

ผลยับยั้งของไซพรีพิดีนต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอด
ชนิดไม่ใช่เซลล์เล็กผ่านวิถีของเอเคที



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INHIBITORY EFFECT OF CYPRIPEDIN ON EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN
NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS VIA AKT PATHWAY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology and
Toxicology

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลยับยั้งของไซพรีฟิดินต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อ
ผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์
เล็กผ่านวิถีของเอเคที

โดย

นางสาวสุรัสวดี ตรีสุวรรณ

สาขาวิชา

เภสัชวิทยาและพิษวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.วริษา พงศ์เรขนา
นนท์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพชร สกุลบำรุงศิลป์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.ธงชัย สุขเสวต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.วริษา พงศ์เรขนา
นนท์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.รัตยา ลือชาพุมิพร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์)

สุรัสวดี ตรีสุวรรณ : ผลยับยั้งของไซพริพิดีนต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็กผ่านวิถีของเอเคที (INHIBITORY EFFECT OF CYPRIPIEDIN ON EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS VIA AKT PATHWAY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: ผศ. ภาณุ. ดร.วริษา พงศ์เรขานนท์, 137 หน้า.

มะเร็งปอดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งอันดับต้นๆ ของผู้ป่วยจากทั่วโลกและยังคงมีผู้ป่วยเสียชีวิตมากขึ้นในทุกปี สาเหตุเนื่องมาจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกระบวนการหลายขั้นตอนที่ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งหลุดออกจากอวัยวะต้นกำเนิดไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งกลไกที่สำคัญของการแพร่กระจายคือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันยังไม่สามารถยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาพัฒนายาใหม่โดยมีเป้าหมายในการยับยั้งกระบวนการนี้ จึงเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในการรักษามะเร็งให้เกิดประสิทธิภาพ ในผลการศึกษาคั้งนี้พบว่าสารไซพริพิดีนซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มฟีนานทรินควิโนน สกัดได้จากกล้วยไม้สกุล *Dendrobium densiflorum* สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดชนิดเอช 460 และเอช 23 ได้ โดยลดจำนวนของเส้นใยแอกตินสเตรสไฟเบอร์ และ โฟคอลแอดฮีชัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ภายใต้สภาวะไร้การยึดเกาะได้ การศึกษาในเชิงกลไกแสดงให้เห็นว่าสารไซพริพิดีนยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ และลดการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ ได้แก่ สลัก เอ็น-แคดฮีริน และไวเมนติน ผ่านการยับยั้งการทำงานของวิถีเอเคที ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของจีเอสเค-3เบตาในการเพิ่มการทำลายโปรตีนสลัก งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารไซพริพิดีนสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดโดยผ่านการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยและพัฒนาสารดังกล่าวเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปอดต่อไปในอนาคต

ภาควิชา เกษัตริศาสตร์และสัตวศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา เกษัตริศาสตร์และพืชศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

5976119933 : MAJOR PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

KEYWORDS: การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ / การแพร่กระจายของมะเร็ง / มะเร็งปอด / วิถีเอเคที / ไซพริพีดิน

SURASSAWADEE TREESUWAN: INHIBITORY EFFECT OF CYPRIPEDIN ON EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS VIA AKT PATHWAY. ADVISOR: ASST. PROF. VARISA PONGRAKHANANON, Ph.D., 137 pp.

Lung cancer is the most leading cause of cancer death in human worldwide. The mortality remains gradually increase in every year due to cancer metastasis. Metastasis is a multiple process that promotes cancer dissemination from origin to distant sites, which the important mechanism is the acquisition of epithelial to mesenchymal transition (EMT). Current therapies available have less efficient to suppress EMT; therefore, the discovery of new drugs that target to this process might improve clinical outcome. This study demonstrated that cypripedin, a phenanthrenequinone, isolated from *Dendrobium densiflorum*, was able to inhibit cell migration in non-small cell lung cancer H460 and H23 cells with a significant decrease number of actin stress fiber and focal adhesion, and suppressed an anchorage-independent growth. Mechanistic investigation shows that cypripedin attenuated EMT and down-regulated EMT markers including Slug, N-cadherin and Vimentin. Akt became inactivated, thereby in turn stimulated GSK-3 β - mediated Slug degradation following the treatment. This study provides the scientific information of cypripedin-inhibiting EMT which could benefit to develop of this compound for cancer therapy.

Department: Pharmacology and
Physiology

Student's Signature

Advisor's Signature

Field of Study: Pharmacology and
Toxicology

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของ ผศ. ภาณุ. ดร.วริษา พงศ์เรขานานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา สอนงาน ตรวจงาน และความช่วยเหลืออื่นๆ ในทุกด้าน พร้อมทั้งให้โอกาสในการเรียนรู้และเก็บเกี่ยวประสบการณ์ต่างๆ ที่มีคุณค่าในขณะทำงานวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ภก. ดร.ปิติ จันทรวรโชติ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ภก. ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์ ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ สำหรับสารสกัดที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ภาณุ. ดร.สุดจิต ล้วนพิชญ์พงศ์ จากศูนย์ความเป็นเลิศทางงานวิจัยสเต็มเซลล์ของศิริราช สังกัดงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับ Akt plasmid ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ภก. ดร.ธงชัย สุขเสวต ประธานหลักสูตรและประธานสอบ ผศ. ภาณุ. ดร.รัตยา ลือชาพุดผิพร กรรมการสอบ และ ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ หัวหน้างานวิจัยสมุนไพรและการแพทย์ผสมผสาน สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรรมการภายนอกคณะสำหรับการเสียสละเวลาเพื่อเป็นประธานและกรรมสอบ และข้อเสนอแนะ คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณหน่วยงานต้นสังกัด คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช สำหรับโอกาส และทุนการศึกษา

ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรทุกท่านในภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือทุกอย่าง ตลอดการเรียนในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมห้องวิจัย เพื่อนๆ ในภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ในการดำเนินงานวิจัยด้วยดีมาโดยตลอด

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัวของผู้วิจัยที่สนับสนุน ช่วยเหลือ และให้กำลังใจ จนกระทั่งการเรียนในระดับมหาบัณฑิตและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 คำสำคัญ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
2.1 โรคมะเร็งปอด.....	4
2.2 การแพร่กระจายของมะเร็ง.....	12
2.3 การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์.....	14
2.4 Actin stress fiber และ Focal adhesion.....	24
2.5 วิธี AKT-dependent tyrosine kinase (Akt).....	28
2.6 วิธี Extracellular signal-regulated kinase (ERK).....	32
2.7 ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง Akt ในปัจจุบัน.....	34
2.8 ไสพรินทีดิน.....	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39

3.1 วัสดุและอุปกรณ์	39
3.2 รูปแบบงานวิจัย	43
3.3 การออกแบบการทดลอง	44
3.4 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	54
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	55
4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารไซพรีฟิดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460.....	55
4.2 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460.....	57
4.3 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อลักษณะเซลล์มีเซนไคม์	58
4.4 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อการเรียงตัวของ Actin stress fiber และการสร้าง Focal adhesion ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460.....	67
4.5 การทดสอบผลของไซพรีฟิดินต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อผิวในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460.....	69
4.6 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อปริมาณ mRNA ของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์ และเซลล์เยื่อผิวในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460	71
4.7 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อค่าครึ่งชีวิตของ Slug และกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460	72
4.8 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อวิถี ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460	77
4.9 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23	87
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	93
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก.....	116
ภาคผนวก ก การเจือจาง Antibodies และ ส่วนประกอบสารละลาย.....	117
ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ.....	123

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 137



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงความเข้มข้น เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง และกลไกของสารต่อเซลล์มะเร็ง
 ของสารต่างๆ ที่สกัดจาก *Dendrobium densiflorum*.....38

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับของ Primers ที่ใช้ในการทดลอง.....50

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน Slug 76



สารบัญรูป

หน้า

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ใหม่โดยประมาณในปี ค.ศ. 2017.....	4
รูปที่ 2.2 แสดงชนิดมะเร็งที่มีการเสียชีวิตโดยประมาณประจำปี ค.ศ. 2017.....	5
รูปที่ 2.3 อัตราการรอดชีวิตใน 5 ปีหลังจากได้รับการวินิจฉัย โดยแบ่งตามระยะของโรค ใน สหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 2006-2012.....	6
รูปที่ 2.4 ชนิดของโรคมะเร็งปอด.....	7
รูปที่ 2.5 กระบวนการการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง.....	13
รูปที่ 2.6 รูปแสดงกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์.....	14
รูปที่ 2.7 แสดงวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็น เซลล์มีเซนไคม์.....	15
รูปที่ 2.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะและโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการการเปลี่ยนแปลง จากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์.....	16
รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน Cadherin.....	17
รูปที่ 2.10 โปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นและยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CDH1</i> ที่ถอดรหัสโปรตีน E-Cadherin.....	18
รูปที่ 2.11 แสดงโปรตีนควบคุมที่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน <i>CDH2</i> ที่ถอดรหัสโปรตีน N-Cadherin.....	19
รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างโปรตีน Snail และ Slug.....	20
รูปที่ 2.13 วิถีสัญญาณที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน <i>SNAI1</i> ที่ถอดรหัสโปรตีน Snail.....	21
รูปที่ 2.14 วิถีสัญญาณที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน <i>SNAI2</i> ที่ถอดรหัสโปรตีน Slug.....	22
รูปที่ 2.15 โปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน <i>VIM</i> ที่ถอดรหัสโปรตีน Vimentin.....	23
รูปที่ 2.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ Focal adhesions และ Actin ในระหว่างที่เซลล์มีการ เคลื่อนที่.....	24
รูปที่ 2.17 แสดงชนิดและตำแหน่งของ Stress fiber, Transverse arcs, Dorsal stress fiber, Ventral stress fiber และ Focal adhesion.....	25
รูปที่ 2.18 แสดงวิถีสัญญาณของ Paxillin ในการควบคุม Focal adhesion.....	27
รูปที่ 2.19 วิถีสัญญาณ Akt-dependent tyrosine kinase (Akt).....	29
รูปที่ 2.20 แสดงการทำงานของวิถี Akt/GSK-3 β ต่อโปรตีน Snail และ Slug.....	30
รูปที่ 2.21 แสดงกลไกการสร้าง Filopodia, Lamellipodia และ Stress fiber ผ่านวิถี Akt.....	31

รูปที่ 2.22 วิธีสัญญาณ Extracellular signal-regulated kinase (ERK) ต่อการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์.....	33
รูปที่ 2.23 (ก) ดอกของ <i>Dendrobium densiflorum</i> (ข) โครงสร้างของ Cypripedin (1-4 phenanthrenequinone).....	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
รูปที่ 3.1 รูปแบบงานวิจัย.....	43
รูปที่ 3.2 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	54
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
รูปที่ 4.1 แสดงกราฟระหว่างอัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดินในเซลล์ H460 เมื่อทดลองด้วยวิธี MTT.....	55
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ H460 เมื่อทดลองด้วยวิธีย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst 33342 และกราฟระหว่างร้อยละของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอโทซิส กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน.....	56
รูปที่ 4.3 แสดงกราฟระหว่างอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดินในเซลล์ H460 เมื่อทดลองด้วยวิธี MTT.....	57
รูปที่ 4.4 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Wound healing โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน.....	59
รูปที่ 4.5 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Wound healing โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน.....	60
รูปที่ 4.6 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Wound healing โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน.....	61
รูปที่ 4.7 แสดงจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อกัน เมื่อทดลองด้วยวิธี Transwell โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างจำนวนเซลล์เคลื่อนที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน.....	62

รูปที่ 4.8 แสดงรัศมีของเซลล์ที่เคลื่อนที่ออกจากกลุ่มก้อนเซลล์มะเร็งเมื่อทดลองด้วยวิธี *In vitro* tumor spheroid-based migration และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดิน.....64

รูปที่ 4.9 แสดงจำนวนและขนาดโคโลนี เมื่อทดลองด้วยวิธี Colony formation โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างจำนวนเซลล์เคลื่อนที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดิน.....66

รูปที่ 4.10 แสดงจำนวนและตำแหน่ง Actin stress fiber และ Focal adhesion เมื่อทดลองด้วยวิธี Immunofluorescence โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างจำนวน Actin stress fiber และ Focal adhesion ต่อเซลล์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดิน.....68

รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดิน.....70

รูปที่ 4.12 แสดงกราฟระหว่างปริมาณ mRNA สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดิน เมื่อทดลองด้วยวิธี qRT-PCR โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....71

รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณโปรตีน Slug เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 กับสาร CHX และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีน Slug สัมพันธ์กับเวลา.....73

รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณโปรตีน Slug เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 กับสาร MG132 และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีน Slug สัมพันธ์กับเวลา.....75

รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณโปรตีน Ubiquitin ที่ติดอยู่กับโปรตีน Slug เมื่อทดลองด้วยวิธี Immunoprecipitation โดยบ่มเซลล์ H460 กับ MG132 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มสารไซพรีฟิดินที่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....77

รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณโปรตีนในวิถี ERK เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-ERK/ERK ที่ความเข้มข้นของไซพรีฟิดินที่แตกต่างกัน.....78

รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณโปรตีนในวิถี Akt และ GSK-3 β เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3 β /GSK-3 β ที่ความเข้มข้นของไซพรีฟิดินที่แตกต่างกัน.....80

รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณโปรตีนในวิถี Akt และ GSK-3 β เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 กับสาร LY294002 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3 β /GSK-3 β ที่ความเข้มข้นของ LY294002 ที่แตกต่างกัน.....82

รูปที่ 4.19 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Wound healing โดยบ่มเซลล์ H460 กับสาร LY294002 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ LY294002.....83

รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณโปรตีนในวิถี Akt ของเซลล์ H460 ที่ถูก Transfect ด้วย Akt plasmid และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์ของ p-Akt และ Akt ของเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการ Transfect ด้วย Akt plasmid.....84

รูปที่ 4.21 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Wound healing โดยบ่มเซลล์ H460 ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกของ Akt แล้ว กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการ Transfect ด้วย Akt plasmid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพรีฟิดิน.....85

รูปที่ 4.22 แสดงปริมาณโปรตีนในวิถี Akt, GSK-3 β และ Slug เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H460 ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกของ Akt กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β และ Slug ในแต่ละกลุ่มเซลล์ ที่ความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดินที่แตกต่างกัน.....86

รูปที่ 4.23 แสดงกราฟระหว่างอัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดินในเซลล์ H23 เมื่อทดลองด้วยวิธี MTT.....87

รูปที่ 4.24 แสดงกราฟระหว่างอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดินในเซลล์ H23 เมื่อทดลองด้วยวิธี MTT.....88

รูปที่ 4.25 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Wound healing โดยบ่มเซลล์ H23 กับสารไซพรีฟิดินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพรีฟิดิน.....89

รูปที่ 4.26 แสดงปริมาณโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H23 กับสารไซพรีฟิดินที่เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีฟิดิน.....90

รูปที่ 4.27 แสดงปริมาณโปรตีนในวิถี Akt และ GSK-3 β เมื่อทดลองด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ H23 กับสารไซพรีฟิตินที่เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3 β /GSK-3 β ที่ความเข้มข้นของไซพรีฟิตินที่แตกต่างกัน.....91

บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

รูปที่ 5.1 แสดงแผนภาพสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของสารไซพรีฟิตินในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอด.....98



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปอดเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตมากที่สุดทั้งในเพศหญิงและเพศชายเมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น และผู้ป่วยรายใหม่มีแนวโน้มมากขึ้นทุกปี ผู้ป่วยมะเร็งปอดในระยะแรกจะไม่แสดงอาการ จนกระทั่งโรคดำเนินไปถึงระยะแพร่กระจายจึงจะแสดงอาการ เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยส่วนมากได้รับการวินิจฉัยช้า จากสถิติพบว่าหากผู้ป่วยมะเร็งปอดอยู่ในระยะแพร่กระจายจะมีอัตราการเสียชีวิตภายใน 5 ปี สูงกว่ามะเร็งชนิดอื่น (Siegel et al., 2017) ยิ่งไปกว่านั้นมะเร็งในระยะแพร่กระจายจะรักษาได้ยากกว่ามะเร็งปฐมภูมิ (Nurwidya et al., 2012; Voulgari et al., 2009) ดังนั้นการยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งจึงสำคัญอย่างมากต่อการรักษาโรค

การแพร่กระจายของมะเร็งคือกระบวนการที่เซลล์มะเร็งจากอวัยวะปฐมภูมิ แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นและก่อกำเนิดเป็นก้อนมะเร็งทุติยภูมิได้ทั่วร่างกาย การแพร่กระจายของมะเร็งจัดเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของโรคมะเร็ง (Hanahan and Weinberg, 2011) การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์เป็นกระบวนการเริ่มแรกที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของมะเร็ง (Valastyan and Weinberg, 2011; Ye et al., 2015) โดยเซลล์มะเร็งจะมีแรงยึดเกาะระหว่างเซลล์น้อยลง และมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงเป็นรูปกระสวย ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มีเซนไคม์มากขึ้นเพื่อเอื้อต่อการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Zhao et al., 2015) การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของโปรตีน N-cadherin (N-Cad) และการลดลงของโปรตีน E-cadherin (E-Cad) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะระหว่างเซลล์ โดยการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ถูกควบคุมภายใต้โปรตีน Snail และ Slug (Wheelock et al., 2008; Shih and Yang, 2011) นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Vimentin ซึ่งเป็นเส้นใยโปรตีนสำคัญที่พบในเซลล์มีเซนไคม์ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ในการแทรกผ่านเยื่อฐาน (Liu et al., 2015)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็กซึ่งเป็นมะเร็งที่พบอุบัติการณ์เกิดโรคมามากถึงร้อยละ 89 ของโรคมะเร็งปอดทั้งหมด มีการทำงานของวิถี Akt มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ (Brognerd et al., 2001) ซึ่งวิถี Akt เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง และยังเป็นวิถีที่สำคัญอย่างมากต่อการเกิดกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Larue and Bellacosa, 2005) ดังนั้นวิถี Akt จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ยังไม่สามารถรักษามะเร็งที่เกิดกระเพาะกระจายแล้วได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าจะมีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและวิธีการรักษาในรูปแบบใหม่แล้วก็ตาม (Shang et al., 2013; Naci et al., 2017) จากปัญหาข้างต้นจึงเป็นที่มาและความสำคัญในการหาสารที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่ามีสารสกัดต่างๆที่ได้จากพืชซึ่งมีสรรพคุณในการรักษาโรค รวมทั้งสารสำคัญจากกล้วยไม้ *Dendrobium densiflorum* เช่น ใจแกนทอล มอสคาทิลิน ทริสทิน นารินจีนิน และไฮโมอีรีโอติสไทออล (Fan et al., 2001) และมีผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากกล้วยไม้ที่มีโครงสร้างเป็น Phenolic มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านมะเร็ง ได้แก่ สารนารินจีนิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Kanno et al., 2005; Arul and Subramanian, 2013) สารลูทีโอลินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส (Tanagornmeatar et al., 2014) และสารมอสคาทิลินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายและการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้ (Kowitdamrong et al., 2013; Charoenrungruang et al., 2014; Unahabhokha et al., 2016a)

นอกจากนั้นสารสำคัญจากไซฟริพิตินเป็นสารที่มีโครงสร้างในกลุ่ม Phenanthrenequinone สกัดจากกล้วยไม้ชนิดเดียวกัน มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ เช่น ยับยั้งอาการปวดเกร็ง กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง ช่วยให้นอนหลับ ระงับประสาท (Singh and Duggal, 2009) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของสารไซฟริพิตินต่อการต้านมะเร็งยังไม่มีการศึกษามาก่อน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของไซฟริพิตินต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดรวมทั้งกลไกที่เกี่ยวข้อง ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาสารนี้ในการรักษามะเร็งปอดในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารไซพรีพิดินในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อไขว้ไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก

1.2.2 เพื่อศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของสารไซพรีพิดินในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อไขว้ไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

ไซพรีพิดินสามารถยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อไขว้ไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ผ่านทางวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบกลไกในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อไขว้ไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ของสารไซพรีพิดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาพัฒนาสารนี้ เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในอนาคต

1.5 คำสำคัญ

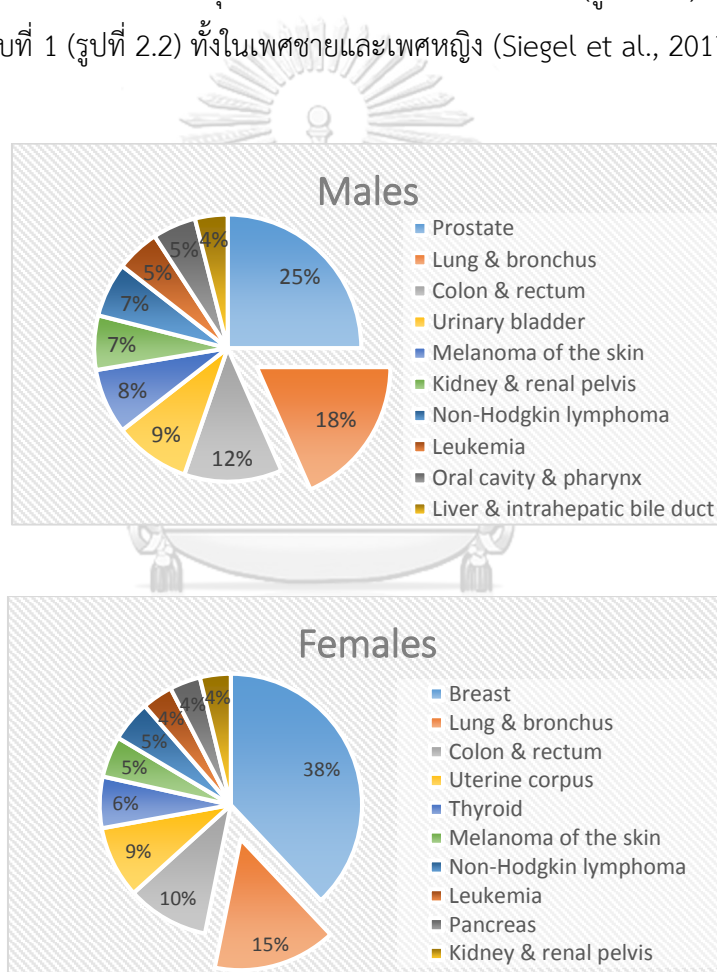
- การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อไขว้ไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์
- การแพร่กระจายของมะเร็ง
- มะเร็งปอด
- วิถีเอเคที
- ไซพรีพิดิน

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

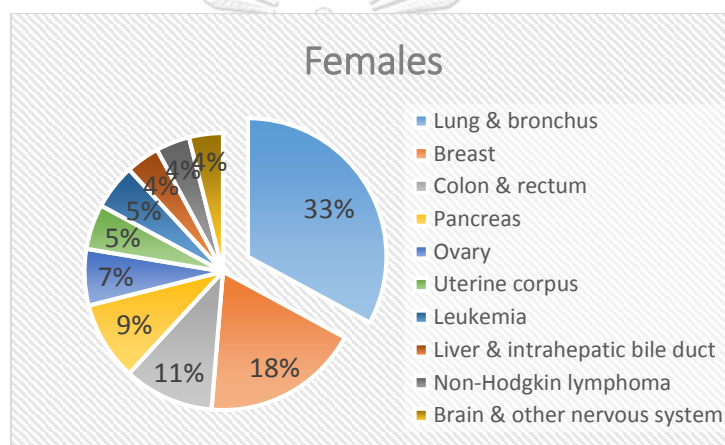
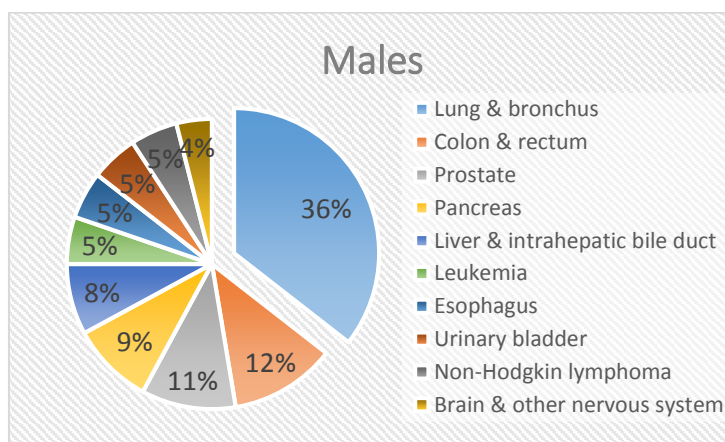
2.1 โรคมะเร็งปอด (Lung cancer)

โรคมะเร็งปอดคือโรคที่เกิดการเจริญของเซลล์ในเนื้อเยื่อปอดอย่างไม่สามารถควบคุมได้ จากนั้นลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง อวัยวะนอกปอด และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นทั่วร่างกายในที่สุด จากสถิติจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งจากทั่วโลกในปี ค.ศ. 2017 พบว่าจำนวนผู้ป่วยมะเร็งใหม่ยังคงเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยมะเร็งปอดพบอุบัติการณ์เกิดโรคเป็นอันดับที่ 2 (รูปที่ 2.1) และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับที่ 1 (รูปที่ 2.2) ทั้งในเพศชายและเพศหญิง (Siegel et al., 2017)



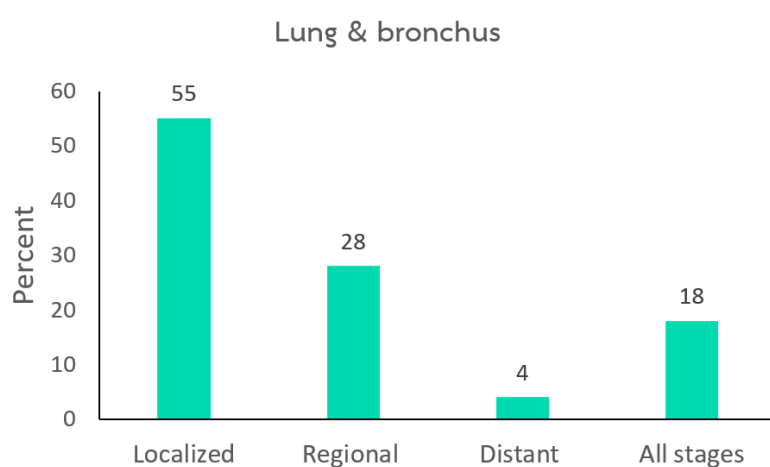
รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่โดยประมาณในปี ค.ศ.2017

(ข้อมูลจาก Siegel et al., 2017)



รูปที่ 2.2 แสดงชนิดมะเร็งที่มีการเสียชีวิตโดยประมาณประจำปี ค.ศ. 2017
(ข้อมูลจาก Siegel et al., 2017)

นอกจากนี้ยังมีสถิติรายงานว่าหากผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ได้รับการวินิจฉัยโรคในขณะที่ผู้ป่วยมีการดำเนินโรคเข้าสู่ระยะแพร่กระจายแล้ว ผู้ป่วยจะมีอัตราการรอดชีวิตใน 5 ปีหลังจากได้รับการวินิจฉัยต่ำ กล่าวคือหากผู้ป่วยมีการดำเนินโรคมายังระยะการแพร่กระจายแล้ว ผู้ป่วยมีโอกาสที่จะเสียชีวิตภายในระยะเวลา 5 ปี หลังจากได้รับการวินิจฉัยแล้วสูงเมื่อเทียบกับโรคมะเร็งอื่นๆ (Siegel et al., 2017) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 อัตราการรอดชีวิตใน 5 ปีหลังจากได้รับการวินิจฉัย โดยแบ่งตามระยะของโรค ในสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 2006-2012 (ข้อมูลจาก Siegel et al., 2017)

ชนิดของมะเร็งปอด

มะเร็งปอดสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามขนาดเซลล์ (รูปที่ 2.4) คือ

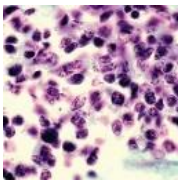
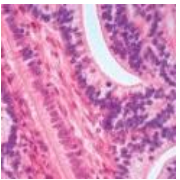
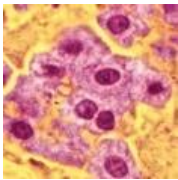
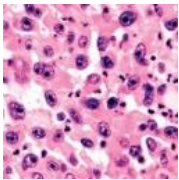
1) มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small cell lung cancer) มะเร็งปอดชนิดนี้ พบอัตราการเกิดโรคได้น้อย คือประมาณร้อยละ 15 ของมะเร็งปอดทั้งหมด แต่มีความอันตรายและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้มากกว่า เนื่องจากเซลล์มะเร็งเจริญเติบโต และแพร่กระจายได้รวดเร็วกว่ามะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก

2) มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (Non-small cell lung cancer) พบอัตราการเกิดโรคมากกว่า คือประมาณร้อยละ 85 ของมะเร็งปอดทั้งหมด แต่มีการแพร่กระจายของมะเร็งได้ช้ากว่า ทำให้มีโอกาสรักษาได้ง่ายกว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดย่อย คือ

- Adenocarcinoma พบร้อยละ 40 ของมะเร็งปอด มะเร็งชนิดนี้มักพบบริเวณปอดส่วนนอก บริเวณต่อมสร้างน้ำเมือกของปอดรวมทั้งอาจเกิดจากแผลในปอด เช่น แผลจากการเป็นวัณโรค หรือ แผลจากการปอดบวม และอาจพบได้ในคนที่ไม่สูบบุหรี่

- Squamous cell carcinoma พบร้อยละ 30 ของมะเร็งปอดทั้งหมด มะเร็งชนิดนี้มักพบบริเวณปอดส่วนนอก ใกล้ขั้วปอด และเยื่อหุ้มของหลอดลม สาเหตุของมะเร็งชนิดนี้มีสาเหตุสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่

- Large cell carcinoma พบร้อยละ 15 ของมะเร็งปอดทั้งหมด มะเร็งชนิดนี้มักพบบริเวณผิวนอกของเนื้อปอด (Jackson, 2014)

มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก	มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก		
	Adenocarcinoma	Squamous cell carcinoma	Large cell carcinoma
			

รูปที่ 2.4 ชนิดของโรคมะเร็งปอด (อ้างอิงจาก Long et al., 2012)

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งปอด

แม้ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่แน่ชัดของการเกิดโรคมะเร็งปอด แต่พบหลายงานวิจัยชี้ให้เห็นถึง ปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลต่อการเกิดโรคมะเร็งปอด (Long et al., 2012) ได้แก่

1) การสูบบุหรี่และการได้รับควันบุหรี่มือสอง ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งปอดมากที่สุด เนื่องจากในบุหรี่มีสารที่ก่อให้เกิดการทำลายและทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ปอด เช่น นิโคติน ทาร์ สารหนู และ แคลเดเมียม เป็นต้น จากสถิติพบว่า ผู้ที่สูบบุหรี่มีโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งปอดมากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ถึง 10-30 เท่า และโอกาสการเกิดโรคมะเร็งจะมากขึ้นตามความถี่และจำนวนปีที่สูบบุหรี่

2) การได้รับสารก่อมะเร็ง (Carcinogens) ได้แก่

- แร่ใยหิน (Asbestos) เป็นเส้นใยแร่ซิลิเกต มีอยู่ทั่วไปในพื้นดินและพบได้มากตามงานภาคอุตสาหกรรม
- ก๊าซเรดอน (Radon gas) เป็นก๊าซกัมมันตรังสี ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มาจากการสลายตัวของแร่ยูเรเนียม พบในหินแกรนิตได้ตามงานภาคอุตสาหกรรม
- สารในงานภาคอุตสาหกรรม เช่น ยูเรเนียม สารหนู นิเกิลและผลิตภัณฑ์จากถ่านหิน
- รังสีรักษา (Radiotherapy) ในผู้ที่ต้องฉายแสงเพื่อรักษาโรคอื่นในทรวงอก อาจกระตุ้นให้เกิด มะเร็งปอดได้

3) โรคที่ทำให้เกิดแผลเป็นในปอด ได้แก่ วัณโรค ปอดบวม

4) พันธุกรรม หากคนในครอบครัวสายตรงมีประวัติเป็นมะเร็งปอด จะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดมากกว่าแม้ว่าจะไม่ได้รับสิ่งกระตุ้น

5) อายุ โดยส่วนมากมักพบมะเร็งปอดได้ในผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ความเสี่ยงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น แต่ก็สามารถพบผู้ที่มีอายุน้อยกว่า 65 ปี ป่วยเป็นโรคมะเร็งปอดได้เช่นกัน

ระยะของโรคมะเร็งปอด

1) มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small cell lung cancer) สามารถแบ่งตามความรุนแรงและการแพร่กระจายของโรคได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่

- ระยะจำกัดของขนาดมะเร็ง (Limited stage) คือระยะที่พบมะเร็งที่ปอดเพียง 1 ข้างและที่ต่อมน้ำเหลืองระหว่างปอดทั้งสองข้างเท่านั้น
- ระยะการแพร่กระจาย (Extensive stage) คือระยะที่มะเร็งเกิดการแพร่กระจายจากปอดไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกาย
- การกลับเป็นซ้ำ (Recurrent) คือการกลับเป็นซ้ำของโรคหลังจากได้ที่ได้รับการรักษาแล้ว ซึ่งมะเร็งอาจกลับมาเป็นที่ปอดหรือเกิดที่ส่วนอื่นๆของร่างกายก็ได้

2) มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (Non-small cell lung cancer) แบ่งได้เป็น 5 ระยะ ได้แก่

- ระยะที่ 0 พบมะเร็งในบริเวณปอดเท่านั้น โดยมะเร็งนั้น ไม่เกิดการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง และไม่เกิดการแพร่กระจายออกนอกปอด
- ระยะที่ I ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็ก อยู่ภายในบริเวณปอดเท่านั้น ไม่พบการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ในระยะนี้ยังสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการผ่าตัด ถ้าผู้ป่วยมีสุขภาพที่แข็งแรงพอ แบ่งได้เป็น 2 ระยะ ตามขนาดของก้อนมะเร็ง
 - ระยะที่ IA ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 3 เซนติเมตร
 - ระยะที่ IB ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 3-5 เซนติเมตร
- ระยะที่ II ในระยะนี้ บางครั้งอาจสามารถรักษาให้หายได้ขาดโดยการผ่าตัด ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด แบ่งได้เป็น 2 ระยะ
 - ระยะที่ IIA ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 5 เซนติเมตร พบการแพร่กระจายไปยังบริเวณข้างๆต่อมน้ำเหลือง หรือก้อนมะเร็งมีขนาดอยู่ระหว่าง 5-7 เซนติเมตร แต่ไม่พบการกระจายไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง
 - ระยะที่ IIB ก้อนมะเร็งมีขนาดอยู่ระหว่าง 5-7 เซนติเมตร และเกิดการแพร่กระจายไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง หรือก้อนมะเร็งมีขนาดมากกว่า 7 เซนติเมตร โดยอาจจะรุกรานหรือไม่รุกรานเนื้อเยื่อปอดก็ได้ แต่ไม่พบการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง

- ระยะที่ III การรักษาให้หายขาดในระยะนี้ยากที่จะเป็นไปได้ที่จะใช้การผ่าตัดเพียงอย่างเดียว อาจต้องรักษาร่วมกับการรักษาแบบอื่นๆด้วย เช่น การใช้ยาเคมีบำบัด หรือ การฉายแสง แบ่งได้เป็น 2 ระยะ
- ระยะที่ IIIA พบเซลล์มะเร็งในต่อมน้ำเหลืองรอบๆปอด หรือ เกิดการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณอื่นๆที่ไกลจากปอด และผนังทรวงอกหรือบริเวณกลางช่องอก
- ระยะที่ IIIB เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองในอีกด้านของช่องอก หรือไปยังต่อมน้ำเหลืองเหนือกระดูกไหปลาร้า หรือ มีก้อนเนื้ออกมากกว่า 1 ก้อนในบริเวณปอด หรือ มีก้อนเนื้ออกเจริญในอีกด้านของช่องอก เช่น หัวใจ หลอดอาหาร หรือ มีของเหลวที่มีเซลล์มะเร็งอยู่บริเวณรอบๆปอด
- ระยะที่ IV เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายไปที่บริเวณอื่นๆของร่างกาย เช่น สมอง ตับ กระดูก เป็นต้น อาจแบ่งย่อยได้เป็น
 - ระยะ IVA มะเร็งเกิดการแพร่กระจายภายในบริเวณช่องอก
 - ระยะ IVB มะเร็งเกิดการแพร่กระจายออกไปยังนอกช่องอก

การรักษาโรคมะเร็งปอด

การรักษาโรคมะเร็งต้องพิจารณาจากขนาดก้อนมะเร็ง ตำแหน่ง ระยะของโรค สภาพร่างกาย และจิตใจของผู้ป่วย โดยหากมะเร็งยังไม่แพร่กระจายจะพิจารณาใช้วิธีการผ่าตัด เพราะผู้ป่วยมีโอกาสรักษาหายขาดได้ แต่หากมะเร็งเกิดการแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆแล้ว อาจต้องใช้การรักษาพร้อมกันหลายวิธีในการรักษา (Combination therapy) (American joint committee on cancer, 2016)

1) การผ่าตัด (Surgery) เป็นการนำเอาก้อนมะเร็งบริเวณปอดและต่อมน้ำเหลืองออก ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้ดีในการรักษามะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก ในระยะ 0, I, II และ IIIA และมักไม่นิยมใช้ในการรักษามะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้ มักมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว

2) การฉายแสง (Radiotherapy) เป็นการใช้รังสี ฉายไปยังบริเวณก้อนมะเร็งเพื่อทำลายหรือลดขนาดก้อนมะเร็ง โดยต้องฉายหลายรอบเพื่อค่อยๆลดขนาดก้อนมะเร็งลง อาจทำให้มีอาการข้างเคียงได้ เช่น ระบายเคืองผิวหนังบริเวณที่มีการฉายรังสี อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด แต่การฉายรังสีจะใช้ไม่ได้ผลกับมะเร็งที่แพร่กระจายแล้ว

3) การให้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) เป็นการให้ยาเพื่อทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะใช้กับมะเร็งที่เกิดการแพร่กระจายแล้วได้ เพราะการให้ยาเข้าสู่หลอดเลือดจะทำให้ยาไหลเวียนไปรักษาได้ทั่วร่างกาย แต่ก็ทำให้เกิดอาการข้างเคียงที่สูงเช่นกัน

4) การรักษาแบบเป้าหมายต่อเซลล์มะเร็ง (Targeted therapy) เป็นการให้ยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติ ทำให้สามารถลดอาการข้างเคียงลงได้

5) การยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis inhibitors) เป็นการให้ยาเพื่อป้องกันการสร้างหลอดเลือดใหม่ไปเลี้ยงก้อนมะเร็ง

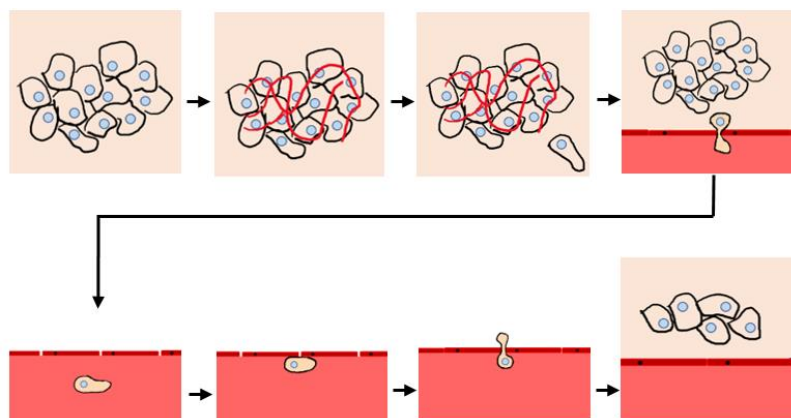
6) การรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy) เป็นการรักษาโรคมะเร็งโดยอาศัยหลักการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของตนเองให้ไปทำลายเซลล์มะเร็ง

2.2 การแพร่กระจายของมะเร็ง (Cancer metastasis)

ดังที่ได้กล่าวข้างต้น หากผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีการดำเนินโรคเข้าสู่ระยะแพร่กระจาย ผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตภายในระยะเวลา 5 ปี หลังจากได้รับการวินิจฉัยสูงเมื่อเทียบกับโรคมะเร็งอื่น ดังนั้น การชะลอหรือลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งปอดจึงเป็นแนวทางในการรักษาที่สำคัญ นอกจากจะช่วยลดความเสี่ยงในการเสียชีวิตแล้วยังช่วยให้แพทย์สามารถรักษาโรคได้ง่ายขึ้น ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดได้และยังลดการกลับเป็นซ้ำของโรคมะเร็งอีกด้วย

การแพร่กระจายของมะเร็ง เป็นกระบวนการที่เซลล์มะเร็งสามารถหลุดออกจากก้อนมะเร็งปฐมภูมิ ผ่านออกสู่กระแสเลือด ไทลเวียนไปยังอวัยวะเป้าหมาย และเจริญเติบโตเป็นก้อนมะเร็งทุติยภูมิต่อไป (Hanahan and Weinberg, 2011) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งเสียชีวิต (Smith et al., 2010)





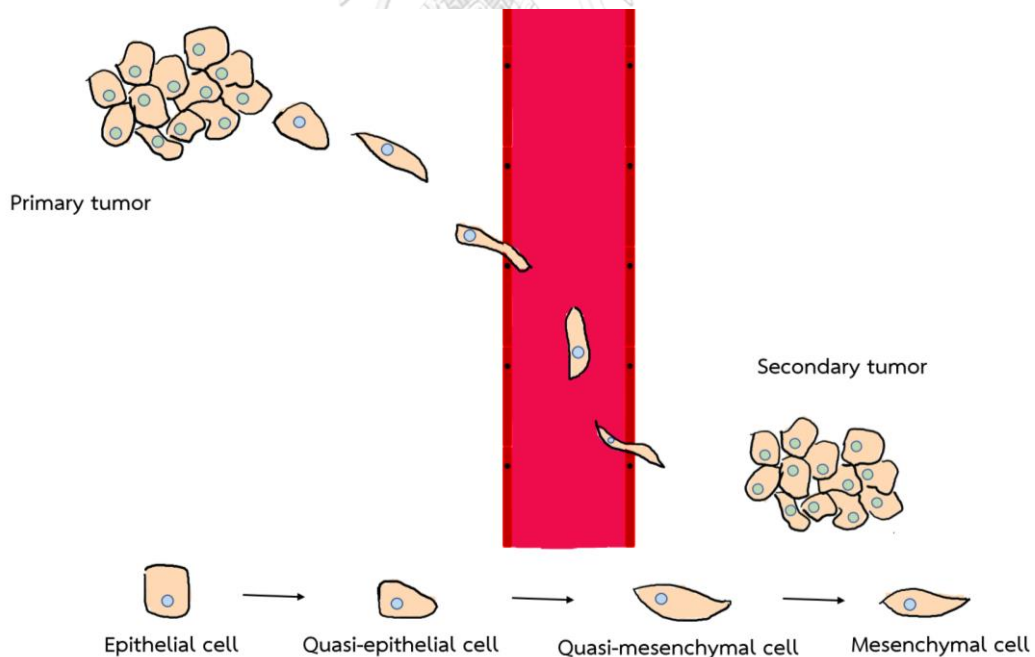
รูปที่ 2.5 กระบวนการการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (ข้อมูลจาก Wirtz et al., 2011)

กลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ประกอบด้วยหลายขั้นตอนดังนี้ (Wirtz et al., 2011) (รูปที่ 2.5)

- 1) การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งเกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ก้อนมะเร็งปฐมภูมิมีขนาดใหญ่ขึ้น ต้องการสารอาหารและออกซิเจนเพิ่มขึ้น
- 2) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) เซลล์มะเร็งมีการหลั่งสารเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสร้างหลอดเลือดเข้ามายังบริเวณก้อนมะเร็งเพื่อหล่อเลี้ยงก้อนมะเร็งในการเจริญเติบโต
- 3) การหลุดออกของเซลล์มะเร็ง (Cell detachment) เซลล์มะเร็งมีการเคลื่อนที่หลุดออกจากก้อนมะเร็งปฐมภูมิ มีการรุกรานผ่านเนื้อเยื่อข้างเคียงเพื่อเตรียมเคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือด
- 4) การรุกรานเข้าสู่หลอดเลือด (Intravasation) เซลล์มะเร็งเกิดการแทรกตัวเข้าสู่หลอดเลือดเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดและระบบน้ำเหลือง มีการไหลเวียนไปยังบริเวณต่างๆ ของร่างกาย
- 5) การไหลเวียนของเซลล์มะเร็งในระบบเลือดและน้ำเหลือง เซลล์มะเร็งที่มีการแขวนลอยในระบบไหลเวียนมีการปรับตัวให้ต่อต้านการตายแบบอะนอยคิส หรือการตายของเซลล์เมื่อเซลล์หลุดออกจากการยึดเกาะเป็นเซลล์เดี่ยว
- 6) การยึดเกาะผนังหลอดเลือด (Cell adhesion) เซลล์มะเร็งเกิดการยึดเกาะกับผนังหลอดเลือดที่อวัยวะเป้าหมาย
- 7) การรุกรานออกนอกหลอดเลือด (Extravasation) เซลล์มะเร็งเกิดการรุกรานออกนอกหลอดเลือดที่อวัยวะเป้าหมาย
- 8) การเจริญเติบโตของมะเร็งทุติยภูมิ เซลล์มะเร็งที่รุกรานไปยังอวัยวะเป้าหมายใหม่ เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน เกิดเป็นก้อนมะเร็งทุติยภูมิต่อไป

2.3 การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Epithelial to mesenchymal transition)

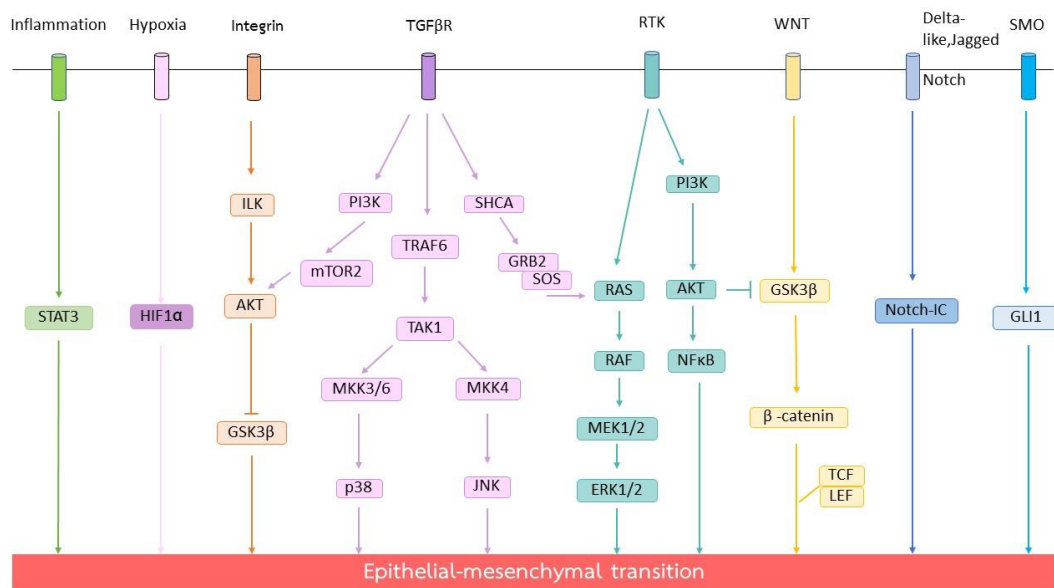
การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ เป็นกระบวนการเริ่มต้นของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งลักษณะและพฤติกรรมของเซลล์เพื่อให้เอื้อต่อการแพร่กระจาย เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์เยื่อบุผิวลักษณะหลายเหลี่ยม (Epithelial cell) เป็นเซลล์มีเซนไคม์รูปทรงกระสวย (Mesenchymal cell) มีการลดแรงยึดเกาะระหว่างเซลล์และลดแรงยึดเกาะระหว่างเซลล์กับเยื่อฐาน มีคุณสมบัติที่เอื้อต่อการตายในสภาวะที่เซลล์หลุดออกจากเยื่อฐานเป็นเซลล์เดี่ยว ผลโดยรวมของกระบวนการนี้จึงส่งเสริมการหลุดออก การเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังบริเวณต่างๆของร่างกายได้ต่อไป (Fouad and Aanei, 2017; Heerboth et al., 2015) (รูปที่ 2.6) เมื่อเซลล์มะเร็งเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและเกิดการแพร่กระจายแล้ว จะส่งผลให้มะเร็งมีความรุนแรงมากขึ้นและเพิ่มอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ (Crane and Berx, 2013)



รูปที่ 2.6 รูปแสดงกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์

(ข้อมูลจาก Tam and Weinberg, 2013)

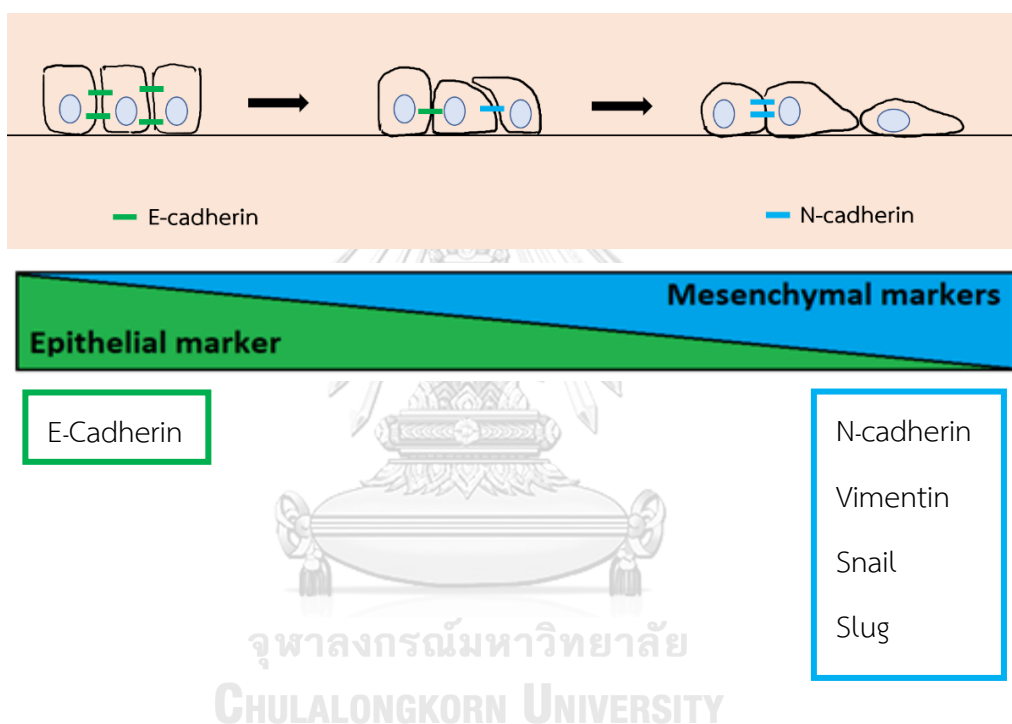
การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ถูกควบคุมได้จากหลายวิถีสัญญาณ โดยการกระตุ้นผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ ได้แก่ ตัวรับ Integrin ตัวรับ Transforming growth factor beta (TGF- β) family ตัวรับ Tyrosine kinase ตัวรับ Frizzled (FZD) ตัวรับ Notch ตัวรับ Smoothed (SMO) และ Interleukin 6 (IL6) นอกจากนี้สภาวะที่เซลล์ขาดออกซิเจน (Hypoxia) ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ผ่านวิถีภายในเซลล์ ได้แก่ วิถี Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) วิถี Protein Kinase B (Akt) วิถี TGF- β วิถี Epidermal growth factor (EGF) วิถี Hepatocyte growth factor (HGF) วิถี Notch วิถี Hedgehog และ วิถี Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (Lamouille et al., 2014) โดยการกระตุ้นวิถีสัญญาณเหล่านี้จะพบมากในเซลล์มะเร็งที่มีการแพร่กระจาย ซึ่งเป็นเป้าหมายที่สำคัญของการรักษาหรือยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 2.7 แสดงวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (ข้อมูลจาก Lamouille et al., 2014)

โปรตีนบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (EMT markers)

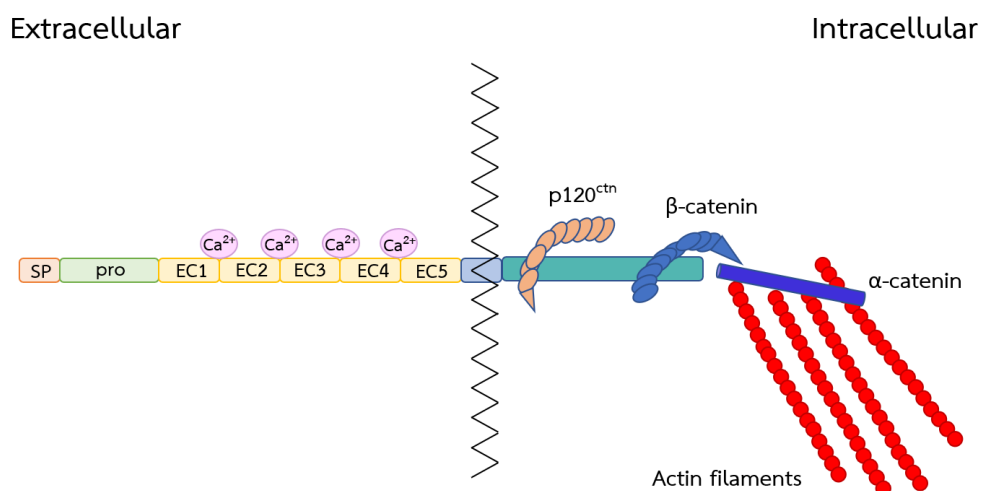
จากที่กล่าวข้างต้น เมื่อมีการกระตุ้นวิถีสัญญาณดังกล่าว ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่และการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน หรือ Transcription factor ทำให้มีการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ ส่งผลให้เกิดกระบวนการสร้างโปรตีนต่างๆ ผลรวมจากการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ ในท้ายที่สุดจะส่งผลต่อการเกิดกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ โดยสามารถศึกษาจากระดับของโปรตีนบ่งชี้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการดังกล่าว (รูปที่ 2.8) ได้แก่



รูปที่ 2.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะและโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (ข้อมูลจาก Micalizzi et al., 2010)

1) โปรตีน Cadherin

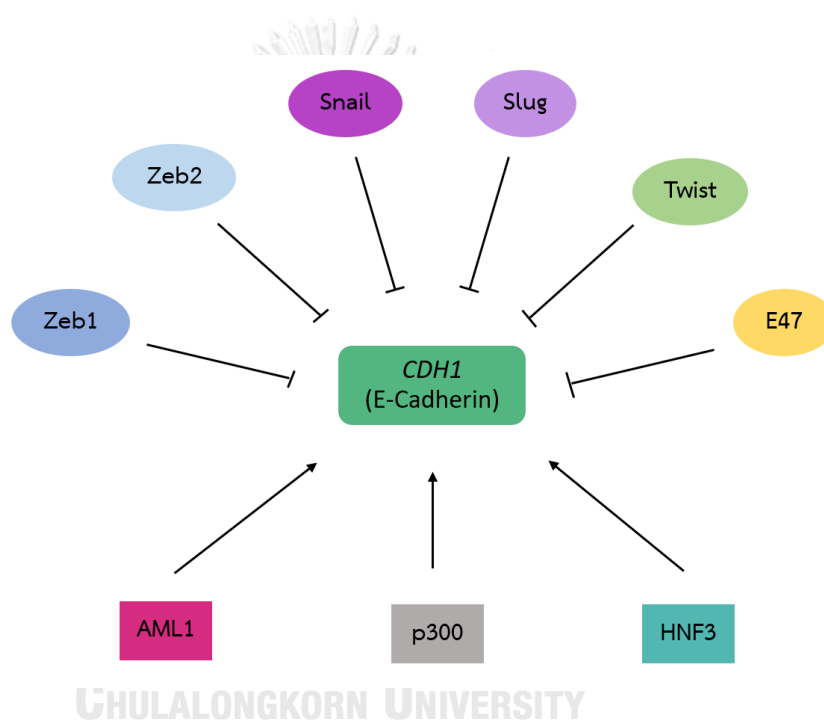
Cadherin เป็น Transmembrane glycoprotein ชนิดที่ 1 อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณ Adherens junction ระหว่างเซลล์สองเซลล์ติดกัน โครงสร้างโปรตีนนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่อยู่นอกเซลล์มี 5 Domain (EC1-EC5) และส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม จับกับ α และ β -Catenin ซึ่งเชื่อมอยู่กับ Actin stress fiber (โปรตีนโครงสร้างของเซลล์) (รูปที่ 2.9) Cadherin ทำหน้าที่ในการยึดเซลล์ชนิดเดียวกันเข้าด้วยกันโดยอาศัยแคลเซียมไอออน ในโครงสร้างของ Cadherin ยังมี p120-catenin ($p120^{ctn}$) มีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของ Cadherin (Wheelock et al., 2008) Cadherin สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายชนิดตาม ชนิดและจำนวนของโครงสร้าง ได้แก่ Epithelial-Cadherin (E-Cad), Neural-Cadherin (N-Cad), Placental-Cadherin (P-Cad), Retinal-Cadherin (R-Cad) และ Vascular endothelial-Cadherin (VE-Cad) (Tepass et al., 2000) โดยในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นเฉพาะ E-Cad ซึ่งพบมากในเซลล์เยื่อบุผิว และ N-Cad ซึ่งพบมากในเซลล์มีเซนไคม์ (Yilmaz and Christofori, 2009)



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน Cadherin

(ข้อมูลจาก Wheelock et al., 2008)

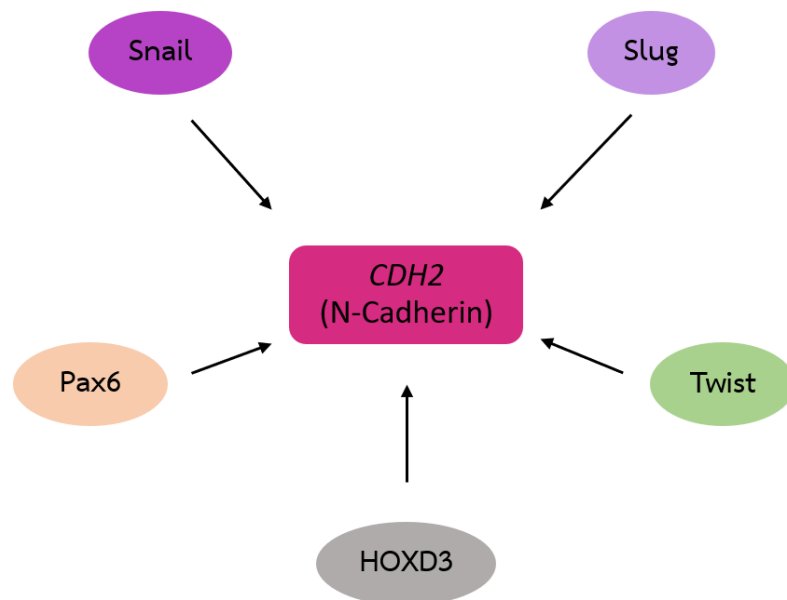
E-Cadherin เป็นโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีน *CDH1* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว จากผลการศึกษาพบการลดลงของ E-Cad ในผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด (Comijn et al., 2011; Battle et al., 2000; Cano et al., 2000) ส่งผลให้เซลล์ลดการยึดเกาะระหว่างกัน และเพิ่มอัตราการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Wheelock et al.; 2008) ยีน *CDH1* ถูกควบคุมการถอดรหัสจากโปรตีน Transcription factor หลายชนิดโดย Snail, Slug, Twist, E47, δ EF1 (ZEB1) และ SIP1 (ZEB2) เป็นตัวยับยั้งการถอดรหัส *CDH1* (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005) ในขณะที่โปรตีนที่เพิ่มการแสดงออกของ E-Cad ได้แก่ Acute myeloid leukemia 1 (AML1), p300 และ Hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3) (Liu et al., 2005; Lombaerts et al., 2006) (รูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.10. โปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นและยับยั้งการแสดงออกของยีน *CDH1* ที่ถอดรหัสโปรตีน E-Cadherin

N-Cadherin เป็นโปรตีนที่พบมากในเซลล์มีเซนไคม์ ถอดรหัสมาจากยีน *CDH2* ทำหน้าที่ในการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์มีเซนไคม์ ช่วยยึดตัวรับ Fibroblast growth factor (FGF) และ Epidermal growth factor (EGF) ที่เชื่อมกับเซลล์และส่งเสริมการกระตุ้นวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการรุกรานและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง N-Cad ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยการจับกับ Na^+/H^+ exchanger regulatory factor (NHERF) และ ตัวรับ Platelet-derived growth factor

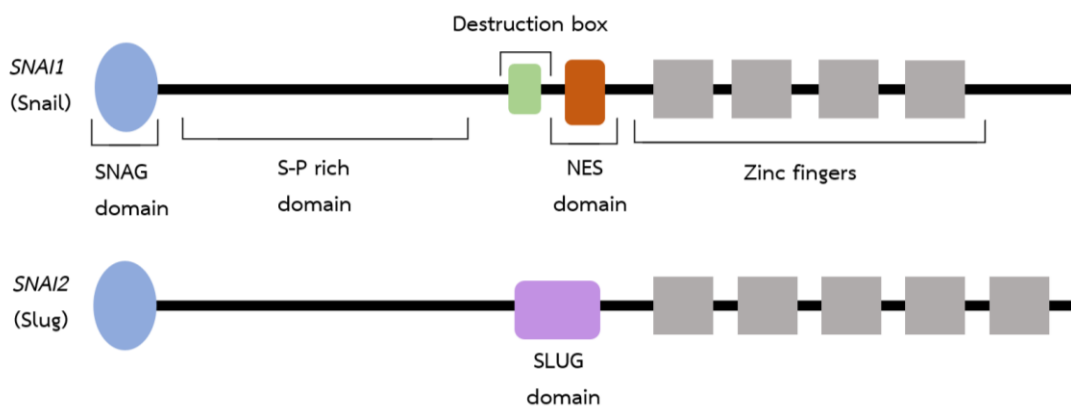
(PDGF) ผ่าน β -Catenin ที่บริเวณ Lamellipodia (Derycke and Bracke, 2004) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เยื่อหุ้มให้มีรูปร่างคล้ายกระสวย (Yan et al., 2015) N-Cad ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์แตกต่างจาก E-Cad เนื่องจากที่ตำแหน่ง S (Suppression of movement) -Domain ของ N-Cad ไม่สามารถทำงานได้ (Fedor-Chaikin et al., 2003) จากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของ N-Cad ในมะเร็งหลายชนิด (Hazan et al., 2000; Zhang et al., 2013; Yan et al., 2015) เมื่อมีการเพิ่มการแสดงออกของ N-Cad ในเซลล์เยื่อหุ้มพบว่า เซลล์เยื่อหุ้มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปทรงกระสวยซึ่งส่งเสริมการแพร่กระจายมากขึ้น (Zhang et al., 2013) และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ N-Cad พบว่าสามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ (Shih and Yamada, 2012) การแสดงออกของยีน *CDH2* ที่ถอดรหัสได้ N-Cad ถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดได้แก่ Twist, Snail, Pax6 และ HOXD3 ซึ่งส่งผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน N-Cad (รูปที่ 2.11) (Derycke and Bracke, 2004) ในเซลล์มะเร็งที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์มีเซนไคม์จะมีปริมาณของ N-Cad เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามมีปริมาณ E-Cad ลดลง การแสดงออกดังกล่าวนี้เรียกว่า Cadherin switching (Wheelock et al., 2008)



รูปที่ 2.11 แสดงโปรตีนควบคุมที่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *CDH2* ที่ถอดรหัสโปรตีน N-Cadherin

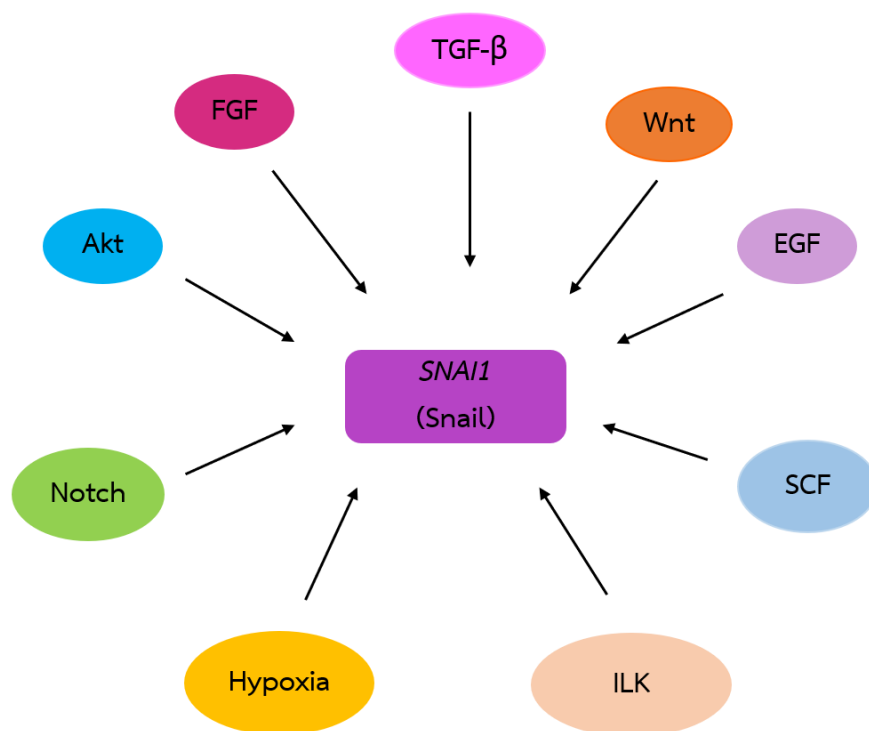
2) Snail family transcription factor

Transcription factor คือโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยการจับกับสายดีเอ็นเอตรงบริเวณควบคุมที่มีรหัสจำเพาะ ซึ่งอาจเป็นการส่งเสริมการแสดงออกหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ Snail family transcription factor ประกอบด้วยสมาชิก 3 ตัว ได้แก่ Snail (Snail1), Slug (Snail2) และ Smuc (Snail3) โปรตีนกลุ่มนี้ประกอบด้วย SNAG domain ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ transcription factor โดยการจับกับ Repressor และ Zinc finger domain ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับเบสที่จำเพาะสำหรับจับกับดีเอ็นเอ นอกจากนี้ NES domain พบเฉพาะโปรตีน Snail เมื่อถูกกระตุ้นจะทำหน้าที่ส่งโปรตีน Snail ออกจากนิวเคลียสเพื่อเกิดการทำลายต่อไป และ Slug domain พบเฉพาะในโปรตีน Slug ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด (รูปที่ 2.12) จากการศึกษาพบว่าโปรตีน Snail และ Slug มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ซึ่งส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจาย (Peinado et al., 2007)



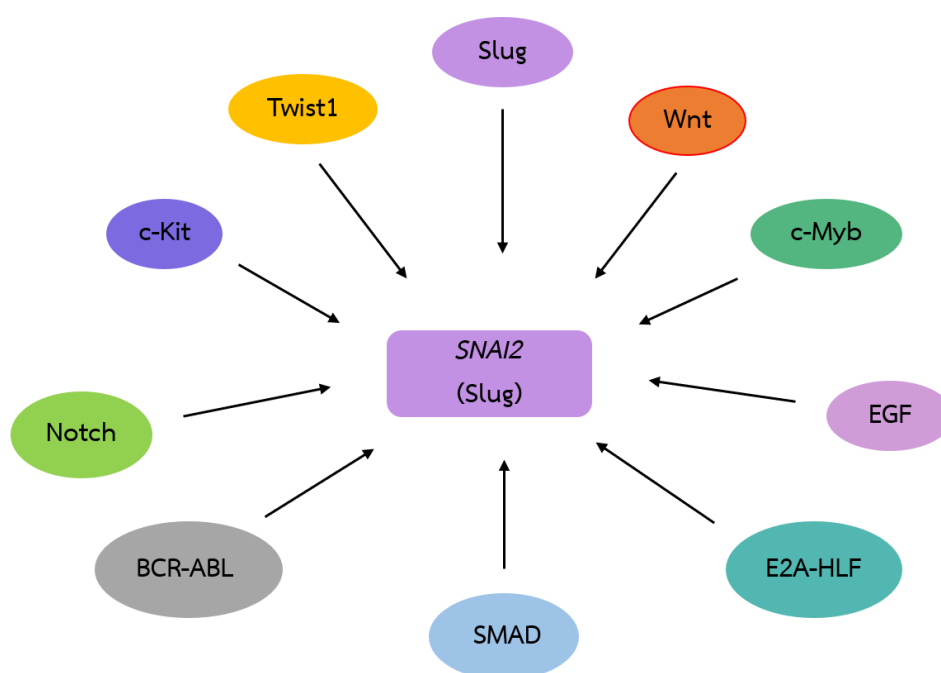
รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างโปรตีน Snail และ Slug (อ้างอิงจาก Peinado et al., 2007)

Snail เป็น Transcription factor สร้างจากยีน *SNAI1* ทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E-Cad โดยการเข้าจับกับ *CDH1* ยีน การแสดงออกของ Snail ถูกควบคุมได้หลายวิธี ได้แก่ TGF- β , Wnt, Akt, EGF, FGF, SCF (Stem cell factor), Notch, Hypoxia และ ILK (Integrin-linked kinase) เป็นต้น (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Peinado et al., 2007; Sa'nchez-Tillo' et al., 2012) (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 วิธีสัญญาณที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *SNAI1* ที่ถอดรหัสโปรตีน Snail

Slug เป็น Transcription factor สร้างจากยีน *SNAI2* ทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E-Cad โดยการเข้าจับกับ *CDH1* ยีน ซึ่งการแสดงออกของ Slug ถูกควบคุมได้หลายวิธี ได้แก่ Slug, Twist1, Wnt, c-Kit, c-Myb, Notch, EGF, BCR-ABL, E2A-HLF และ SMAD เป็นต้น (Shih and Yang, 2011; Peinado et al., 2007; Sa' nchez-Tillo' et al., 2012) (รูปที่ 2.14)



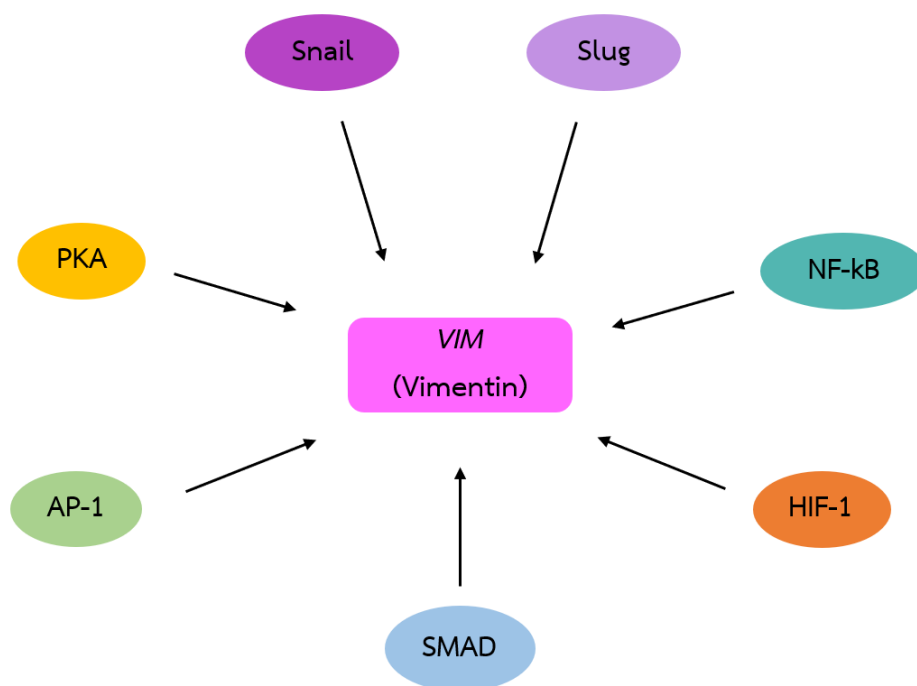
รูปที่ 2.14 วิธีสัญญาณที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *SNAI2* ที่ถอดรหัสโปรตีน Slug

จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์มีเซนไคม์ มีการแสดงออกของโปรตีน Snail และ Slug เพิ่มขึ้น (Zheng et al., 2015; Grzegorzolka et al., 2015; Fan et al., 2012) เมื่อลดการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในมะเร็ง สามารถลดการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Fenouille et al., 2012; Putzke et al., 2011; Mikami et al., 2011) ดังนั้นโปรตีน Snail และ Slug ซึ่งเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการพัฒนาการรักษามะเร็ง

3) Vimentin

Vimentin เป็นเส้นใยโปรตีนขนาดกลางชนิดที่ 3 (Type 3 intermediate filament) ที่พบในเซลล์มีเซนไคม์ มีการถอดรหัสจากยีน *VIM* โปรตีน Vimentin นอกจากจะมีหน้าที่เป็นโปรตีนโครงร่างของเซลล์มีเซนไคม์แล้ว ยังมีหน้าที่เป็นโปรตีน Scaffold สามารถทำหน้าที่ในการถ่ายทอด

สัญญาณได้อีกด้วย (Satelli and Li, 2011) Vimentin กระตุ้นการสร้างและการทำงานของ Invadopodia และ Lamellipodia ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญในการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Bowden et al., 2006; Weaver, 2006) มีการทดลองยับยั้งการแสดงออกของ Vimentin ด้วยการใช้ siRNA พบว่าสามารถลดการสร้าง Invadopodia และ Lamellipodia ได้ (Schoumacher et al., 2010) โปรตีน Vimentin ถูกกระตุ้นการแสดงออกโดย Snail, Slug, HIF-1 , NF- κ B, SMAD, AP-1 และ PKA ส่งผลเพิ่มปริมาณ Vimentin ในเซลล์ (รูปที่ 2.15) (Wu et al., 2007; Krishnamachary et al., 2003) จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของ Vimentin ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่งผลต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ และส่งผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Liu et al., 2015) ในทางตรงกันข้ามในการทดลองที่มีการยับยั้งการแสดงออกของ Vimentin พบว่าสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Paccione et al., 2008)



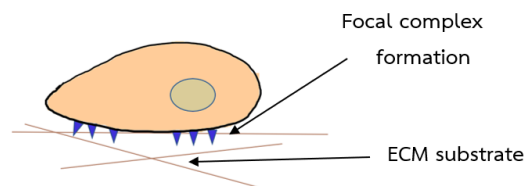
รูปที่ 2.15 โปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน VIM ที่ถอดรหัสโปรตีน

Vimentin

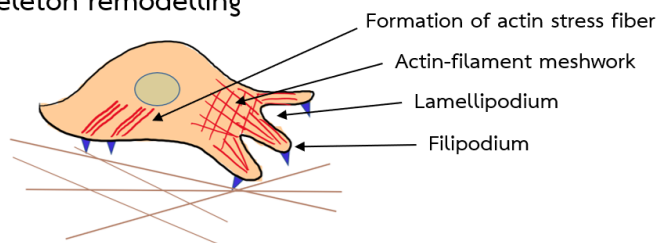
2.4 Actin stress fiber และ Focal adhesion

การเคลื่อนที่ของเซลล์เกิดจากสภาวะสมดุลระหว่างการรวมตัว (assembly) และการแยกตัว (disassembly) ของโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว เช่นในเวลาที่เซลล์เคลื่อนที่ไปข้างหน้าภายในเซลล์จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ของโปรตีน Actin ที่บริเวณ Leading edge เป็นโครงสร้าง Filopodia มีลักษณะปลายแหลมยื่นออกจากเซลล์ โครงสร้าง Lamellipodia เป็นส่วนที่เว้าเข้ามาจาก Leading edge และ โครงสร้าง Actin stress fiber มีการรวมตัวกันของกลุ่มโปรตีนที่บริเวณ Focal adhesion เพื่อยึดเกาะระหว่างเซลล์กับเยื่อฐานในทิศทางที่เซลล์เคลื่อนที่ ในขณะเดียวกันที่ด้านท้ายของเซลล์จะเกิดการแยกตัวของ Actin และ Focal adhesion ลดการยึดเกาะของเซลล์กับเยื่อฐานทำให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ (Carragher and Frame, 2004; Burridge and Guilly, 2015) (รูปที่ 2.16)

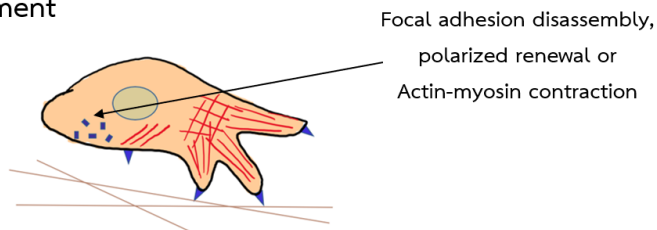
Cell adhesion



Actin-cytoskeleton remodelling



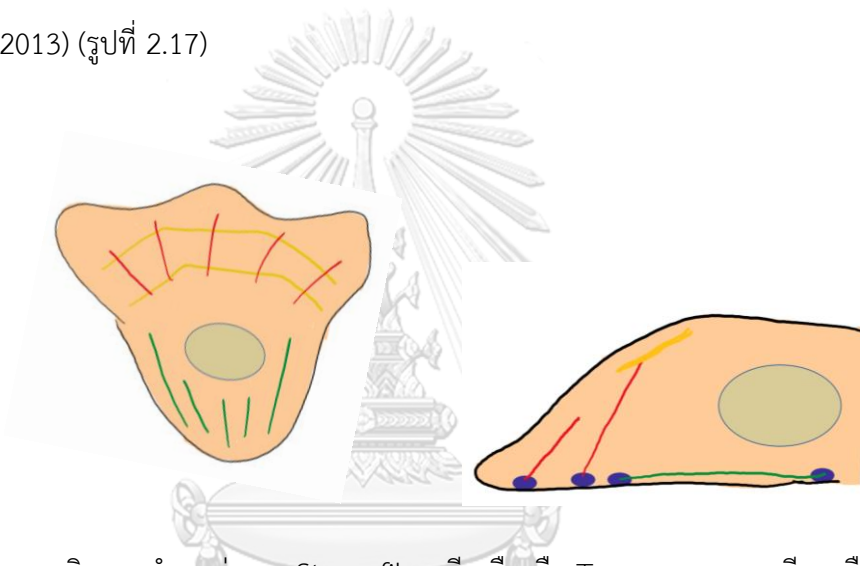
Cell detachment



รูปที่ 2.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ Focal adhesions และ Actin ในระหว่างที่เซลล์มีการเคลื่อนที่ (ข้อมูลจาก Carragher and Frame, 2004)

1) Actin stress fiber

เส้นใยโปรตีน Actin stress fiber เป็นเส้นใยที่เกิดจากการต่อสายของ G-actin (Monomer) เกิดเป็นสายยาวของ F-actin (Polymer) แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดหลักได้แก่ Ventral stress fiber เส้นใยโปรตีนชนิดนี้เชื่อมต่อกับกลุ่มโปรตีนตรงตำแหน่ง Focal adhesion ทั้งสองด้านของเส้นใย และเรียงตัวกันในแนวราบตามทิศทางที่เซลล์เคลื่อนที่ ชนิดที่ 2 คือ Transverse arcs เส้นใยโปรตีนชนิดนี้จะอยู่บริเวณ Leading edge ของเซลล์ เรียงตัวในแนวขวาง มีการเชื่อมต่อกับ Dorsal stress fiber และชนิดที่ 3 คือ Dorsal stress fiber เส้นใยโปรตีนชนิดนี้จะอยู่บริเวณ Leading edge ของเซลล์ โดยเชื่อมต่อกับ Focal adhesion ทั้งสองด้านหรืออาจเชื่อมต่อกับ Transverse arcs (Vallenius, 2013) (รูปที่ 2.17)



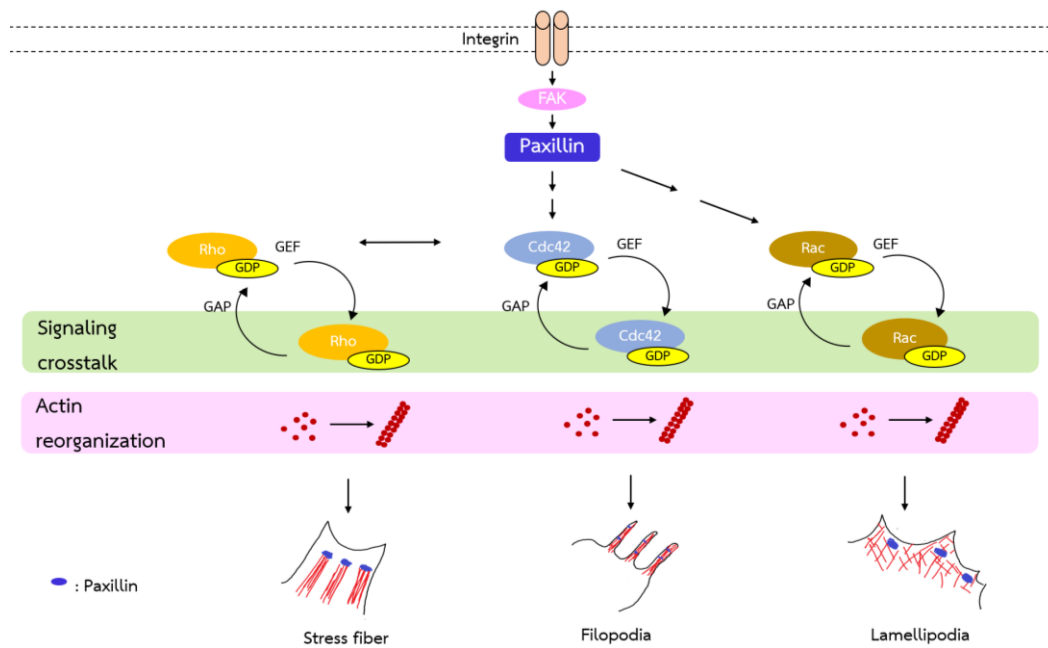
รูปที่ 2.17 แสดงชนิดและตำแหน่งของ Stress fiber สีเหลืองคือ Transverse arcs สีแดงคือ Dorsal stress fiber สีเขียวคือ Ventral stress fiber และสีน้ำเงินคือ Focal adhesion (ข้อมูลจาก Hotulainen and Lappalainen, 2006)

เส้นใยโปรตีน Actin stress fiber นอกจากจะมีหน้าที่เป็นโครงร่างค้ำจุนภายในเพื่อรักษารูปร่างของเซลล์แล้ว ยังมีบทบาทในการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นการเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของ Actin ทำให้เกิดโครงสร้าง Filopodia, Lamellipodia และ Actin stress fