยึดเกาะลดลง จึงมีความสามารถในการเคลื่อนที่ ลุกลาม และแพร่กระจายมากขึ้น โดยการกระตุ้นกระบวนการ EMT เกิดจากการกระตุ้นจากหลาย pathway เช่น HER2 signaling pathway หรือ integrin pathway (50) นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ mesenchymal markers ได้แก่ snail, slug, twist, fibronectin, vimentin และ N-cadherin และการลดลงของ epithelial markers เช่น cytokeratins และ E-cadherin (60, 61) ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงกระบวนการ Epithelial-to-mesenchymal transition (61)

การกระตุ้น HER2 signaling pathway เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ Slug ซึ่งเป็น transcription factor ของ mesenchymal markers นำไปสู่กระบวนการ EMT จากการศึกษาของ Carpenter และคณะ ใน MCF-7/HER2 และ SKBR3 cell line พบว่าการกระตุ้น HER2 ทำให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ของ AKT และ heat shock factor-1 (HSF-1) โดย HSF-1 จะจับกับ slug promoter บริเวณ binding sites ทำให้เกิดกระบวนการ transcription โดยไม่อาศัย heat shock protein ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ slug ในเซลล์มะเร็งเต้านม (62)

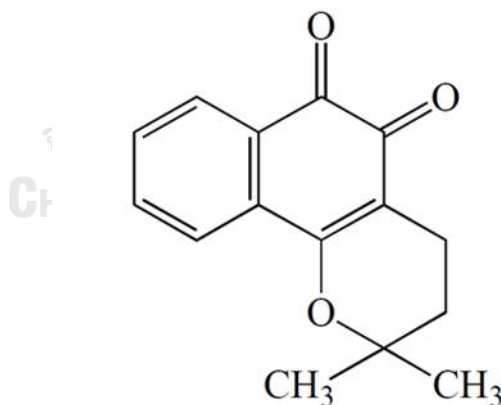
นอกจากนี้ HER2 signaling pathway ยังสามารถส่งสัญญาณผ่าน MAPK pathway เพื่อกระตุ้นการทำงานของ Activator protein 1 (AP-1) ที่จะทำหน้าที่ช่วยในการ transcription ของ Snail โดย Snail เป็น transcription factor ที่มีความสามารถในการลด E-cadherin ซึ่งเป็น epithelial marker และนำไปสู่กระบวนการ EMT (63)

β -lapachone (β -lap)

β -lapachone (β -lap) เป็นสารกลุ่ม orthonaphthoquinone ที่แยกได้จากส่วนเปลือกของต้น lapacho (*Tabebuia avellanedae*) ในอเมริกาใต้ (64) โดย β -lap มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial activity) ต้านเชื้อรา (anti-fungal activity) ต้านปรสิต (anti-parasitic activity) ต้านไวรัส (anti-viral activity) และต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer activity) จากการรายงานพบว่าสาร β -lap สามารถต้านมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) เป็นต้น (65)

สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร β -lapachone

β -lap เป็นสารประกอบ tricyclic pyrano-orthonaphthoquinone (3,4-dihydro-2, 2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b] pyran-5, 6- dione) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{14}O_3$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 243.3 g/mol β -lap เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ สามารถละลายได้ในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (lipophilic) โดยปกติมักจะใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ในการทำละลาย และจะมีค่า pH ไม่คงที่เมื่ออยู่ในอากาศหรือน้ำ นอกจากนี้ β -lap ยังถูก reduced ด้วย NAD(P) ให้กลายเป็น hydroquinone และ semiquinone (66) ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ β -lapachone (66)

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ β -lapachone

β -lap เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone ออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของเอนไซม์ NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO1) ที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidoreductase และเกิด oxidative stress ซึ่ง NQO1 มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ 5-200 เท่า จึงทำให้ β -lap มีคุณสมบัติเป็น anti-cancer agent (16)

การศึกษาใน non-small-cell lung cancer พบว่า β -lap สามารถชักนำให้เกิด cell death ใน NQO1+ A549 cells ได้มากกว่าในเซลล์ปกติ (MIR-90) และเซลล์ fibroblast ซึ่งมีการแสดงออกของ NQO1 ต่ำกว่า (67) และยังมีการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 พบว่า β -lap มีฤทธิ์ anti-cancer โดยผ่านการทำงานของ NQO1 เช่นกัน (16)

Cell cycle arrest

β -lap มีฤทธิ์ที่ทำให้เกิด cell cycle arrest ทั้งใน growing และ quiescent cells โดย stage ของ cell cycle arrest จะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ เช่น

- เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480, SW620 และ DLD 1) β -lap จะเพิ่ม S phase-specific cyclin A, S/G2-phase-specific cyclin A and B1 และลด G2/M phase-specific cyclin B 1 และ associated kinase cdc2 ซึ่งจะทำให้เกิด S phase arrest (68)
- เซลล์มะเร็งตับ (HepA2 cell line) β -lap ยับยั้งการสร้าง DNA ใน S phase และทำให้เกิดการบวมของไมโทคอนเดรีย (swollen mitochondria) รวมถึงเพิ่ม peroxisome-like granule (69)
- เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell line) β -lap ชักนำให้เกิดการแสดงออกของ cyclin A, B1 และ E protein อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิด G0/G1 และ G1/S phase arrest และยังส่งผลให้เกิด dephosphorylation ของ Rb protein อีกด้วย (70)

การชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS)

มีการศึกษาพบว่า β -lapachone ในความเข้มข้นสูง (มากกว่า 10 μ M ใน cell culture) จะส่งผลให้ ROS เพิ่มขึ้นจากการเกิด oxidative stress โดยการเกิด oxidative stress เกิดได้จาก cyclization-redox ของสารกลุ่ม quinones (65)

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารกลุ่ม naphthoquinones อื่น ๆ

- Biflorin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3 ผ่านการยับยั้ง EGFR signaling pathway (14)
- Ramentaceone มีความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านม BT474, SKBR-3, MCF-7 และ MDA-MB-231 ให้เกิดกระบวนการ apoptosis โดยการยับยั้ง PI3K/Akt signaling pathway (13)
- Shikonin สามารถชักนำเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7, SKBR-3 และ MDA-MB-231 ให้เกิด cell cycle arrest และกระบวนการ apoptosis โดยการยับยั้ง MAPK signaling pathway (15)
- Plumbagin สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3 และ BT474 เกิดกระบวนการ apoptosis โดยการลด Bcl-2 protein (71)

ผลการศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ในสัตว์ทดลอง

- Yang และคณะ ในปี 2017 รายงานว่า β -lapachone มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งในหนูทดลอง (nude mice) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจาก seed เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 breast cancer cells นอกจากนี้ β -lapachone ความเข้มข้นสูงยังส่งผลเพิ่มการแสดงออกของ E-cadherin และลดการแสดงออกของ Ki-67, vimentin, snail, pAKT, S6 และ 4EBP1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงแสดงให้เห็นว่า β -lapachone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งผ่านการยับยั้งกระบวนการ EMT (16)
- Le และคณะ ในปี 1999 รายงานว่า เมื่อให้ β -lapachone ร่วมกับ taxol ใน xenograft model ของมะเร็งรังไข่ ใน of human ovarian cancer in nude mice พบว่าการให้ β -lapachone เพียงอย่างเดียวสามารถลดจำนวนก้อนมะเร็งได้มากถึงร้อยละ 75 ในขณะที่การ

ให้ taxol เพียงอย่างเดียวสามารถลดจำนวนก้อนมะเร็งได้เพียงร้อยละ 60 ในขณะที่เมื่อให้ β -lapachone ร่วมกับ taxol พบว่าจำนวนก้อนลดลงจนเห็นเพียงร่องรอยของแผลเป็น fibrotic scarring (72)

ความปลอดภัยของ β -lapachone

- การศึกษา cell line (*in vitro study*)

การศึกษาความเป็นพิษของ β -lapachone พบว่า β -lapachone ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 4 μ M ไม่เป็นพิษต่อ normal human fibroblasts (GM3652) (73) และที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 μ M ไม่เป็นพิษต่อ human dermal fibroblasts (74) โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 80 และ 90 ตามลำดับ (73)

ดังนั้นจากการศึกษา *in vitro* β -lapachone มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงจึงมีความปลอดภัยในเซลล์ปกติ

- การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo study*)

จากการศึกษาของ De santana และคณะในปี 1968 พบว่าค่า LD₅₀ ของ β -lapachone ใน Wistar rat มีค่าเท่ากับ 80 mg/kg ขณะที่ใน albino rats มีค่าระหว่าง 50-60 mg/kg (66)

การศึกษาพิษวิทยาของ β -lapachone ในหนู Wistar ที่ตั้งครรภ์และไม่ได้ตั้งครรภ์ พบว่าเมื่อให้ β -lapachone ที่ความเข้มข้น 40, 80 และ 160 mg/kg ในหนู Wistar ที่ตั้งครรภ์ส่งผลให้ตัวอ่อนมีความพิการ เช่น ไม่มีหาง โดยเฉพาะในความเข้มข้นสูงคือ 160 mg/kg จะพบความพิการมากที่สุด (66)

การศึกษาในหนู Wistar ทั้งตัวผู้และตัวเมีย โดยให้ β -lapachone ที่ความเข้มข้น 40, 80 และ 160 mg/kg เป็นเวลา 21 วัน ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้น 160 mg/kg ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไขมัน ในขณะที่ตับและไต ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ β -lapachone ความเข้มข้น 40, 80 และ 160 mg/kg ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของ blood chemistry profile เพียงเล็กน้อยในหนู เช่น glutamate pyruvate transaminase (GPT), gamma glutamyl transferase (gamma GT) และ alkaline phosphatase (ALP) และไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของหนูเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (66)

จากการศึกษาความเป็นพิษของ β -lapachone ต่อสัตว์ทดลอง จะเห็นว่าการศึกษาในหนู Wistar ทั้งตัวผู้และตัวเมียพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อม้ามเมื่อให้ β -lapachone ความเข้มข้นสูงสุด และมีการเปลี่ยนแปลง blood chemistry profile ทุกความเข้มข้นแต่ไม่ได้ทำให้หนูเสียชีวิต ขณะที่ศึกษาในหนู Wistar ที่ตั้งครุฑพบความพิการของตัวอ่อนในทุกความเข้มข้น ดังนั้นควรมีความระมัดระวังในการศึกษา β -lapachone ในสัตว์ทดลองที่ตั้งครุฑ (65)

- การศึกษาในคลินิก (clinical trial)

ARQ 761 เป็น Prodrug ของ β -lapachone ที่นำไปศึกษาใน clinical trial phase 1 โดยมีการศึกษาในระบบ 4 การศึกษา ดังนี้

1. ศึกษา ARQ 761 ในผู้ป่วย Advanced solid tumor ที่มีการแสดงออกของ NQO1 สูงรวมทั้งมะเร็งเต้านมจำนวน 42 ราย พบว่า ARQ 761 สัมพันธ์กับผู้ป่วยมะเร็งที่มีการแสดงออกของ NQO1 โดยบริหารยาสูงสุดในขนาด 390 mg/m^2 เข้าเส้นเลือดครั้งละ 2 ชั่วโมง ให้สัปดาห์เว้นสัปดาห์และมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่รุนแรง ได้แก่ ภาวะ anemia และ methemoglobinemia (18)
2. ศึกษา ARQ 761 เพียงอย่างเดียว ในผู้ป่วย Advanced solid tumor จำนวน 27 คน เริ่มต้นการศึกษาเดือนธันวาคม ปี 2011 และสิ้นสุดการศึกษาเดือนมกราคม ปี 2019 โดยมีการบริหารยาดังนี้ (U.S. National Library of Medicine) (19)
 - 2.1 บริหารยาในขนาด 195 mg/m^2 1 ครั้งต่อสัปดาห์
 - 2.2 บริหารยาในขนาด 390 mg/m^2 ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์
 - 2.3 บริหารยาในขนาด 390 mg/m^2 2 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์
 - 2.4 บริหารยาในขนาด 390 mg/m^2 2 สัปดาห์ติดกันและเว้น 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์
3. ศึกษา ARQ 761 ร่วมกับ Gemcitabine และ Nab paclitaxel ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนจำนวน 20 คน เริ่มต้นการศึกษาเดือนมีนาคม ปี 2016 และสิ้นสุดการศึกษาเดือน กรกฎาคม ปี 2021 โดยมีการบริหารยาดังนี้ (U.S. National Library of Medicine) (20)
 - 3.1 การบริหารยาใน Dose level 1
 - บริหารยา ARQ 761 ในขนาด 195 mg/m^2 ในวันที่ 1 และ 15
 - บริหารยา Gemcitabine ในขนาด 290 mg/m^2 ในวันที่ 1 และ 15
 - บริหารยา Nab paclitaxel ในขนาด 390 mg/m^2 ในวันที่ 1 และ 15

3.2 การบริหารยาใน Dose level 2

- บริหารยา ARQ 761 ในขนาด 1000 mg/m² ในวันที่ 1, 8 และ 15
- บริหารยา Gemcitabine ในขนาด 1000 mg/m² ในวันที่ 1, 8 และ 15
- บริหารยา Nab paclitaxel ในขนาด 1000 mg/m² ในวันที่ 1, 8 และ 15

3.3 การบริหารยาใน Dose level 3

- บริหารยา ARQ 761 ในขนาด 125 mg/m² ในวันที่ 1, 8 และ 15
- บริหารยา Nab paclitaxel ในขนาด 125 mg/m² ในวันที่ 1, 8 และ 15

แต่ในขณะนี้ถูกระงับการศึกษาชั่วคราว เนื่องจากต้องศึกษาคุณภาพยาเพิ่มเติม (20)

4. ศึกษา ARQ 761 ร่วมกับ OLAPARIB ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ต่อมน้ำเหลือง จำนวน 40 คน เริ่มต้นการศึกษาเดือนตุลาคม ปี 2018 และสิ้นสุดการศึกษาเดือนสิงหาคม ปี 2023 โดยมีการบริหารยาดังนี้ (U.S. National Library of Medicine) (21)

4.1 บริหารยาโดยฉีด ARQ 761 เข้าเส้นเลือดทุกสัปดาห์

4.2 บริหารยาโดยรับประทาน OLAPARIB วันละ 2 ครั้ง

จากการศึกษาทั้งหมด 4 การศึกษา ปัจจุบันพบความสำเร็จจากการศึกษา ARQ 761 ใน clinical trial phase 1 ในผู้ป่วย Advanced solid tumor ที่มีการแสดงออกของ NQO1 โดยพบผลข้างเคียงได้แก่ ภาวะ anemia และ methemoglobinemia อย่างไรก็ตามอีก 3 การศึกษายังคงอยู่ระหว่างการศึกษาและจะสิ้นสุดตามระยะเวลาที่กล่าวไปข้างต้น

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอว์โมน การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งชนิดที่ดื้อยาต้านฮอว์โมนและมีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเพิ่มขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์ทดสอบ

- เซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัฑู HER-2 overexpressed breast cancer cell lines ที่ใช้ในการศึกษา คือ SKBR3 cells จาก American Type Culture Collection (ATCC)
- เซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนที่ใช้ในการศึกษา คือ tamoxifen-resistant breast cancer cells (MCF-7/LCC2) และ tamoxifen/fulvestrant-resistant breast cancer cells (MCF-7/LCC9) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Robert Clarke (Georgetown University Medical Center, Washington, DC, USA)

สารทดสอบ

- β -lapachone (β -lap) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- Lapatinib (LAP) (tyrosine kinase inhibitor) จากบริษัท Abcam เป็น anti-cancer control ใน เซลล์ SKBR3
- Palbociclib (PAL) (CDK4/6 Inhibitor) จากบริษัท Abcam เป็น anti-cancer control ใน เซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9

สารเคมี

1. Minimum Essential Medium (MEM) Gibco, USA
2. McCoy's 5A Medium Gibco, USA
3. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) Gibco, USA
4. Phosphate buffer solution (PBS)
5. Fetal bovine serum (FBS), Gibco, USA
6. Penicillin/streptomycin, Gibco, USA
7. Amphotericin B, Gibco, USA
8. 0.25% Trypsin-EDTA, Gibco, USA
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma, USA
10. 0.4% trypan blue dye, Sigma, USA

11. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Sigma, USA
12. Growth factor reduced Matrigel® basement membrane matrix, BD Biosciences, USA
13. 3.7% Formaldehyde solution, Sigma, USA
14. Crystal violet dye, Sigma, USA
15. RinoEx™ total RNA isolation solution
16. Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Molekula, UK
17. Ethanol, Merck, Germany
18. Chloroform, Merck, Germany
19. Isopropanol, Merck, Germany
20. Improm-II™ reverse transcription system, Promega, USA
21. Deoxynucleotide (dNTP) solution mix, Vivantis, Malaysia
22. Oligo (dT) 15 primer, Vivantis, Malaysia
23. Recombinant RNasin® RNase inhibitor, Vivantis, Malaysia
24. Sterile phosphate buffer saline; PBS
25. Agarose powder

เครื่องมือและอุปกรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Autoclave **CHULALONGKORN UNIVERSITY**
2. Autopipette, Gilson, USA
3. Biohazard laminar flow hood, Labconco, USA
4. Centrifuge, Alc, UK
5. Microcentrifuge, Hettich zentrifugen, Germany
6. Hemocytometer, Hausser Scientific, Germany
7. Coverslips, Menzel Glaser, Germany
8. Light Microscope, Carl Zeiss, Germany
9. Phase contrast light microscope, Nikon, Japan
10. StepOnePlus Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA

11. Centrifuge tubes, Corning, USA
12. Microcentrifuge tube, Corning, USA
13. Disposable pipette tip, Corning, USA
14. Refrigerators, freezer -80°C
15. 6, 24 and 96-wells plate, Corning, USA
16. T25 tissue culture flasks, Corning, USA
17. pH meter SA 520, Knick, Germany
18. Glass pipette
19. Pipette boy
20. Glass bottle, Brand, USA

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

ทำการศึกษาโดยวิธี MTT assay โดยการใส่สาร 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลือง เมื่อเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตสารจะถูกเปลี่ยนด้วยเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ได้เป็นผลึก formazan crystal ที่มีสีม่วง โดยมีขั้นตอนการทดลอง ดังต่อไปนี้

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ SKBR3, MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ที่ความหนาแน่น 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน McCoy's 5A medium สำหรับ SKBR3 cells และ MEM medium สำหรับ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 cells ลงใน 96 well plate ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง
2. เติม β -lap ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ $10 \mu\text{M}$ โดยมี 0.1% DMSO เป็น negative control และใช้ lapatinib ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ และ palbociclib ความเข้มข้น $25 \mu\text{M}$ เป็น anti-cancer control (เป็นความเข้มข้นที่ IC_{50}) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร $10 \mu\text{L}$ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4. นำส่วน supernatant ออกและเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μ L หลังจากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงของสี MTT (เหลือง) เป็นสี formazan crystal (ม่วง) ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร
5. คำนวณหา % cell viability ของ β -lap ต่อ SKBR3, MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 cells เปรียบเทียบกับ untreated control จากสูตร

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{treated cell}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{untreated cell}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

6. คำนวณหา IC_{50} ของ β -lap จาก % cell viability จากนั้นใช้ค่า IC_{50} ของ β -lap เป็นข้อมูลในการเลือกความเข้มข้นของสาร 3 ความเข้มข้น คือ 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยเลือกจากค่า IC_{50} ของเซลล์และลดความเข้มข้นลง 1 เท่า ตามลำดับ (เพื่อให้เป็น 2-folds dilution) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการยับยั้ง anchorage-independent growth ด้วยวิธี Soft agar เพื่อประเมินการเจริญของเซลล์มะเร็งแบบไร้การยึดเกาะ (anchorage-independent growth) ในระดับหลอดทดลอง

1. เตรียม 1.2% agar โดยการชั่ง agar powder จำนวน 1.2 g ผสมกับน้ำกลั่น (Deionized water) คนให้เข้ากันแล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธี Autoclaves หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิเย็นลงและนำไปเก็บไว้ที่ 4 $^{\circ}$ C
2. เตรียม 2X MEM medium complete
3. นำ 1.2% agar ที่เตรียมไว้ไปอุ่นด้วยไมโครเวฟ กำลังไฟปานกลาง ประมาณ 1-2 นาที และรอให้อุณหภูมิเย็นลง หลังจากนั้นนำมาผสมกับ 2X MEM (อุ่นใน water bath) ในถ้วยแก้ว (beaker) ด้วยอัตราส่วน 1:1 จะได้ agar ที่มีความเข้มข้น 0.6%
4. เตรียม bottom layer โดยเติม 0.6% agar ลงใน 24-well ultra-low attachment plate ปริมาตร 250 μ L/well หลังจากนั้นนำ 24-well ultra-low attachment plate เก็บไว้ที่ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 20-30 นาที เพื่อให้ bottom layer เริ่มแข็งตัว

5. เตรียมเซลล์ SKBR3, MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 โดยการ sub-culture cell เพื่อใช้เตรียม top layer
6. เตรียม top layer โดยอุ่น 0.6% agar ด้วยไมโครเวฟ กำลังไฟปานกลาง ประมาณ 1-2 นาที และรอให้อุณหภูมิเย็นลง (ประมาณ 37-39 °C) จากนั้นนำ cells ที่เตรียมได้ใน ปริมาตร 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาผสมกับ 0.6% agar หลังจากนั้นจึง seed cells ลงใน 24-well ultra-low attachment plate
7. นำ 24-well ultra-low attachment plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ ประมาณ 30-40 นาที เพื่อให้ top layer เริ่มแข็งตัว
8. เติม β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M (เป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ IC₅₀) ปริมาตร 100 μ L โดยมี 0.1% DMSO เป็น negative control และใช้ lapatinib ความเข้มข้น 1 μ M และ palbociclib 25 μ M เป็น anti-cancer control (เป็นความเข้มข้นที่ IC₅₀) จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 21 วัน
9. เติม 2X MEM medium ทุก 2-3 วัน เพื่อป้องกัน top layer เกิดการแห้ง
10. วิเคราะห์ขนาดของ colonies โดยใช้โปรแกรม Axiovision 4 และ โปรแกรม Image J ในการหาพื้นที่ของ colonies ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{Relative number} = \frac{\text{Number of colonies that are larger than 50 microns}_{\text{treated}} \times 100}{\text{Number of colonies that are larger than 50 microns}_{\text{untreated}}}$$

$$\text{Relative area} = \frac{\text{area of colonies}_{\text{treated}} \times 100}{\text{area of colonies}_{\text{untreated}}}$$

3. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ (migration) และการลุกลาม (invasion) ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดต่อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

วิธี Scratch assay เพื่อศึกษาผลของ β -lapachone ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7/LCC9 ซึ่งเป็นตัวแทนของ anti-hormonal resistant breast cancer cells ที่ความหนาแน่น 2.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย MEM medium ลงใน 6 wells plate ที่อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$
2. เพาะเลี้ยงเซลล์ให้เต็มพื้นที่ หลังจากนั้นใช้ pipette tip ขนาด $200 \mu\text{l}$ ขูดบริเวณภายในหลุมเพื่อทำให้เกิดรอยเป็นเส้นตรงจำนวน 3 รอย (scratching) ล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง
3. เติม β -lap ความเข้มข้น 0.75 , 1.5 และ $3 \mu\text{M}$ (เป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ IC_{50}) โดยมี $0.1\% \text{DMSO}$ เป็น negative control และใช้ lapatinib ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ และ palbociclib ความเข้มข้น $25 \mu\text{M}$ control (เป็นความเข้มข้นที่ IC_{50}) เป็น anti-cancer control ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง
4. บันทึกภาพด้วย light microscope และหาความกว้างเฉลี่ยของรอยในหน่วยไมโครเมตร (μm) ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวัดความกว้างของรอยในภาพจากขอบด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งและนำมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม Image Pro-Plus software (Media Cybernetics) หรือ image J
5. คำนวณหา % migration ของ β -lap ต่อเซลล์ MCF-7/LCC9 เปรียบเทียบกับ ระยะห่างเริ่มแรก จากสูตร

$$\% \text{ cell migration} = \frac{\text{Average width}_{\text{time 0}} - \text{Average width}_{\text{last time point}}}{\text{Average width}_{\text{time 0}}} \times 100$$

6. แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิธี Matrigel invasion assay เพื่อศึกษาผลของ β -lapachone ต่อการลุกลามของเซลล์

1. เจือจาง matrigel ในสัดส่วน 1:30 ลงใน invasion chamber ที่ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ทำการให้ความชื้นแก่ matrigel ด้วยการเติม serum free media ประมาณ 1 ชั่วโมง
3. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ complete medium ลงใน 24-well plate (lower chamber) แล้วนำ invasion chamber วางบน 24-well plate
4. เพาะเลี้ยงเซลล์ SKBR3 และ MCF-7/LCC2 ซึ่งเป็นตัวแทนของ anti-hormonal resistant breast cancer cells ที่มีความสามารถในการลุกลามสูง ที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรใน McCoy's 5A medium ที่ไม่ใส่เซรัม สำหรับเซลล์ SKBR3 และ MEM medium ที่ไม่ใส่เซรัม สำหรับเซลล์ MCF-7/LCC2 ลงใน upper chamber ที่ถูกเคลือบด้วย matrigel
5. เติม β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M (เป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ IC_{50}) โดยใช้ 0.1% DMSO เป็น negative control และใช้ lapatinib ความเข้มข้น 1 μ M และ palbociclib ความเข้มข้น 25 μ M (เป็นความเข้มข้นที่ IC_{50}) เป็น anti-cancer control จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. นำส่วน supernatant ออก แล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer หลังจากนั้นทำการ fix เซลล์ด้วย formaldehyde (3.7% in PBS buffer pH 7.4)
7. นำ formaldehyde ออกแล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer และทำการ permeabilization ด้วย absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 20 นาที
8. นำ methanol ออก แล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer หลังจากนั้นทำการย้อมเซลล์ด้วย 0.1% crystal violet ปิดไว้ด้วยกระดาษฟอยล์ ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 15 นาที
9. นำ 0.1% crystal violet ออก แล้วล้าง upper chamber ด้วย PBS buffer เช็ดเซลล์ที่ไม่ลุกลามเข้าไปใน Matrigel ออกด้วยไม้พันสาลี
10. นับจำนวนเซลล์ที่ลุกลามไปยังบริเวณด้านล่างของ upper chamber ด้วยกล้อง light microscope

11. คำนวณหา % cell invasion ของ β -lap ต่อ SKBR3 และ MCF-7/LCC2 เปรียบเทียบกับ untreated control จากสูตร

$$\% \text{ cell invasion} = \frac{\text{Mean of invaded cell}_{\text{treated}}}{\text{Mean of invaded cell}_{\text{untreated}}} \times 100$$

4. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การดื้อยาต้านฮอร์โมนและกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อบุผิว ด้วยวิธี RT-PCR

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7/LCC9 และ SKBR3 ที่ความหนาแน่น 2.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน McCoy's 5A medium สำหรับเซลล์ SKBR3 และ MEM medium สำหรับเซลล์ MCF-7/LCC9 ใน 6 wells plate ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เหตุผลที่ใช้เซลล์สองชนิดนี้เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันผลที่พบจากการศึกษาฤทธิ์ของ β -lap ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง จึงเลือกเซลล์ที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนมาเพียง 1 ชนิด (MCF-7/LCC9) เทียบกับเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้นของ HER-2 (SKBR3)
2. เติม β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM (เป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ IC_{50}) โดยมี 0.1% DMSO เป็น negative control และใช้ lapatinib ความเข้มข้น 1 μM และ palbociclib ความเข้มข้น 25 μM เป็น anti-cancer control (เป็นความเข้มข้นที่ IC_{50}) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 mL
4. นำเซลล์ที่ได้มาสกัด RNA ด้วย RinoEx™ total RNA isolation solution
5. นำ total RNA มาทำ reverse transcription เพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA)
6. นำ cDNA มาทำ PCR amplification โดยใช้ primer ที่เหมาะสม เพื่อตรวจสอบผลของ β -lap ต่อการแสดงออกของยีน *Cyclin D1 (CCND1)* และ *P21* ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง *E-cadherin* และ *Vimentin* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ติดต่อยาค้านฮอร์โมน ได้แก่ *MMP-9* และ *uPA* เทียบกับ control

7. ตรวจสอบผลของ β -lap ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง real-time PCR โดยมี ยีน glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น normalized control และวิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม StepOnePlus™ software

5. การศึกษาฤทธิ์ของ β -lapachone ต่อการแสดงออกของโปรตีน downstream signaling ของ HER-2 และกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี western blot analysis

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ SKBR3, MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ที่ความหนาแน่น 2.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน McCoy's 5A medium สำหรับเซลล์ SKBR3 และ MEM medium สำหรับเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ใน 6 wells plate ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂
2. เติม β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M (เป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ IC₅₀) โดยมี 0.1% DMSO เป็น negative control และใช้ lapatinib ความเข้มข้น 1 μ M และ palbociclib ความเข้มข้น 25 μ M เป็น anti-cancer control (เป็นความเข้มข้นที่ IC₅₀) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง และทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer containing the protease and phosphatase inhibitor cocktails
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 g 4 °C เป็นเวลา 20 นาที
5. ทำการละลายโปรตีนปริมาณเท่า ๆ กันใน 10% SDS-PAGE gel และนำไป denatured ด้วยความร้อนที่ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปทำ electrophoresis
6. ทำการย้ายโปรตีนจาก gel ไปยัง nitrocellulose membrane และใส่ blocking buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ตรวจสอบด้วย primary antibody ต่อโปรตีน ERK, phosphorylated ERK, Akt, phosphorylated Akt, JNK, phosphorylated JNK, Cyclin D 1 , HER-2 , phosphorylated HER-2 ในเซลล์ MCF-7/LCC2, MCF-7/LCC9 และ SKBR3 และ

ตรวจสอบด้วย primary antibody ต่อโปรตีน NCOA3 (เฉพาะในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 เนื่องจากในเซลล์ SKBR3 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน NCOA3) เก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

8. หลังจากนั้นล้างด้วย TBS-T (0.1% tween 20) จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงใส่ anti-rabbit HRP-linked antibody in blocking solution
9. เติม substrate และตรวจสอบผลของ β -lap ต่อการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายโดยมี glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น normalized control และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Image Studio software

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

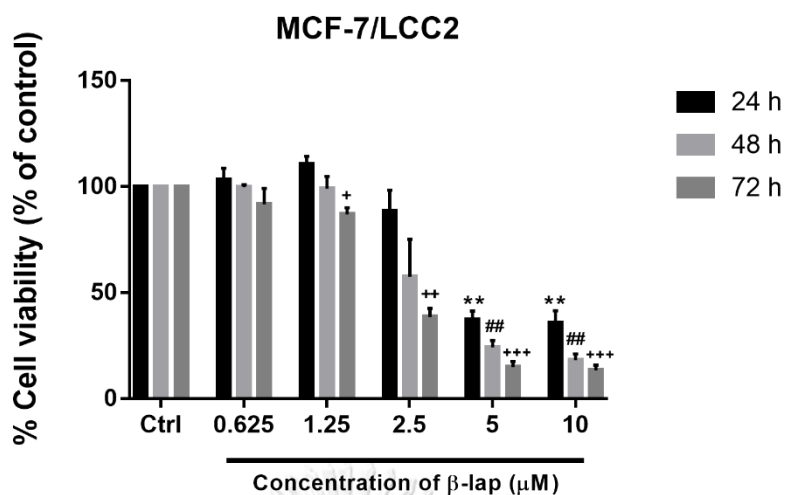
- การวิเคราะห์ข้อมูล แสดงผลข้อมูลที่ได้เป็น mean + standard error of mean (S.E.M.)
- เปรียบเทียบค่าแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองแต่ละกลุ่ม โดยใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by a Tukey's post hoc test
- พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-Value น้อยกว่า 0.05

บทที่ 4 ผลการทดลอง

β -lapachone สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

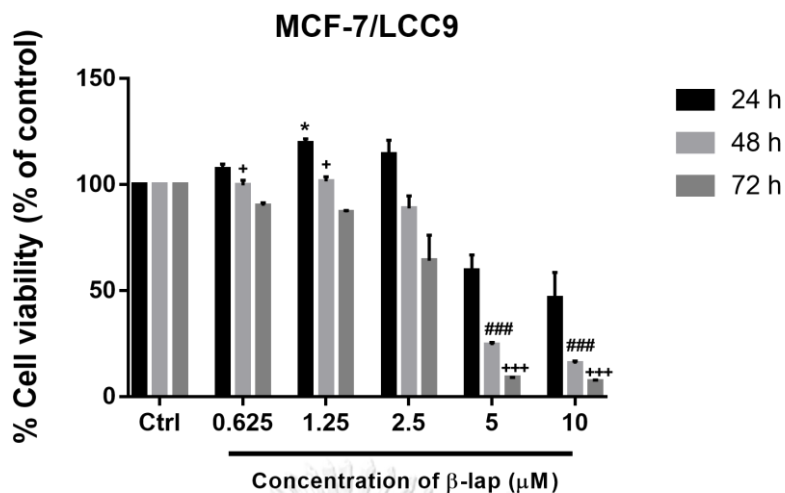
จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า β -lap มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) รวมถึงมะเร็งเต้านม (breast cancer) (63) ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของ β -lap ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC2, MCF-7/LCC9) และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน (SKBR3) ด้วยวิธี MTT assay

เมื่อทดสอบโดยการให้ β -lap ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 μ M เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ได้รับ 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม negative control พบว่า β -lap มีฤทธิ์ลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของ β -lap ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC2) มีค่าเท่ากับ 4.12, 2.81 และ 2.23 μ M ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ **ดังรูปที่ 11 และ ตารางที่ 2** ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC9) มีค่าเท่ากับ 5.87, 3.95 และ 3.11 μ M ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ **ดังรูปที่ 12 และ ตารางที่ 2** และในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน (SKBR3) มีค่าเท่ากับ 5.47, 3.74 และ 3.73 μ M ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ **ดังรูปที่ 13 และ ตารางที่ 2** จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นในการให้สารทดสอบ (concentration-dependent manner) และค่า IC_{50} ของ lapatinib และ palbociclib ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็น anti-cancer control มีค่ามากกว่าสารทดสอบ β -lap ในเซลล์ MCF-7/LCC2 มีค่าเท่ากับ 5.71 และ >20 μ M ที่ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ในเซลล์ MCF-7/LCC9 มีค่าเท่ากับ 4.16 และ >20 μ M ที่ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่ในเซลล์ SKBR3 ค่า IC_{50} ของ lapatinib เท่ากับ 1.67 μ M ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าสารทดสอบ β -lap **ดังตารางที่ 3**



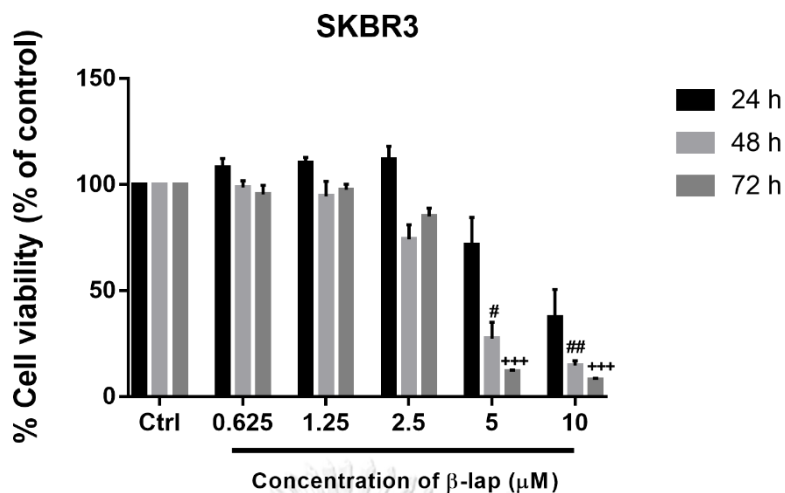
รูปที่ 11 β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2

กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 μM เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในเซลล์ MCF-7/LCC2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (** $p < 0.01$ ที่เวลา 24 ชั่วโมง) (## $p < 0.01$ ที่เวลา 48 ชั่วโมง) และ ($+p < 0.05$, $++p < 0.01$, $+++p < 0.001$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง)



รูปที่ 12 β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC9

กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 μ M เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในเซลล์ MCF-7/LCC9 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.05$ ที่เวลา 24 ชั่วโมง) (### $p < 0.001$ ที่เวลา 48 ชั่วโมง) และ (+ $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง)



รูปที่ 13 β -lap สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3

กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 μM เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในเซลล์ SKBR3 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\#p < 0.05$, $\##p < 0.01$ ที่เวลา 48 ชั่วโมง) และ ($+++p < 0.001$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง)

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC₅₀ ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ได้แก่ SKBR3

Cells type	IC ₅₀ (μ M)		
	24 (h)	48 (h)	72 (h)
MCF-7/LCC2	4.12 \pm 0.28	2.18 \pm 0.46	2.23 \pm 0.06
MCF-7/LCC9	5.87 \pm 0.68	3.95 \pm 0.26	3.11 \pm 0.54
SKBR3	5.47 \pm 0.47	3.74 \pm 0.45	3.73 \pm 0.13

ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ตารางที่ 3 แสดงค่า IC₅₀ ของ β -lap Lapatinib และ Palbociclib ที่ 48 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน ได้แก่ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ได้แก่ SKBR3 (17, 75)

Condition	IC ₅₀ (μ M)			Reference
	MCF-7/LCC2	MCF-7/LCC9	SKBR3	
β -lap	2.18 \pm 0.46	3.95 \pm 0.26	3.74 \pm 0.45	
Lapatinib	5.71 \pm 1.12	4.16 \pm 0.73	1.67 \pm 0.28	Sakunrangsit et al., 2020
Palbociclib	>20	>20	-	Pradubyat et al., 2020

ค่าที่ได้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

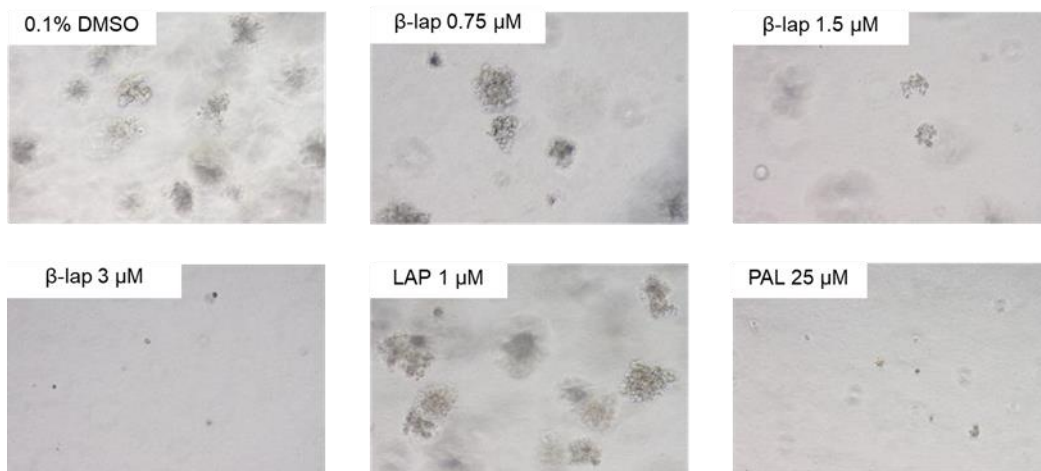
β -lapachone สามารถยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะ (Anchorage-independent growth) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

จากผลการศึกษา เมื่อให้ **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM และ lapatinib (LAP) ความเข้มข้น 1 μM และ palbociclib (PAL) ความเข้มข้น 25 μM ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control ในเซลล์ MCF-7/LCC2 พบว่า **β -lap** ความเข้มข้น 3 μM สามารถลดขนาด colony ได้ถึงร้อยละ 98 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ และ **β -lap** ความเข้มข้น 1.5 และ 3 μM สามารถลดจำนวน colony ได้ร้อยละ 40 และ 60 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีผลลดทั้งขนาดและจำนวน colony แต่ PAL มีผลลดขนาดและจำนวนของ colony ได้ร้อยละ 96 และ 48 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control **ดังรูปที่ 14**

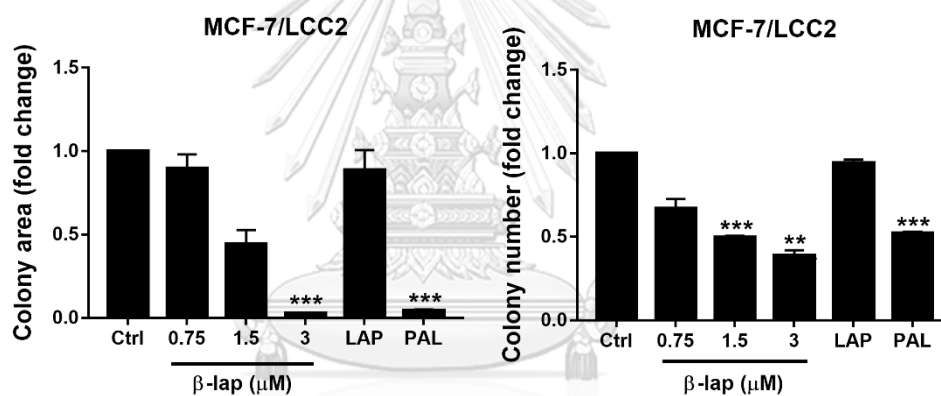
เมื่อให้ **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM และ LAP ความเข้มข้น 1 μM และ PAL ความเข้มข้น 25 μM ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control ในเซลล์ MCF-7/LCC9 พบว่า **β -lap** ความเข้มข้น 3 μM สามารถลดขนาด colony ได้ถึงร้อยละ 86 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ และ **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM สามารถลดจำนวน colony ได้ถึงร้อยละ 23, 27 และ 74 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีผลลดทั้งขนาดและจำนวน colony แต่ PAL มีผลลดขนาดและจำนวนของ colony ได้ร้อยละ 80 และ 73 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control **ดังรูปที่ 15**

เมื่อให้ **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM และ LAP ความเข้มข้น 1 μM ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control ในเซลล์ SKBR3 พบว่า **β -lap** ความเข้มข้น 3 μM สามารถลดขนาด colony ได้ถึงร้อยละ 66 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ซึ่งสามารถลดขนาด colony ได้ดีกว่า LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control โดย LAP สามารถลดขนาด colony ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ **β -lap** ความเข้มข้น 1.5 และ 3 μM สามารถลดจำนวน colony ได้ถึงร้อยละ 46 และ 59 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่สามารถลดจำนวน colony ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control **ดังรูปที่ 16**

A.



B.



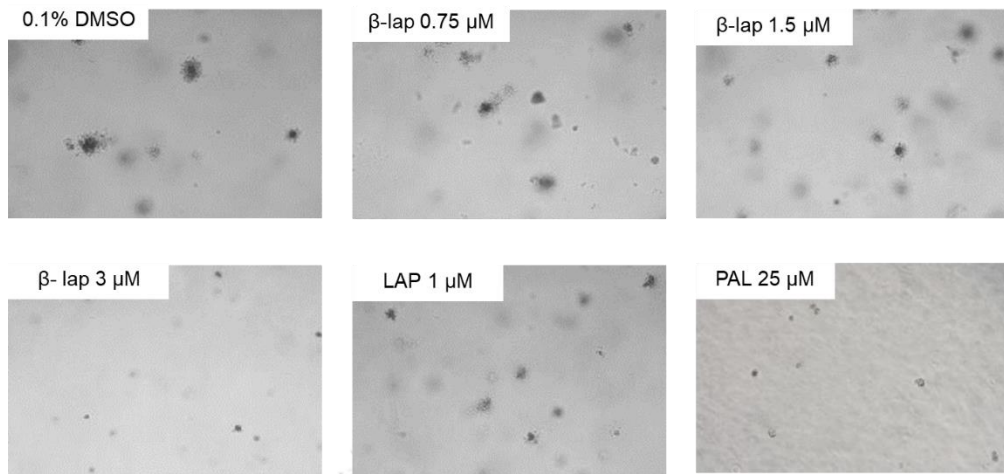
รูปที่ 14 β -lap ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2

- A. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X หลังได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM โดยมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μM และ PAL ความเข้มข้น 25 μM ในเซลล์ MCF-7/LCC2 เป็นเวลา 21 วัน
- B. กราฟแสดงอัตราส่วนของขนาดและจำนวนของ colony ในเซลล์ MCF-7/LCC2 หลังได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM โดยมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μM และ PAL ความเข้มข้น 25 μM ในเซลล์ MCF-7/LCC9 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ

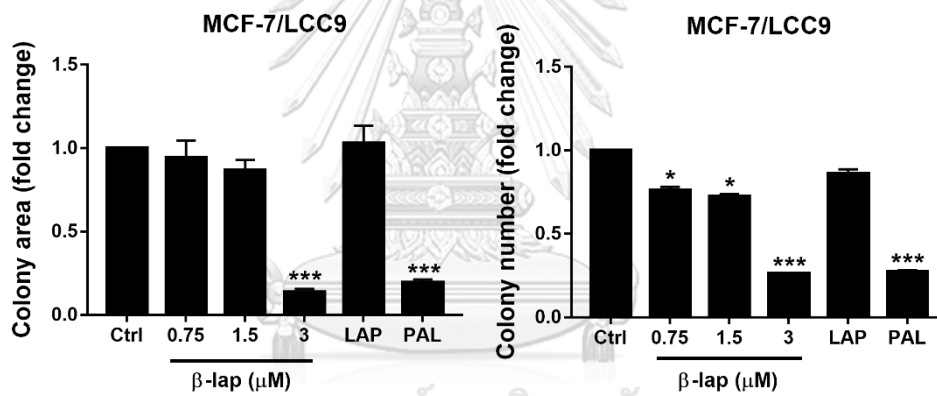
0.1% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่ม negative control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)



A.



B.



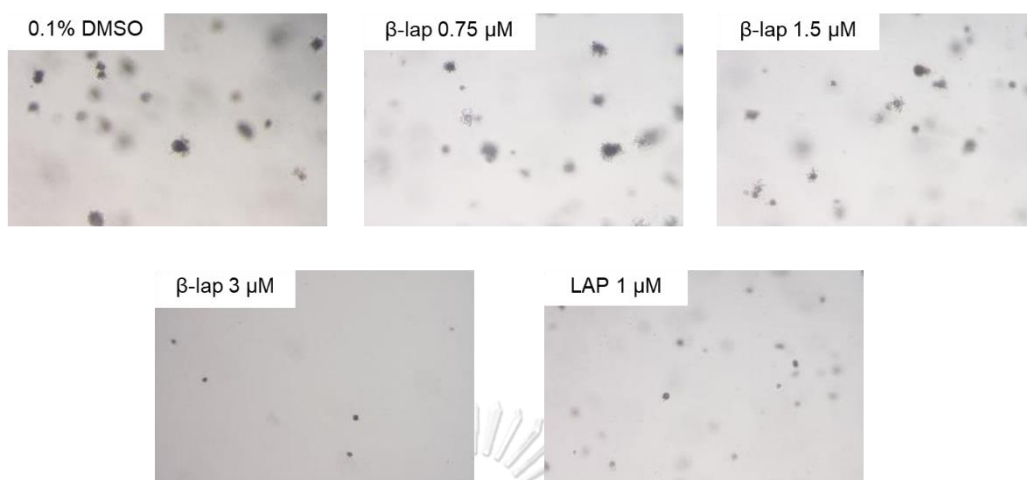
รูปที่ 15 β -lap ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC9

- A. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X หลังได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M ในเซลล์ MCF-7/LCC9 เป็นเวลา 21 วัน
- B. กราฟแสดงอัตราส่วนของขนาดและจำนวนของ colony ในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M ในเซลล์ MCF-7/LCC9 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ

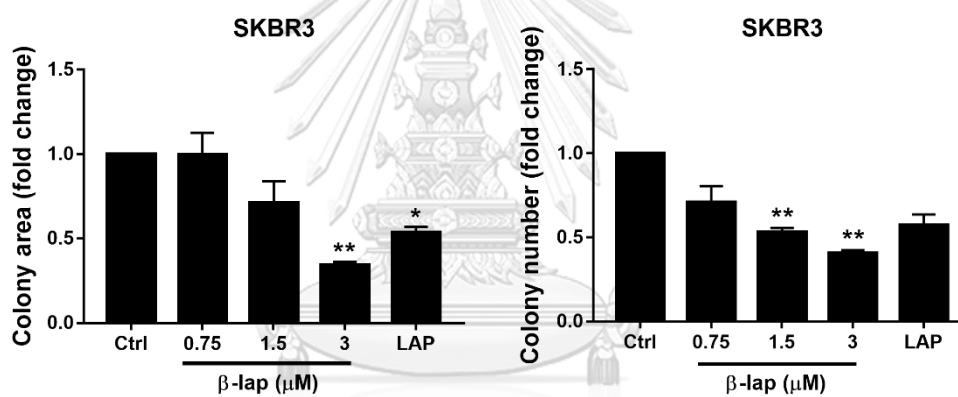
0.1% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่ม negative control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($*p < 0.05$ และ $***p < 0.001$)



A.



B.



รูปที่ 16 β -lap ยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3

- A. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X หลังได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μ M ในเซลล์ SKBR3 เป็นเวลา 21 วัน
- B. กราฟแสดงอัตราส่วนของขนาดและจำนวนของ colony ในเซลล์ SKBR3 หลังได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μ M ในเซลล์ SKBR3 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่ม negative control

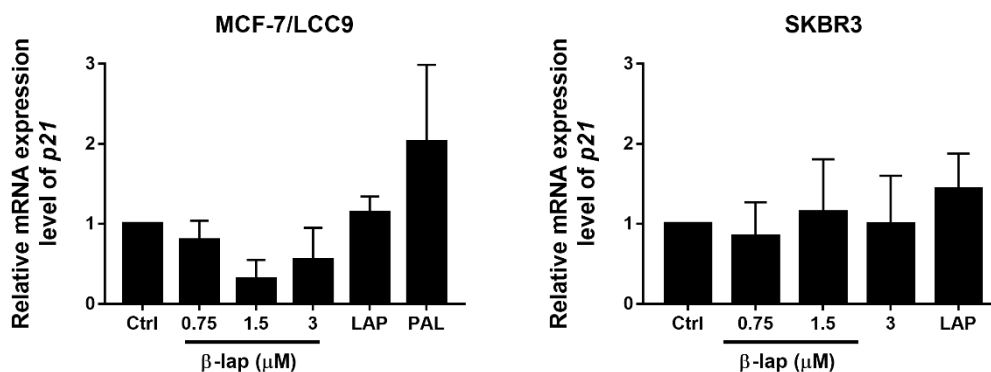
โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
(* $P < 0.05$ และ ** $p < 0.01$)



β -lapachone ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของยีน P21 ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีตัวรับฮอร์โมน

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า β -lap มีฤทธิ์ในการลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีตัวรับฮอร์โมนเพิ่มขึ้น P21 เป็นหนึ่งในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยปกติในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนจะมี Cyclin D1 มากขึ้นซึ่งมีบทบาทใน Cyclin dependent kinase pathway ทำงานโดยการไปยับยั้ง Rb tumor suppresser และทำให้เกิดการลดการแสดงออกของโปรตีน P21 เซลล์จึงมีการแบ่งตัวตามวัฏจักรเซลล์

จากผลการศึกษา เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL เป็น anti-cancer control ในเซลล์ MCF-7/LCC9 พบว่า สารทดสอบ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M รวมถึง LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของยีน P21 เมื่อเทียบกับ negative control หรือกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO และ เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M เป็น anti-cancer control ในเซลล์ SKBR3 พบว่า สารทดสอบ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M รวมถึง LAP ความเข้มข้น 1 μ M ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของยีน P21 เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control คือกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO ดังรูปที่ 17



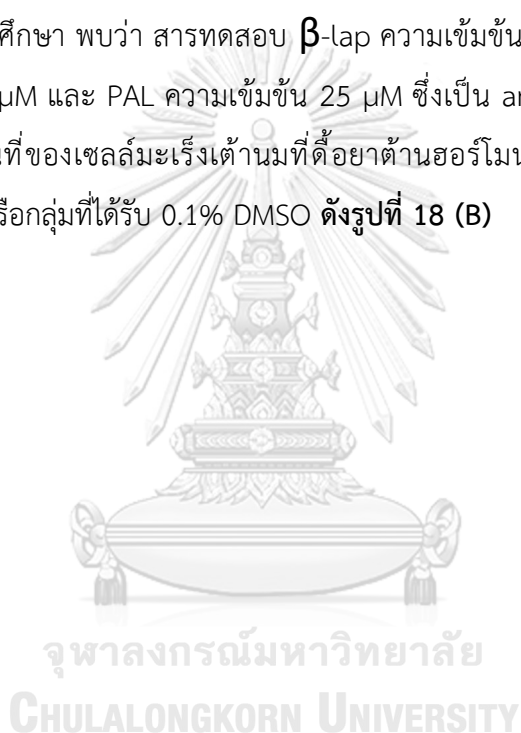
รูปที่ 17 β -lap ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ P21 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC9 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน SKBR3

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ P21 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP 1 μ M และ Pal 25 μ M เป็น anti-cancer control ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC9 และหลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP 1 μ M เป็น anti-cancer control ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน SKBR3 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

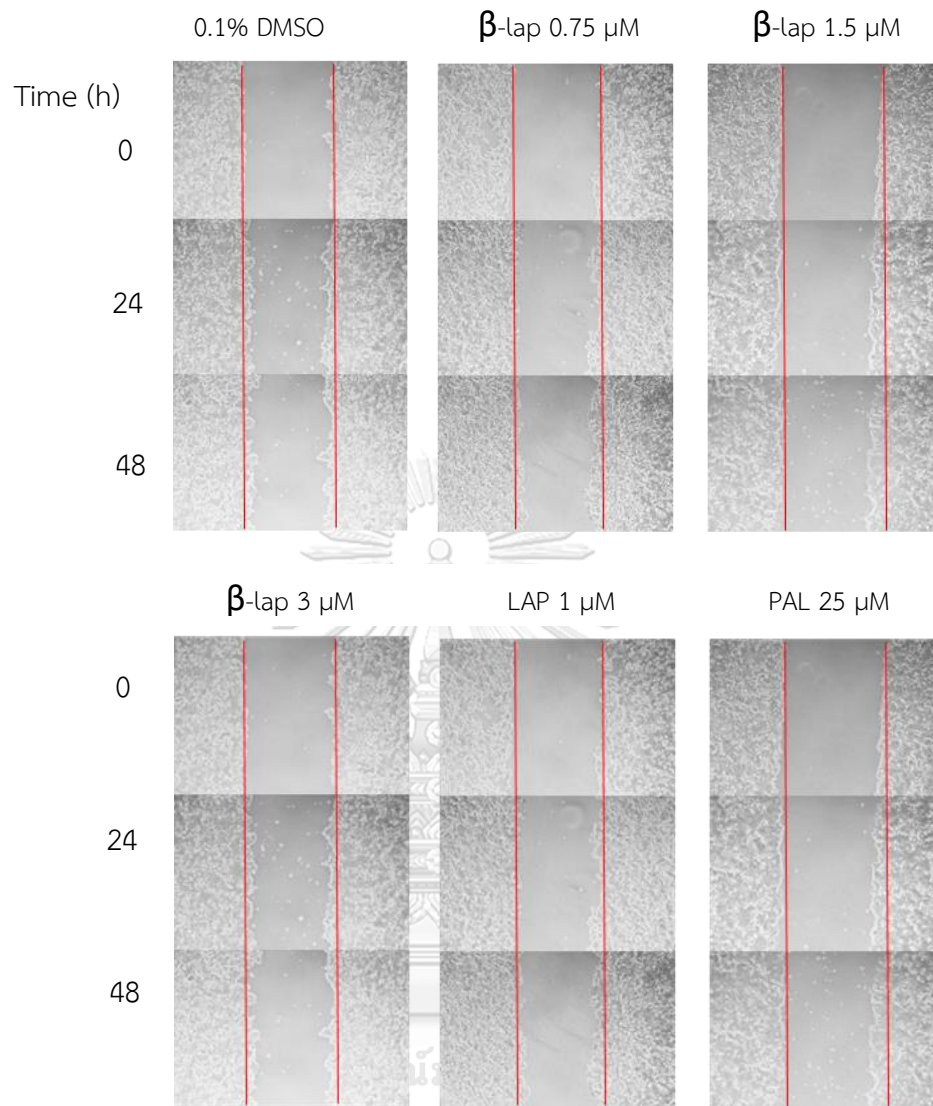
β -lapachone ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน

ในการศึกษานี้จะศึกษาฤทธิ์ของ β -lap ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC9) โดยให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม negative control หลังจากนั้นบันทึกภาพการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง **ดังรูปที่ 18 (A)**

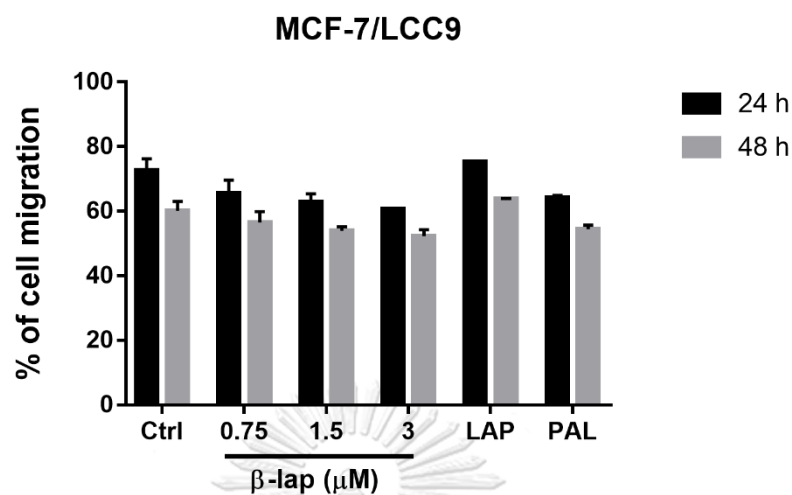
จากผลการศึกษา พบว่า สารทดสอบ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M รวมถึง LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC9 เมื่อเทียบกับ negative control หรือกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO **ดังรูปที่ 18 (B)**



A.



B.



รูปที่ 18 β -lap ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC9

- A. แสดงรูปความกว้างของรอยขีดบริเวณก้นภาชนะเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับ 0.1% DMSO และ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M เป็น anti-cancer control ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยบันทึกภาพหลังจากขีดทันทีและที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ
- B. กราฟแสดงร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ได้รับหลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็น anti-cancer control ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และ 0.1% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่ม negative control โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

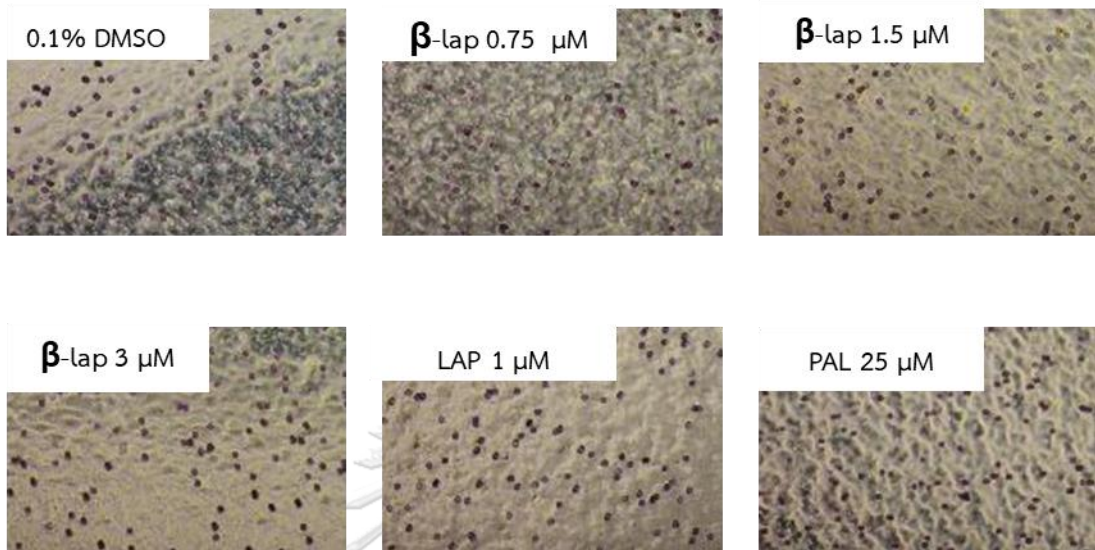
β -lapachone ไม่มีผลในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

จากผลการทดลอง เมื่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (MCF-7/LCC2) ได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control พบว่า β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และ LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M ไม่มีผลยับยั้งการลุกลามผ่าน matrigel ดังรูปที่ 19

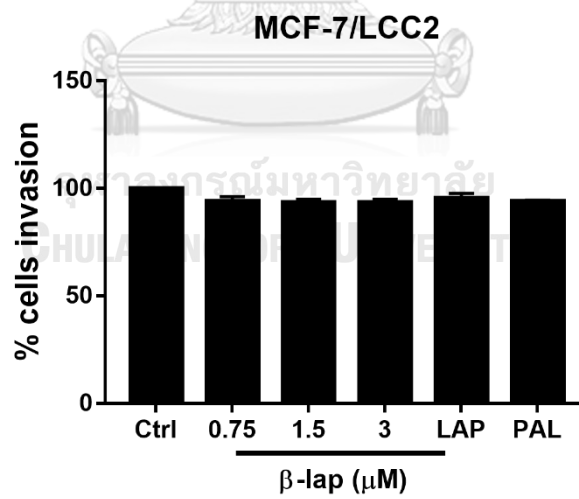
เมื่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน (SKBR3) ได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M เป็น anti-cancer control พบว่า β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และ LAP ความเข้มข้น 1 μ M ไม่มีผลยับยั้งการลุกลามผ่าน matrigel เช่นกัน เมื่อเทียบกับ negative control หรือ 0.1% DMSO ดังรูปที่ 20



A.



B.

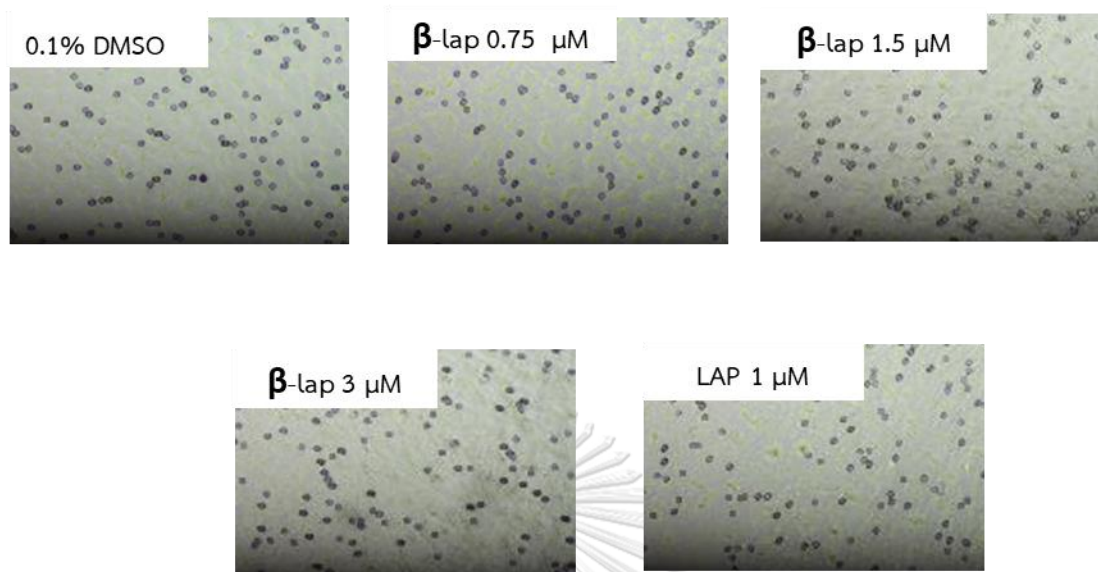


รูปที่ 19 β -lap ไม่มีผลในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7/LCC2

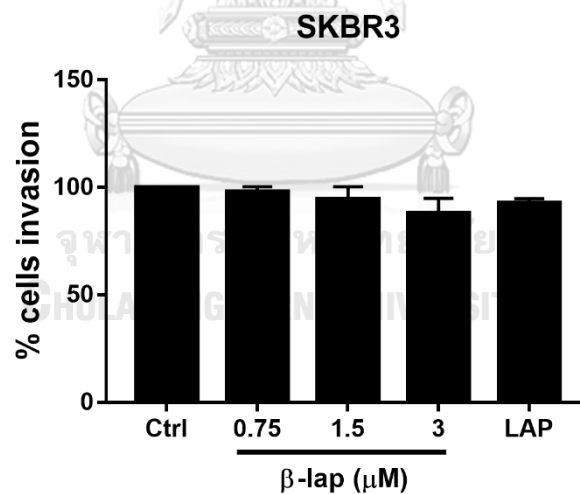
- A. แสดงรูปถ่ายเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 ที่มีการลุกลามผ่าน matrigel ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M ที่เวลา 48 ชั่วโมง
- B. กราฟแสดงร้อยละการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 เมื่อได้รับ β -LAP ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทียบกับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



A.



B.



รูปที่ 20 β -lap ไม่มีผลในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3

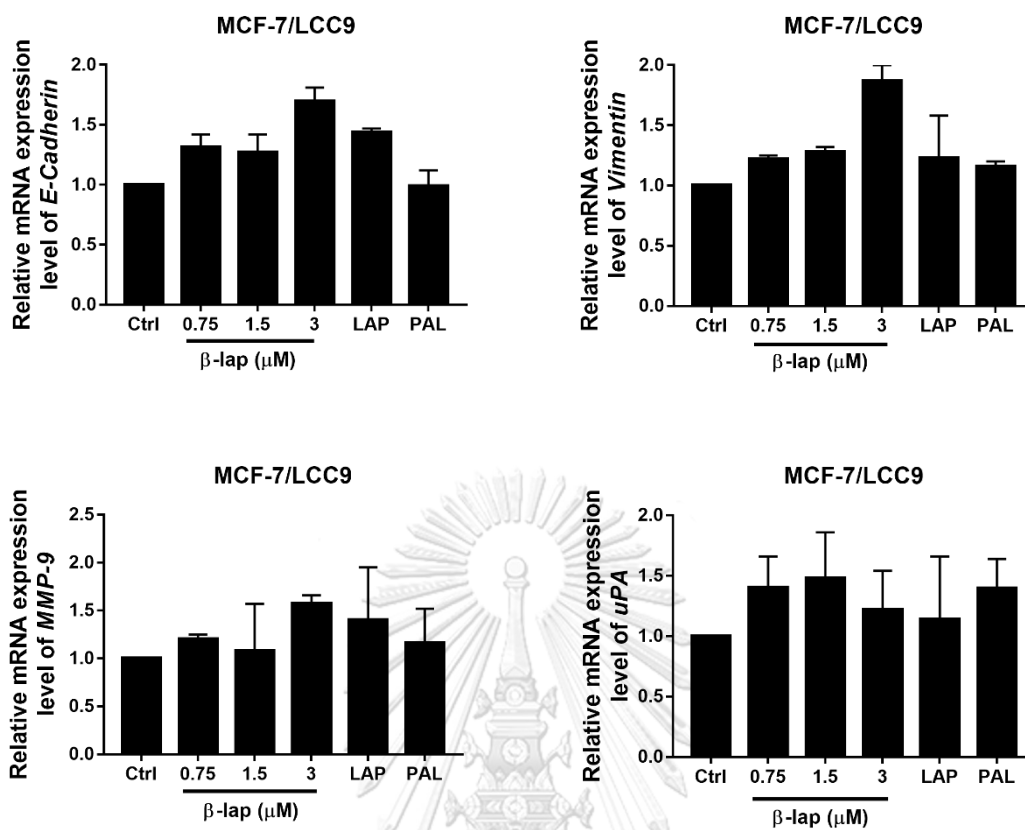
A. แสดงรูปถ่ายเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของเฮอรัททู SKBR3 ที่มีการลุกลามผ่าน matrigel ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M ที่เวลา 48 ชั่วโมง

- B. กราฟแสดงร้อยละการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน SKBR3 เมื่อได้รับ β -LAP ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μM และมี anti-cancer control คือ LAP ความเข้มข้น 1 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทียบกับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ค่าที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



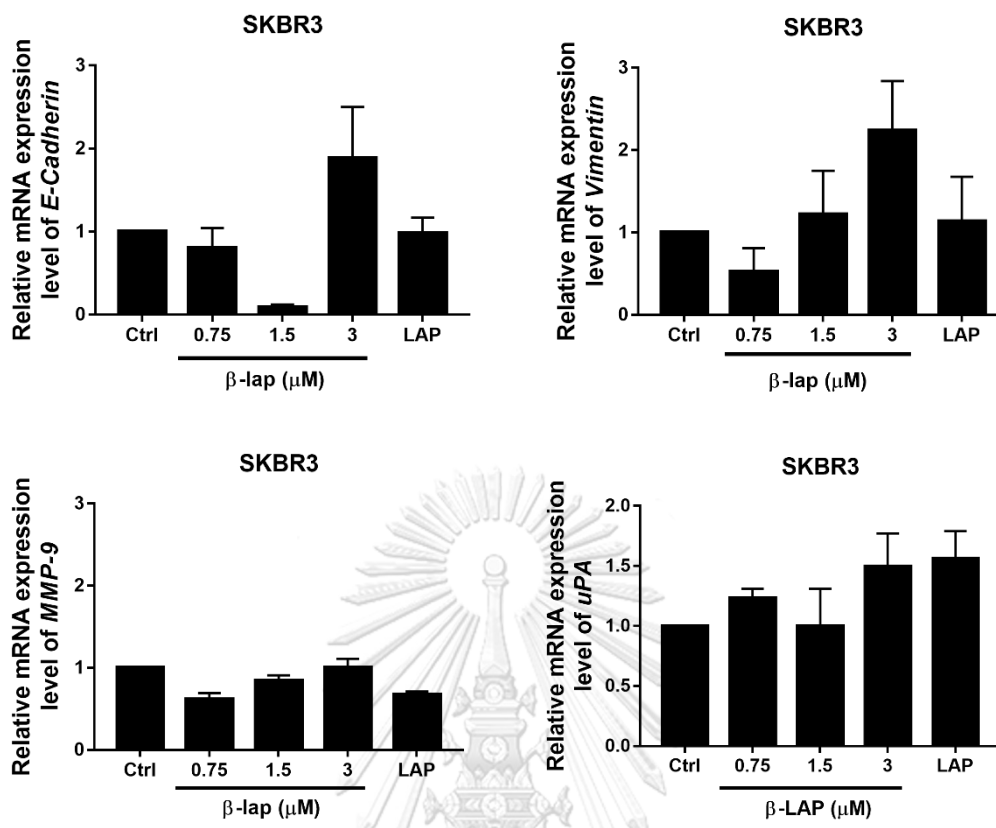
β -lapachone ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้ม การแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของเฮอรัท

จากการศึกษาผลของ **β -lap** ต่อระดับ mRNA ของ *E-Cadherin*, *Vimentin*, *MMP-9* และ *uPA* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC9 เมื่อได้รับ **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control พบว่า **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M รวมถึง LAP และ PAL ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของยีนดังกล่าว **ดังรูป 21** และในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของเฮอรัท SKBR3 เมื่อได้รับ **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยมี LAP ความเข้มข้น 1 μ M เป็น anti-cancer control พบว่า **β -lap** ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M รวมถึง LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.1% DMSO ซึ่งเป็นกลุ่ม negative control **ดังรูป 22**



รูปที่ 21 β -lap ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ *E-Cadherin*, *Vimentin*, *MMP-9* และ *uPA* ในเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *E-Cadherin*, *Vimentin*, *MMP-9* และ *uPA* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC9 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ได้แก่ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



รูปที่ 22 β -lap ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ *E-Cadherin*, *Vimentin*, *MMP-9* และ *uPA* ในเซลล์ SKBR3

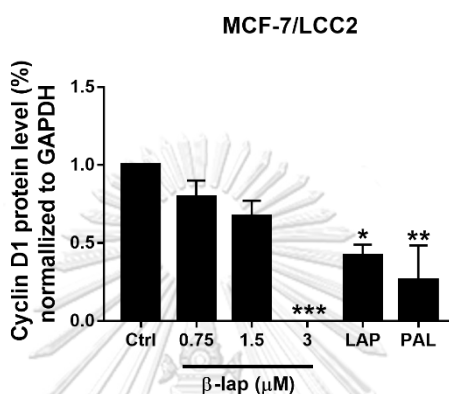
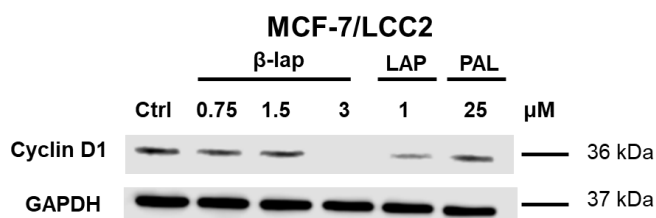
กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *E-Cadherin*, *Vimentin*, *MMP-9* และ *uPA* ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน SKBR3 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M เปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ผลของ β -lapachone ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen (tamoxifen-resistant protein) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน

จากการศึกษาเบื้องต้น β -lap สามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้ง MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ได้ ดังนั้นเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้งสองชนิด และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน SKBR3 จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน Cyclin D1

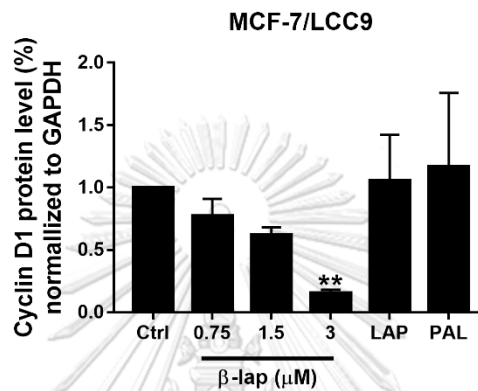
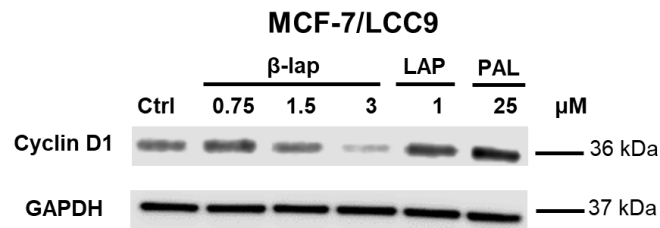
ผลของ β -lap ต่อ Cyclin D1

จากการศึกษาพบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม negative control β -lap สามารถลดระดับโปรตีน Cyclin D1 เป็น 0.79, 0.67 และ 0 เท่าตามลำดับและลดระดับของโปรตีนได้ดีกว่า LAP และ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control โดย β -lap ความเข้มข้น 3 μ M สามารถลดระดับโปรตีน Cyclin D1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ ในเซลล์ MCF-7/LCC2 **ดังรูปที่ 23** และ β -lap สามารถลดระดับโปรตีน Cyclin D1 เป็น 0.77, 0.62 และ 0.16 เท่าตามลำดับและลดระดับโปรตีนได้ดีกว่า LAP และ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control โดย β -lap ความเข้มข้น 3 μ M สามารถลดระดับโปรตีน Cyclin D1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ในเซลล์ MCF-7/LCC9 **ดังรูปที่ 24** ในขณะที่ β -lap ไม่มีผลยับยั้งการแสดงออกของระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ SKBR3 แต่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control สามารถยับยั้งการแสดงออกของระดับโปรตีน Cyclin D1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ **ดังรูปที่ 25**



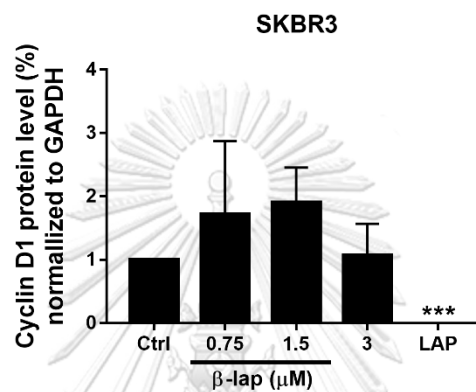
รูปที่ 23 β -lap ลดระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ MCF-7/LCC2

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ MCF-7/LCC2 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.01$ ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)



รูปที่ 24 β -lap ลดระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (** $p < 0.01$)



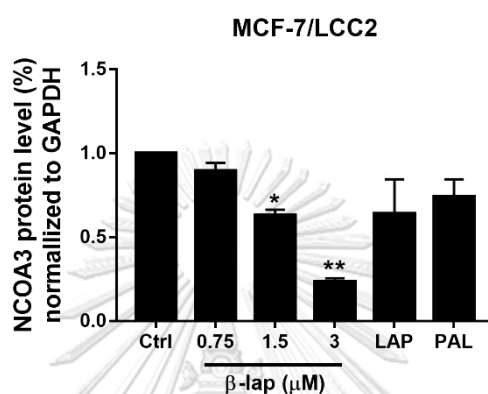
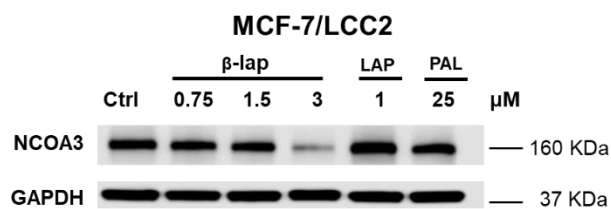
รูปที่ 25 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ SKBR3

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์ SKBR3 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (***) $p < 0.001$

ผลของ β -lap ต่อ NCOA3

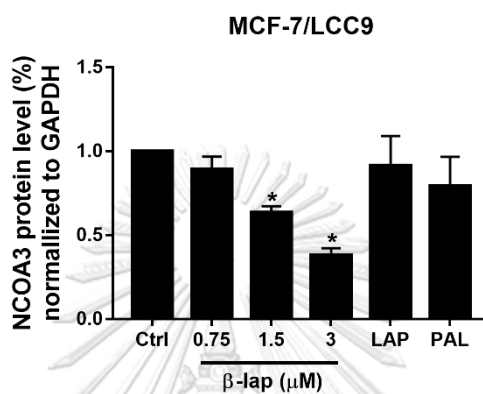
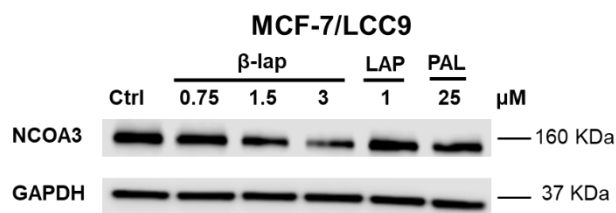
จากการศึกษา พบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม negative control ในเซลล์ MCF-7/LCC2 β -lap สามารถลดโปรตีน NCOA3 เป็น 0.89, 0.63 และ 0.23 เท่าตามลำดับ และลดโปรตีน NCOA3 ได้ดีกว่า LAP และ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control โดย β -lap ความเข้มข้น 1.5 μ M สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ β -lap ความเข้มข้น 3 μ M สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ในเซลล์ MCF-7/LCC2 **ดั่งรูปที่ 26**

ในเซลล์ MCF-7/LCC9 β -lap สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน NCOA3 เป็น 0.89, 0.63 และ 0.38 เท่าตามลำดับและลดระดับการแสดงออกของโปรตีนได้ดีกว่า LAP และ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control โดย β -lap ความเข้มข้น 1.5 μ M สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ β -lap ความเข้มข้น 3 μ M สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ในเซลล์ MCF-7/LCC9 **ดั่งรูปที่ 27**



รูปที่ 26 β -lap สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC2

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน NCOA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC2 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$)



รูปที่ 27 β -lap สามารถลดระดับโปรตีน NCOA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน NCOA3 ในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.05$)

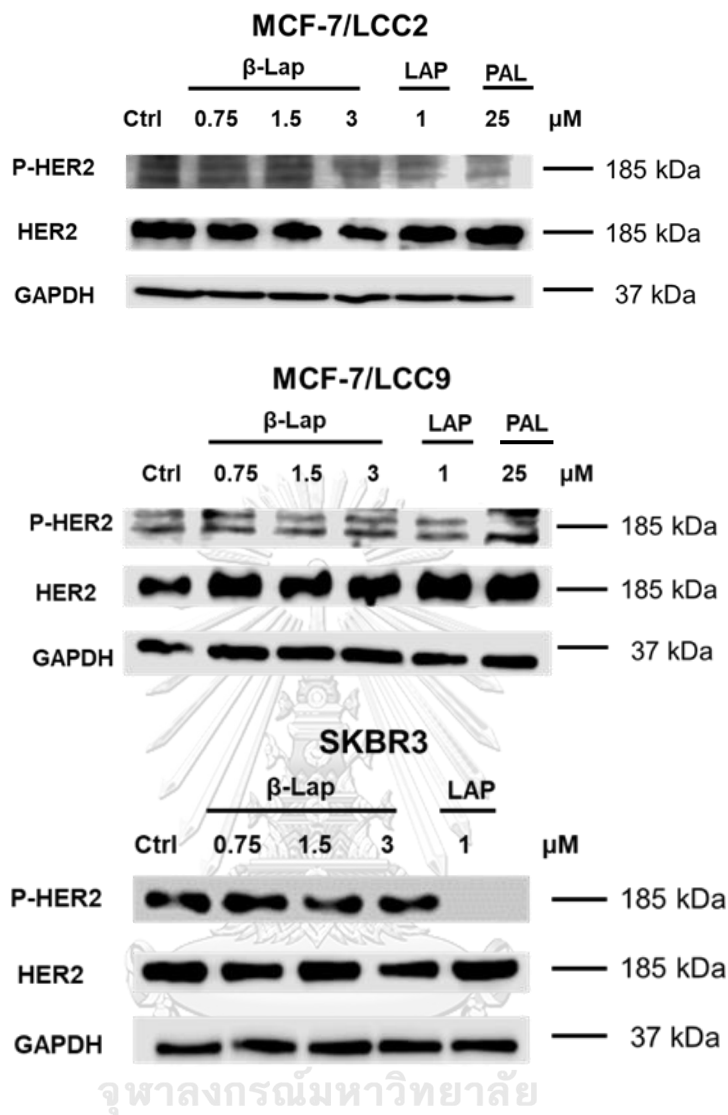
ผลของ β -lap ต่อระดับของโปรตีน HER-2 และ downstream signaling ของ HER-2

การศึกษานี้ทำการศึกษาผลของ β -lap ต่อการเปลี่ยนแปลงของ pHER-2/HER-2 และ downstream signaling ของ HER-2 ได้แก่ pAKT/AKT, pERK/ERK, pJNK/JNK

ผลของ β -lap ต่อ pHER-2/HER-2

จากการศึกษาปริมาณโปรตีน pHER2/HER2 พบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็น anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็น negative control ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 พบว่า β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M รวมถึง LAP และ PAL ซึ่งเป็น anti-cancer control ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pHER2/HER2 ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control

เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M เป็น anti-cancer control ในเซลล์ SKBR3 พบว่า β -lap ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pHER2/HER2 ได้เช่นกัน ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control สามารถลดระดับโปรตีน phosphorylated HER2 เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control **รูปที่ 28**



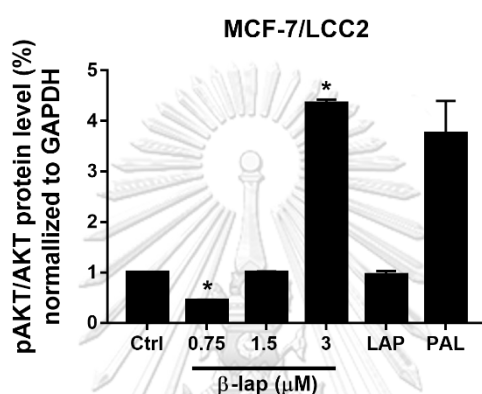
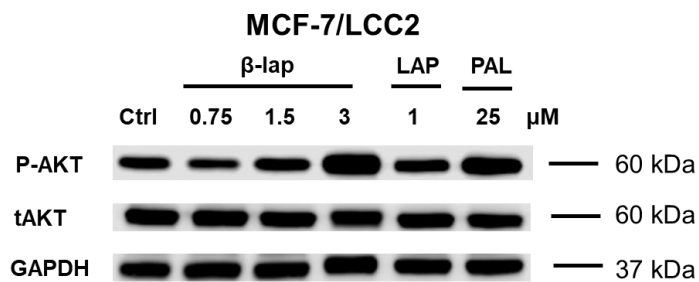
รูปที่ 28 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pHER2/HER2 ในเซลล์ MCF-7/LCC2, MCF-7/LCC9 และ SKBR3

เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็น anti-cancer control ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 และให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M เป็น anti-cancer control ในเซลล์ SKBR3 และให้ 0.1% DMSO เป็น negative control โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 1 ครั้ง

ผลของ β -lap ต่อ pAKT/AKT

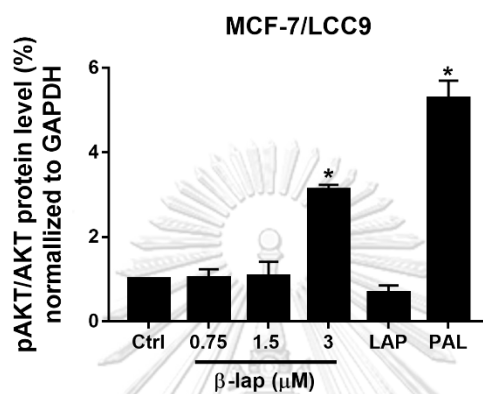
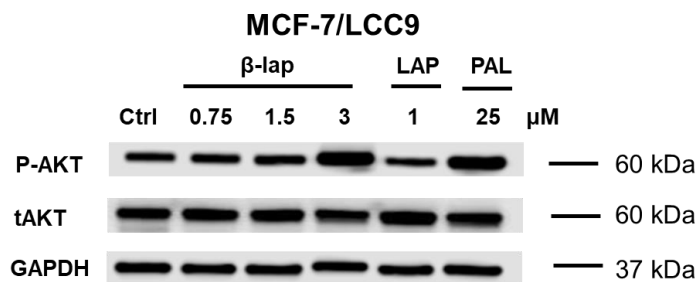
จากการศึกษาระดับโปรตีน pAKT/AKT พบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม negative control ในเซลล์ MCF-7/LCC2 β -lap สามารถเพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT เป็น 0.45, 1.01 และ 4.35 เท่าตามลำดับ และ β -lap ความเข้มข้น 3 μ M เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ได้มากกว่า PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control โดย β -lap เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ แต่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control อีกชนิดหนึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ pAKT/AKT **ดั่งรูปที่ 29**

ในเซลล์ MCF-7/LCC9 β -lap เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT เป็น 1.20, 1.41 และ 3.23 เท่าตามลำดับ และ β -lap ความเข้มข้น 3 μ M เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ แต่ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control สามารถเพิ่มระดับ pAKT/AKT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเพิ่มมากกว่า β -lap **ดั่งรูปที่ 30** และในเซลล์ SKBR3 β -lap ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pAKT/AKT ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control สามารถยับยั้งโปรตีน pAKT/AKT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ **ดั่งรูปที่ 31**



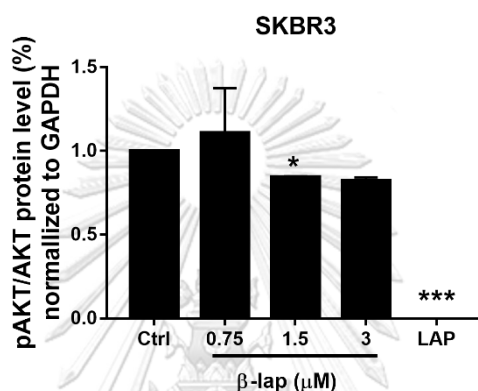
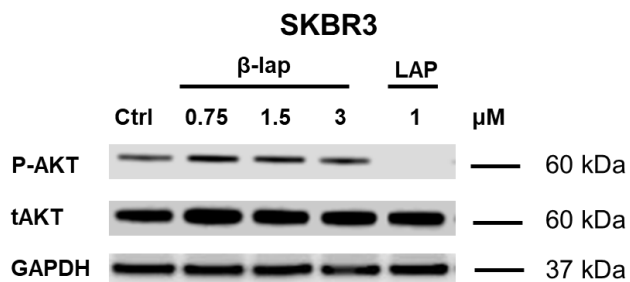
รูปที่ 29 β -lap เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ MCF-7/LCC2

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ MCF-7/LCC2 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.05$)



รูปที่ 30 β -lap เพิ่มระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.05$)



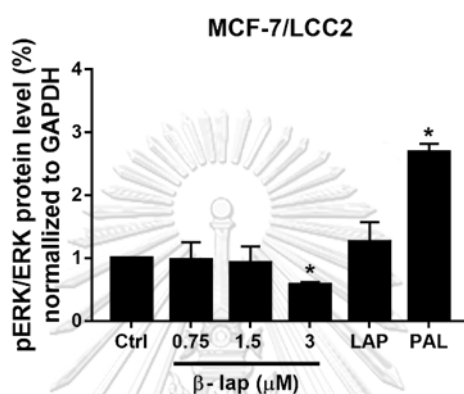
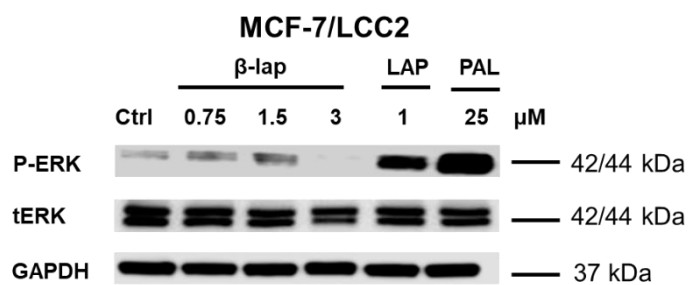
รูปที่ 31 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ SKBR3

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pAKT/AKT ในเซลล์ SKBR3 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($*p < 0.05$ และ $***p < 0.001$)

ผลของ β -lap ต่อ pERK/ERK

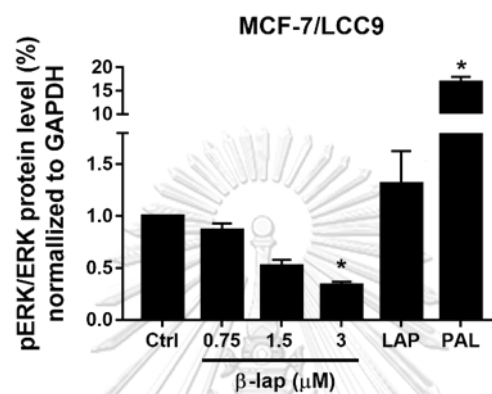
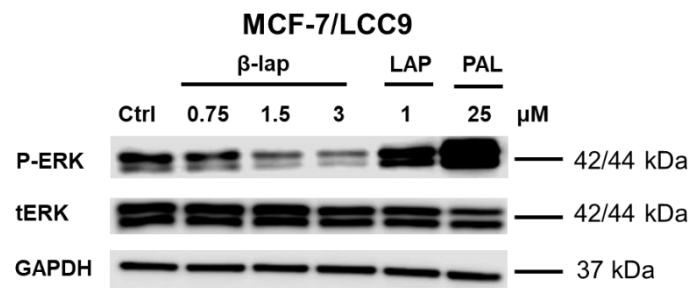
จากการศึกษาระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC2 พบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เป็นกลุ่ม anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม negative control β -lap สามารถลดระดับโปรตีน pERK/ERK เป็น 0.96, 0.94 และ 0.58 เท่า ตามลำดับ และ β -lap ความเข้มข้น 3 μ M สามารถลดระดับโปรตีน pERK/ERK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control และลดปริมาณโปรตีน pERK/ERK ได้ดีกว่า LAP และ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control นอกจากนี้ PAL ยังเพิ่มระดับ pERK/ERK มากกว่า negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **ดั่งรูปที่ 32**

ใน MCF-7/LCC9 สามารถลดระดับโปรตีน pERK/ERK เป็น 0.86, 0.52 และ 0.33 เท่า ตามลำดับและ β -lap ความเข้มข้น 3 μ M สามารถลดปริมาณโปรตีน pERK/ERK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control และลดปริมาณโปรตีน pERK/ERK ได้ดีกว่า LAP และ PAL ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-cancer control นอกจากนี้ PAL ยังเพิ่มระดับ pERK/ERK มากกว่า negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **ดั่งรูปที่ 33** และในเซลล์ SKBR3 β -lap ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pERK/ERK ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control สามารถยับยั้ง pERK/ERK ได้อย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ **ดั่งรูปที่ 34**



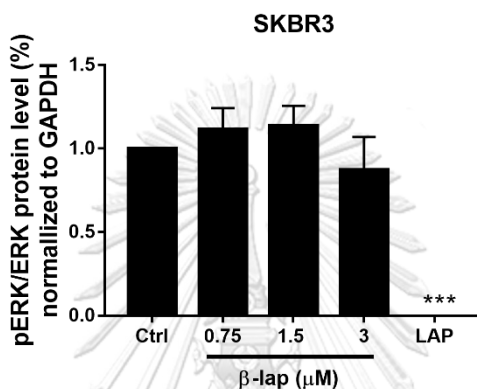
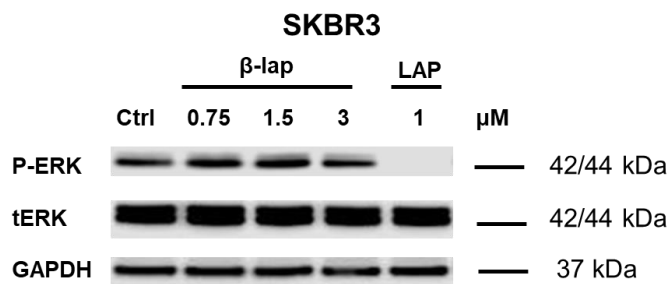
รูปที่ 32 β -lap ลดระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC2

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC2 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



รูปที่ 33 β -lap ลดระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ MCF-7/LCC9 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (* $p < 0.05$)



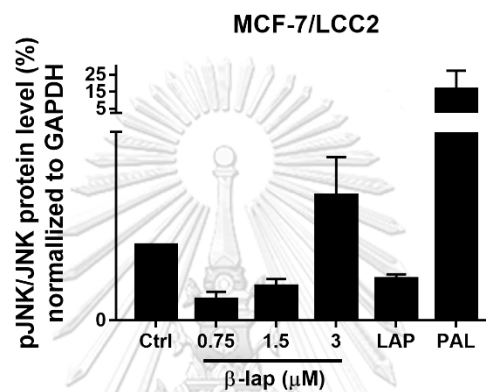
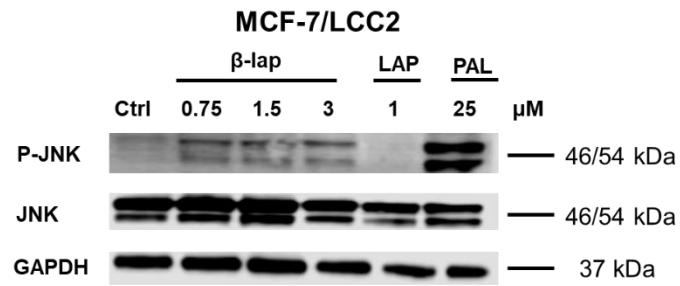
รูปที่ 34 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ SKBR3

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน pERK/ERK ในเซลล์ SKBR3 หลังจากได้รับ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (***) $p < 0.001$

ผลของ β -lap ต่อ pJNK/JNK

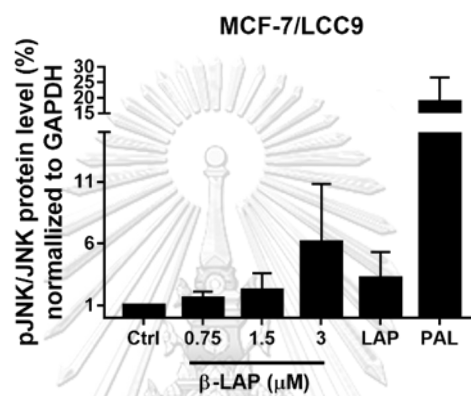
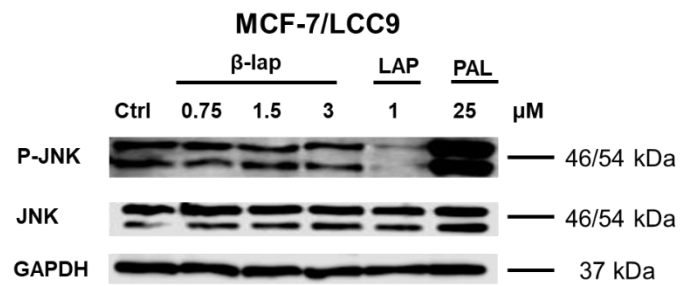
จากการศึกษาปริมาณโปรตีน pJNK/JNK พบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M โดยให้ LAP ความเข้มข้น 1 μ M และ PAL ความเข้มข้น 25 μ M เป็น anti-cancer control และให้ 0.1% DMSO เป็น negative control ในเซลล์ MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control ในขณะที่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control มีแนวโน้มลดระดับ pJNK/JNK แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน PAL มีแนวโน้มเพิ่ม pJNK/JNK เมื่อเทียบกับ negative control แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ **ดั่งรูปที่ 35-36** และพบว่า เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M ในเซลล์ SKBR3 β -lap ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน pJNK/JNK ได้เช่นกัน แต่ LAP ซึ่งเป็น anti-cancer control มีแนวโน้มลดระดับ pJNK/JNK ได้เช่นกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control **ดั่งรูปที่ 37**





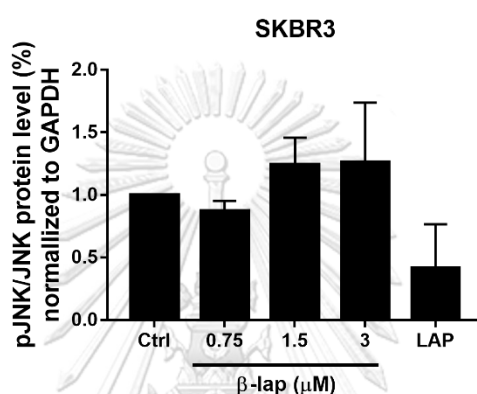
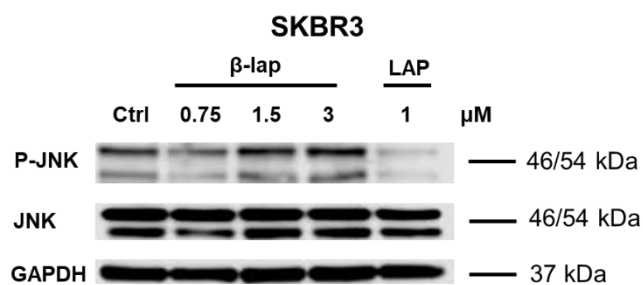
รูปที่ 35 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ MCF-7/LCC2

กราฟแสดงผลของ β -lap ต่อโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ MCF-7/LCC2 เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



รูปที่ 36 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ MCF-7/LCC9

กราฟแสดงผลของ β -lap ต่อโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ MCF-7/LCC9 เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M และ PAL 25 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



รูปที่ 37 β -lap ไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ SKBR3

กราฟแสดงผลของ β -lap ต่อโปรตีน pJNK/JNK ในเซลล์ SKBR3 เมื่อให้ β -lap ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 μ M และมี anti-cancer control คือ LAP 1 μ M เทียบกับกลุ่ม negative control คือ 0.1% DMSO โดยมี GAPDH เป็น internal control โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการทดลอง

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมถูกตรวจพบตัวรับฮอร์โมนในก้อนมะเร็งได้ประมาณร้อยละ 70 หรือพบการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนประมาณร้อยละ 20 (5) จากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเมื่อพบการดื้อยาต้านฮอร์โมน (anti-hormonal therapy) จะมีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้น (6) และยังพบว่าการส่งสัญญาณของตัวรับฮอร์โมนสามารถ crosstalk กับการส่งสัญญาณของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ จึงส่งผลให้การรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมนได้แก่ tamoxifen ซึ่งเป็นการรักษามาตรฐาน (standard treatment) ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนไม่ได้ผลและเกิดการดื้อยา (7) นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนบางรายยังต้องการรักษาที่จำเพาะต่อตัวรับฮอร์โมน (target therapy) เช่น trastuzumab และ lapatinib อีกด้วย (8, 9) แม้ว่าการพัฒนายาเพื่อรักษามะเร็งจากปัญหาการดื้อยาต้านฮอร์โมนยังมีอยู่อย่างต่อเนื่อง แต่ก็ยังมียาที่ใช้สำหรับมะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ PI-3K inhibitor หรือ CDK4/6 inhibitor ซึ่งก็พบอัตราการดื้อยาและการกลับมาเป็นซ้ำเพิ่มขึ้น (10, 11)

β -lapachone (β -lap) เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone จากการศึกษาที่ผ่านมาพบฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย ต้านจุลชีพ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งเต้านม (76) การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการทดสอบฤทธิ์ของ β -lap ในการต้านเซลล์มะเร็ง รวมถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

ผลการศึกษา พบว่า β -lapachone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 รวมถึงเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน SKBR3 cells ได้ โดยมีค่า IC_{50} ในระดับไมโครโมลาร์ (μ M) และพบว่าผลการยับยั้งเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นด้วย (concentration-dependent manner) ซึ่งสอดคล้องกับสารในกลุ่ม naphthoquinone ตัวอื่น เช่น plumbagin และ ethoxy mansonone G ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 (17) (77) นอกจากนี้ ค่า IC_{50} ของ β -lap ยังต่ำกว่า anti-cancer control ทั้ง LAP และ PAL ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนอีกด้วย

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า β -lap มีฤทธิ์ในการลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน โดยปกติในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนจะมี Cyclin D1 มากขึ้นซึ่งมีบทบาทใน Cyclin dependent kinase pathway ทำงานโดยการไปยับยั้ง RB tumor suppresser และทำให้เกิดการแสดงออกของ P21 ซึ่งเป็นหนึ่งในยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เซลล์จึงมีการแบ่งตัวตามวัฏจักรเซลล์ อีกทั้ง Cyclin D1 ยังเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tamoxifen อีกด้วย ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของ β -lap ต่อยีน P21 โปรตีน Cyclin D1 และ NCOA3 ซึ่งเป็น ER co-activator ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดื้อยาต้านฮอร์โมน จากผลการศึกษา พบว่า β -lap ไม่มีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกในระดับ mRNA ของ P21 gene แต่มีฤทธิ์ในการลดระดับโปรตีน Cyclin D1 และ NCOA3 ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chonsut และคณะ ในปี 2019 รายงานว่า Ethoxy mansonone G สารในกลุ่ม quinone มีฤทธิ์ลดระดับการแสดงออกของ Cyclin D1 และ NCOA3 ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (77) รวมถึง plumbagin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone มีฤทธิ์ลดระดับการแสดงออกของ NCOA3 ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนเช่นกัน (78) ในขณะที่ β -lap ไม่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน P21 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน Cyclin D1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของฮอร์โมน ดังนั้นการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า β -lap มีฤทธิ์ในการลดระดับโปรตีน Cyclin D1 และ NCOA3 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนสูงเท่านั้น แต่ไม่มีฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

การที่เซลล์มะเร็งเต้านมมีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ ลูกกลมและแพร่กระจายได้ภายในหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลือง นำมาสู่การศึกษาการยับยั้งการก่อมะเร็ง (tumorigenesis) หรือการศึกษาการเจริญแบบไร้การยึดเกาะ ด้วยวิธี soft agar assay ผลการศึกษาพบว่า β -lap สามารถลดจำนวนและขนาดของ colony ใน soft agar ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้งสองชนิดและในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ chonsut และคณะในปี 2019 พบว่า EMG สามารถลดทั้งขนาดและจำนวนของ colony ได้ใน soft agar ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้งสองชนิดเช่นเดียวกัน (77) และในปี 2004 Ough และคณะพบว่า β -lap สามารถลดจำนวน colony ใน colony formation และ anchorage independent growth ในเซลล์มะเร็งตับอ่อน จากการศึกษาจึงแสดงให้เห็นว่า β -lap สามารถยับยั้งการเจริญแบบไร้การยึดเกาะในระดับหลอดทดลองโดยมีการ

ลดลงของทั้งจำนวนและขนาดของ colony ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของเฮอรัททู

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) เป็นกระบวนการสำคัญขั้นตอนหนึ่งในการลุกลามของมะเร็ง (metastasis) ซึ่งการที่ epithelial cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและคุณสมบัติจนมีความคล้ายคลึงกับ mesenchymal cell นั้น เซลล์มะเร็งจะมีความสามารถในการยึดเกาะลดลง จึงสามารถเคลื่อนที่ ลุกกลาม และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นมากขึ้น (79) ผู้วิจัยเลือกใช้วิธี scratch assay ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์และวิธี Matrigel invasion assay ซึ่งเป็นวิธีศึกษาการลุกลามของเซลล์เพื่อยืนยันผลการทดลอง จากการศึกษาพบว่า β -lap ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนชนิด MCF-7/LCC9 และไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนชนิด MCF-LCC2 และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททู (SKBR3) แต่มีการศึกษาพบว่า Ethoxy mansonone G ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม quinone มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนชนิด MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 นอกจากนี้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone ก็มีการศึกษาที่พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มีตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน โพรเจสเทอโรน และเฮอรัททูชนิด MDA-MB-231 cells (80)

เนื่องจากการศึกษาทั้งวิธี scratch และ Matrigel invasion พบว่า β -lap ไม่มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนชนิด MCF-7/LCC9 และการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนชนิด MCF-7/LCC2 และเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัททู (SKBR3) เพื่อยืนยันผลการทดลองจึงศึกษาฤทธิ์ของ β -lap ต่อการยับยั้งการลุกลามและการแพร่ของเซลล์ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ *E-Cadherin* และ *Vimentin* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและ *MMP-9* และ *uPA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่า β -lap ไม่เพิ่มระดับการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *E-Cadherin* และไม่มีผลยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *Vimentin* *MMP-9* และ *uPA* รวมถึงศึกษาผลต่อระดับของโปรตีน HER2 ซึ่งการกระตุ้น HER2 pathway ส่งผลกระตุ้น PI3k/AKT และ phosphorylate SMAD3 ที่ตำแหน่ง S208 จากนั้นไปเข้าคู่กับ SMAD4 และพาเข้าสู่นิวเคลียสแล้วเกิดกระบวนการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ EMT และทำให้เกิดการ

เคลือบที่ของเซลล์ (81) จากการศึกษาพบว่า β -lap ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีน HER2 และ phosphorylated HER2 (pHER2) นอกจากนี้ lapatinib ซึ่งเป็น anti-cancer control ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง pHER2 ก็ไม่สามารถลด pHER2 ในเซลล์ที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนได้ ในขณะที่การศึกษาของ Yang และคณะในปี 2017 รายงานว่า β -lap สามารถลดกระบวนการ EMT ได้ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับเอสโตรเจน (MCF-7) และชนิดที่ไม่มีตัวรับฮอร์โมน (MDA-MB-231) นอกจากนี้สารในกลุ่ม naphthoquinone ได้แก่ plumbagin สามารถยับยั้ง EMT marker ได้ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้ง MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 (78) และสารในกลุ่ม naphthoquinone อีกตัวหนึ่งคือ ethoxy mansonone G สามารถยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของ MMP-9 และ uPA ได้ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้ง MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 เช่นกัน (77) จากการศึกษาจึงแสดงให้เห็นว่า β -lap ไม่มีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน HER2 ซึ่งเป็นตัวชักนำทำให้เกิดกระบวนการ EMT รวมไปถึงกระบวนการ invasion ด้วย ดังนั้น β -lap จึงไม่มีผลต่อกระบวนการ EMT และการยับยั้งการลุกลามของมะเร็ง

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสารในกลุ่ม naphthoquinone เช่น plumbagin shikonin และ biflorin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการส่งสัญญาณผ่าน PI3K/Akt pathway และ MAPK pathway ซึ่งเป็น downstream ของตัวรับฮอร์โมน (15) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน จึงศึกษาผลของ β -lap ต่อ การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน pAKT/AKT pERK/ERK และ JNK/SAPK จากการศึกษาพบว่า β -lap มีฤทธิ์เพิ่มระดับการ phosphorylation ของ AKT ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้ง MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ในขณะที่ β -lap ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ phosphorylation ของ AKT ใน SKBR3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ming-Hong Tsai และคณะ ในปี 2017 รายงานว่า Artocarpin เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยผ่านการเพิ่มขึ้นของ ROS และส่งผลกระทบต่อการทำงานของ phosphorylation ของ AKT ในเซลล์ non-small cell lung (82) นอกจากนี้ยังพบว่า PAL ซึ่งเป็น anti-cancer control ของการศึกษานี้ ทำให้ระดับ phosphorylation ของ AKT เพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Daniele Cretella และคณะในปี 2018 พบว่า PAL ส่งผลกระทบต่อ phosphorylation ของ AKT ในเซลล์มะเร็งเต้านม ชนิดที่ไม่มีตัวรับฮอร์โมน Triple-negative breast cancer เช่นกัน (83) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า β -lap มีฤทธิ์เพิ่มระดับการ phosphorylation

ของ AKT ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้ง MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ phosphorylation ของ AKT ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ HER2 โดยการเพิ่มขึ้นของระดับ phosphorylation ของ AKT น่าจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการ Apoptosis ตามลำดับ ซึ่งต้องดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

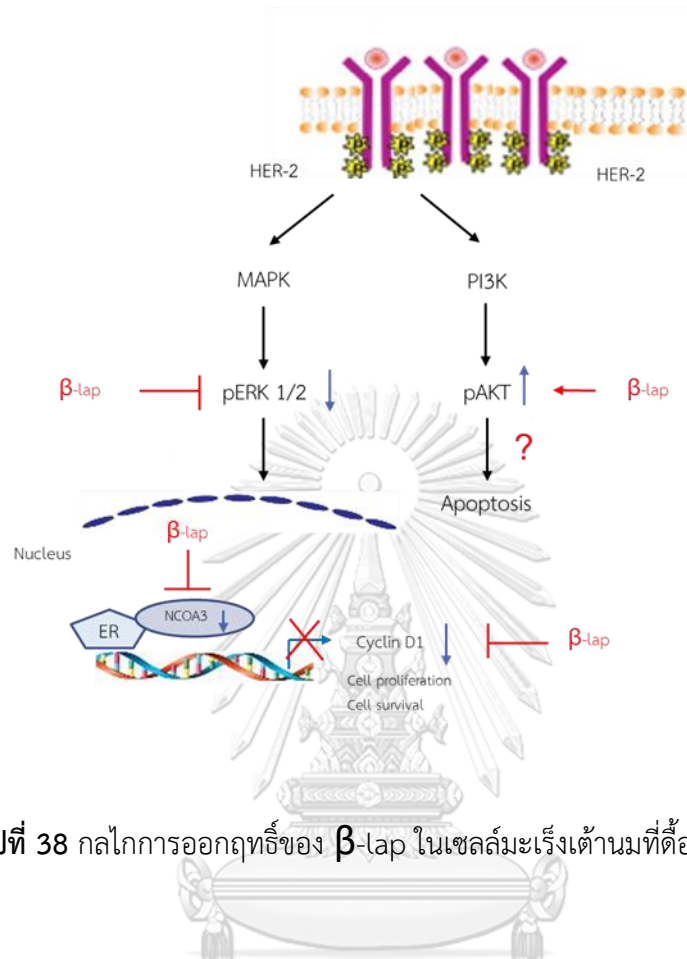
นอกจากนี้ยังพบว่า β -lap มีฤทธิ์ยับยั้งระดับการแสดงออก phosphorylation ของ ERK ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนทั้ง MCF-7/LCC2 และ MCF-7/LCC9 ซึ่งสอดคล้องกับสารธรรมชาติตัวอื่น ๆ ในกลุ่ม quinone ได้แก่ plumbagin ที่สามารถลดระดับการแสดงออก phosphorylation ของ ERK1/2 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน (17) รวมถึง 1,4-naphthoquinone (BQ) และ 2-(octane-1-sulfinyl)-1,4-naphthoquinone (OQ) สามารถลดระดับการแสดงออก phosphorylation ของ ERK1/2 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (57) นอกจากนี้ PAL ซึ่งเป็น anti-cancer control ของการศึกษานี้สามารถทำให้การ phosphorylation ของ ERK1/2 เพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Daniele Cretella และคณะในปี 2018 รายงานว่า PAL ไม่มีผลยับยั้งการแสดงออก phosphorylation ของ ERK1/2 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มีตัวรับฮอร์โมน triple negative breast cancer (83) และจากการศึกษานี้ยังพบว่า β -lap ไม่มีผลยับยั้งระดับการแสดงออก phosphorylation ของ JNK ในเซลล์เต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน และเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน

จากการศึกษาทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า β -lap สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนที่มีการเพิ่มขึ้นของตัวรับฮอร์โมนผ่านการลดระดับของโปรตีน pERK1/2 ซึ่งเป็น survival pathway และการลดระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ Cyclin D1 และการลดลงของ ER co-activator ได้แก่ NCOA3 ซึ่งการแสดงออกโปรตีนทั้งสองเป็นหนึ่งในกลุ่มที่สำคัญที่ทำให้เกิดดื้อยาต้านฮอร์โมน นอกจากนี้ β -lap สามารถลดจำนวนและขนาดของ colony ด้วยวิธี soft agar ซึ่งเป็นการทดลองเพื่อศึกษาการยับยั้งการก่อก้อนมะเร็งในระดับหลอดทดลอง ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า β -lap สามารถลดการเจริญเติบโตและลดการก่อก้อนมะเร็งเพื่อใช้เป็นข้อมูลเพื่อศึกษาต่อในสัตว์ทดลอง (84) นอกจากนี้ผลของ β -lap นี้ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างมากของ phosphorylation ของ AKT อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านการสร้าง reactive oxygen species (ROS) (82) ซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

ดังนั้นการศึกษานี้จึงสามารถสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนได้ดังนี้ β -lap สามารถลดระดับการแสดงออกในระดับโปรตีนของ pERK1/2 ซึ่งทำ

ให้เกิดการลดลงของ co-activator ได้แก่ NCOA3 ส่งผลต่อการลดลงของโปรตีนเป้าหมายของ เอสโตรเจนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ Cyclin D1 **ดั่งรูปที่ 38** แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า β -lap ไม่มีผลต่อระดับ pHER2 ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ EMT ได้ จึงเห็นได้ว่า β -lap ไม่มีผลต่อ EMT marker ต่าง ๆ และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ข้อสังเกตที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งจากการศึกษานี้คือ LAP ที่เป็นยามุ่งเป้าของมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนไม่สามารถลดระดับ HER-2 หรือ downstream signaling ของ HER-2 ในมะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนที่มีการแสดงออกของฮอร์โมนเพิ่มขึ้นได้ อาจเนื่องมาจาก HER2 มี autophosphorylation site หลายตำแหน่ง ได้แก่ (Tyr)1248, 1221/1222 และ 877 ซึ่งในบริเวณเหล่านี้เมื่อถูก phosphorylation แล้วจะทำให้ HER-2 มี function ที่แตกต่างกันออกไป (85) โดย antibody ที่ใช้ตรวจสอบ pHER-2 ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Tyr1221/1222 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า LAP ที่ออกฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนอาจจะยับยั้ง phosphorylation ในตำแหน่งที่ไม่ใช่ Tyr1221/1222 ซึ่งแตกต่างกันกับเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของฮอร์โมนสูงหรืออาจไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเลยซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้งานวิจัยในมนุษย์การให้ LAP ร่วมกับ letrozole ซึ่งเป็น aromatase inhibitor ในการรักษามะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมนและมีการเพิ่มขึ้นของ HER-2 (86) ดังนั้นการให้ LAP เพียงชนิดเดียวอาจไม่เพียงพอในผู้ป่วยกลุ่มนี้

Anti-hormonal resistant breast cancer cells

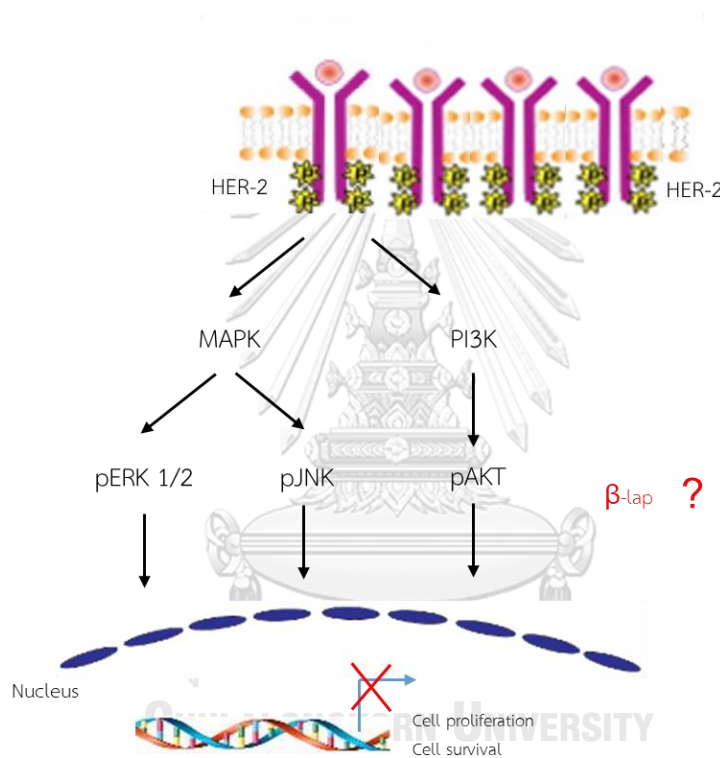


รูปที่ 38 กลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อยาต้านฮอร์โมน

สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัท (SKBR3) β -lap สามารถลดจำนวนและขนาดของ colony ด้วยวิธี soft agar ซึ่งเป็นการทดลองเพื่อศึกษาการยับยั้งการก่อก้อนมะเร็งในระดับหลอดทดลอง ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า β -lap อาจจะสามารถลดการเจริญเติบโตและลดการก่อก้อนมะเร็งหรือใช้เป็นข้อมูลเพื่อศึกษาต่อในสัตว์ทดลองต่อไป (84) แม้ว่าการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์ที่มีตัวรับเฮอรัทสูง (SKBR3) ได้ เนื่องจาก β -lap ไม่มีผลในการยับยั้ง HER-2 และ downstream signaling ต่าง ๆ ของ HER-2 ทั้ง pAKT/AKT, pERK/ERK และ JNK/SAPK แต่มีการศึกษาของสารในกลุ่ม quinone อีกหลายการศึกษาที่รายงานว่าการศึกษานี้พบว่า สารในกลุ่ม quinone เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านการสร้าง ROS และการเกิด cell cycle arrest (80) ในรูป 39 ทั้งนี้ ยังมีสาร Ramentaceone ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone จากการรายงาน พบว่า Ramentaceone สามารถยับยั้ง downstream signaling ต่าง ๆ ของ HER-2 ได้แก่ PI3K/AKT ในเซลล์ SKBR3 และ BT474 แต่ขณะนี้ ผู้วิจัยหลัก

(Kawiak A, Lojkowska E) ขอถอนวารสารทางวิชาการออกเนื่องจากผลการทดลองที่ได้จากบริษัท ภายนอกยังขาดข้อมูลในการสนับสนุนผลการทดลอง ผู้วิจัยหลักจึงต้องการทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อ ความแม่นยำในผลการทดลอง (13) ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษากลไกของ β -lap ในเซลล์ SKBR3 นี้ ต่อไป

HER-2 over-expressed breast cancer cells



รูปที่ 39 กลไกการออกฤทธิ์ของ β -lap ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของตัวรับเฮอรัท

บรรณานุกรม

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(6):449-58.
3. Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012;9(5):311-20.
4. Kondov B, Milenkovic Z, Kondov G, Petrushevska G, Basheska N, Bogdanovska-Todorovska M, et al. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(6):961-7.
5. Kittaneh M, Montero AJ, Gluck S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomark Cancer.* 2013;5:61-70.
6. Yin L, Zhang XT, Bian XW, Guo YM, Wang ZY. Disruption of the ER- α 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(9):107369.
7. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast Cancer Research.* 2015;17(1):1-13.
8. Ruprecht B, Zaal EA, Zecha J, Wu W, Berkers CR, Kuster B, et al. Lapatinib resistance in breast cancer cells is accompanied by phosphorylation-mediated reprogramming of glycolysis. *Cancer research.* 2017;77(8):1842-53.
9. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. *Clinical cancer research.* 2009;15(24):7479-91.
10. Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, Rivas MA, Cutts RJ, Garcia-Murillas I, et al. Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer research.* 2016;76(8):2301-13.

11. Pandey K, An HJ, Kim SK, Lee SA, Kim S, Lim SM, et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. *International Journal of Cancer*. 2019;145(5):1179-88.
12. Kung HN, Lu KS, Chau YP. The chemotherapeutic effects of lapacho tree extract: β -lapachone. *Chemotherapy*. 2014;3(2):131-5.
13. Kawiak A, Lojkowska E. Ramentaceone, a naphthoquinone derived from *Drosera* sp., induces apoptosis by suppressing PI3K/Akt signaling in breast cancer cells. *PLoS One*. 2016;11(2):0147718.
14. Montenegro RC, Burbano RR, Silva MN, Lemos TG, Vasconcellos MC. Biflorin, a naphthoquinone, inhibits egfr in breast cancer cells. *Med Chem*. 2013;3:179-82.
15. Lin KH, Huang MY, Cheng WC, Wang SC, Fang SH, Tu HP, et al. RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
16. Yang Y, Zhou X, Xu M, Piao J, Zhang Y, Lin Z, et al. β -lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-13.
17. Sakunrangsit N, Ketchart W. Plumbagin inhibited AKT signaling pathway in HER-2 overexpressed-endocrine resistant breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2020;868:172878.
18. Gerber DE, Beg MS, Fattah F, Frankel AE, Fatunde O, Arriaga Y, et al. Phase 1 study of ARQ 761, a β -lapachone analogue that promotes NQO1-mediated programmed cancer cell necrosis. *British journal of cancer*. 2018;119(8):928-36.
19. ClinicalTrials.gov [Internet]. 2012 January 2 - . Identifier NCT01502800, Clinical Trial of ARQ 761 in Advanced Solid Tumors; 2011 October 18 [cited 2020 August 24] Available from : <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01502800>.
20. ClinicalTrials.gov [Internet]. 2015 August 3 - . Identifier NCT02514031, ARQ-761 Treatment With Gemcitabine/Nab-Paclitaxel Chemotherapy In Pancreatic Cancer; 2016 March 24 [cited 2020 August 24]. Available from : <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02514031>.

21. ClinicalTrials.gov [Internet]. 2018 July 2 - . Identifier NCT03575078, ARQ761 + PARP Inhibitor in Refractory Solid Tumors. 2018 June 25 [cited 2020 August 24]. Available from : <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03575078>.
22. Parsa Y, Mirmalek SA, Kani FE, Aidun A, Salimi Tabatabaee SA, Yadollah-Damavandi S, et al. A review of the clinical implications of breast cancer biology. *Electronic physician*. 2016;8(5):2416.
23. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World journal of clinical oncology*. 2014;5(3):412.
24. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(19):10869-74.
25. Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *nature*. 2002;415(6871):530-6.
26. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(18):10393-8.
27. Harbeck N, Penault Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):66.
28. Fahrudin TM, Syarif I, Barakbah AR. Data mining approach for breast cancer patient recovery. *EMITTER International Journal of Engineering Technology*. 2017;5(1):36-71.
29. Libson S, Lippman M. A review of clinical aspects of breast cancer. *International review of psychiatry*. 2014;26(1):4-15.
30. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*. 2015;14(3):196-202.
31. Adeel M, Song X, Wang Y, Francis D, Yang Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environment international*. 2017;99:107-19.

32. Jia M, Dahlman Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2015;29(4):557-68.
33. Hua H, Zhang H, Kong Q, Jiang Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Experimental hematology & oncology*. 2018;7(1):1-11.
34. Huang B, Warner M, Gustafsson J. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;418 240-4.
35. Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, et al. Molecular determinants of nuclear receptor–corepressor interaction. *Genes & development*. 1999;13(24):3198-208.
36. Haque M, Desai KV. Pathways to endocrine therapy resistance in breast cancer. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:573.
37. Burandt E, Jens G, Holst F, Jänicke F, Müller V, Quaas A, et al. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2013;137(3):745-53.
38. Noblejas López MdM, Morcillo García S, Nieto Jiménez C, Nuncia Cantarero M, Győrfy B, Galan Moya EM, et al. Evaluation of transcriptionally regulated genes identifies NCOR1 in hormone receptor negative breast tumors and lung adenocarcinomas as a potential tumor suppressor gene. *PloS one*. 2018;13(11):0207776.
39. Mottis A, Mouchiroud L, Auwerx J. Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes & development*. 2013;27(8):819-35.
40. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(14):974-84.
41. Li SG, Li L. Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomedical Reports*. 2013;1(4):499-505.
42. Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas*. 2004;49(1):2-15.
43. Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *International journal of cancer*. 2010;127(8):1748-57.

44. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 1998;351(9114):1451-67.
45. An KC. Selective estrogen receptor modulators. *Asian spine journal*. 2016;10(4):787.
46. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology & therapeutics*. 2018;186:1-24.
47. Gonnelli S, Petrioli R. Aromatase inhibitors, efficacy and metabolic risk in the treatment of postmenopausal women with early breast cancer. *Clinical interventions in aging*. 2008;3(4):647.
48. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(24):2431-42.
49. Gonzalez-Angulo AM, Morales Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Breast Cancer Chemosensitivity*: Springer; 2007. p. 1-22.
50. Luqmani YA, Alam Eldin N. Overcoming resistance to endocrine therapy in breast cancer: new approaches to a nagging problem. *Medical Principles and Practice*. 2016;25(Suppl. 2):28-40.
51. Lv Q, Meng Z, Yu Y, Jiang F, Guan D, Liang C, et al. Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(12):2095.
52. Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast cancer research*. 2015;17(1):60.
53. Dittrich A, Gautrey H, Browell D, Tyson Capper A. The HER2 signaling network in breast cancer—like a spider in its web. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2014;19(3-4):253-70.
54. Li L, Zhao GD, Shi Z, Qi LL, Zhou LY, Fu ZX. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncology letters*. 2016;12(5):3045-50.

55. Kawiak A, Domachowska A, Krolicka A, Smolarska M, Lojkowska E. 3-Chloroplumbagin induces cell death in breast cancer cells through MAPK-mediated Mcl-1 inhibition. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:784.
56. Zang YQ, Feng YY, Luo YH, Zhai YQ, Ju XY, Feng YC, et al. Quinalizarin induces ROS-mediated apoptosis via the MAPK, STAT3 and NF- κ B signaling pathways in human breast cancer cells. *Molecular medicine reports*. 2019;20(5):4576-86.
57. Wang H, Luo YH, Shen GN, Piao XJ, Xu WT, Zhang Y, et al. Two novel 1, 4-naphthoquinone derivatives induce human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest by regulating reactive oxygen species-mediated MAPK/Akt/STAT3 signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*. 2019;20(3):2571-82.
58. Peterson NC, Servinsky MD, Christian A, Peng Z, Qiu W, Mann J, et al. Tamoxifen resistance and Her2/neu expression in an aged, irradiated rat breast carcinoma model. *Carcinogenesis*. 2005;26(9):1542-52.
59. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-92.
60. Sarrió D, Rodríguez Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research*. 2008;68(4):989-97.
61. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast cancer research*. 2011;13(3):1-11.
62. Carpenter RL, Paw I, Dewhirst MW, Lo HW. Akt phosphorylates and activates HSF-1 independent of heat shock, leading to Slug overexpression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene*. 2015;34(5):546-57.
63. Yamaguchi H, Hsu J, Hung MC. Regulation of ubiquitination-mediated protein degradation by survival kinases in cancer. *Frontiers in oncology*. 2012;2:15.
64. Li Y, Li CJ, Yu D, Pardee AB. Potent induction of apoptosis by β -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. *Molecular Medicine*. 2000;6(12):1008-15.

65. De Almeida ER, Lucena FRS, Silva CVNS, da Silva Costa Junior W, Cavalcanti JB, Couto GBL, et al. Toxicological assessment of beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009;23(9):1276-80.
66. Almeida ERd. Preclinical and clinical studies of lapachol and beta-lapachone. *The Open Natural Products Journal*. 2009;2(1).
67. Bey EA, Bentle MS, Reinicke KE, Dong Y, Yang CR, Girard L, et al. An NQO1-and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(28):11832-7.
68. Huang L, Pardee AB. β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Molecular Medicine*. 1999;5(11):711-20.
69. Lai CC, Liu TJ, Ho LK, Don MJ, Chau YP. β -Lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol Histopathol*. 1998;13(1):89-97.
70. Pink JJ, Planchon SM, Tagliarino C, Varnes ME, Siegel D, Boothman DA. NAD (P) H: quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(8):5416-24.
71. Kawiak A, Domachowska A, Jaworska A, Lojkowska E. Plumbagin sensitizes breast cancer cells to tamoxifen-induced cell death through GRP78 inhibition and Bik upregulation. *Scientific Reports*. 2017;7:43781.
72. Li CJ, Li YZ, Pinto AV, Pardee AB. Potent inhibition of tumor survival in vivo by β -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(23):13369-74.
73. Boorstein RJ, Pardee AB. β -Lapachone greatly enhances MMS lethality to human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;118(3):828-34.
74. Park SH, Jeong SH, Kim SW. β -Lapachone Regulates the Transforming Growth Factor- β —Smad Signaling Pathway Associated with Collagen Biosynthesis in Human Dermal Fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;15-00730.

75. Pradubiyat N, Sakunrangsit N, Mutirangura A, Ketchart W. NADPH: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) mediated anti-cancer effects of plumbagin in endocrine resistant MCF7 breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2020;66:153133.
76. Pardee AB, Li Y, Li CJ. Cancer therapy with β -lapachone. *Current cancer drug targets*. 2002;2(3):227-42.
77. Chonsut P, Mahalapbutr P, Pradubiyat N, Chavasiri W, Wonganan P, Ketchart W. Ethoxy mansonone G as an anticancer agent in estrogen receptor-positive and endocrine-resistant breast cancer. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(12):1839-53.
78. Sakunrangsit N, Kalpongkukul N, Pisitkun T, Ketchart W. Plumbagin enhances tamoxifen sensitivity and inhibits tumor invasion in endocrine resistant breast cancer through EMT regulation. *Phytotherapy Research*. 2016;30(12):1968-77.
79. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(2):13.
80. Liew K, Yong PVC, Lim YM, Navaratnam V, Ho ASH. 2-Methoxy-1, 4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicology in Vitro*. 2014;28(3):335-9.
81. Gupta P, Srivastava SK. HER2 mediated de novo production of TGF β leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Molecular oncology*. 2014;8(8):1532-47.
82. Tsai MH, Liu JF, Chiang YC, Hu SCS, Hsu LF, Lin YC, et al. Artocarpin, an isoprenyl flavonoid, induces p53-dependent or independent apoptosis via ROS-mediated MAPKs and Akt activation in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(17):28342.
83. Cretella D, Ravelli A, Fumarola C, La Monica S, Digiacomo G, Cavazzoni A, et al. The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):1-12.
84. Ough M, Lewis A, Bey EA, Gao J, Ritchie JM, Bornmann W, et al. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. *Cancer biology & therapy*. 2005;4(1):102-9.

85. Hayashi N, Iwamoto T, Gonzalez-Angulo AM, Ferrer Lozano J, Lluch A, Niikura N, et al. Prognostic impact of phosphorylated HER-2 in HER-2+ primary breast cancer. *The oncologist*. 2011;16(7):956.
86. Segovia Mendoza M, González González ME, Barrera D, Díaz L, García Becerra R. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *American journal of cancer research*. 2015;5(9):2531.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	CHAYANIN SUKSANONG
วัน เดือน ปี เกิด	19 October 1992
สถานที่เกิด	Saraburi
วุฒิการศึกษา	Faculty of Medicine
ที่อยู่ปัจจุบัน	359/781 Aspire Sathorn-Thapra, Ratchaphruek Rd. Bukkhalo, Thonburi, Bangkok 10600



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY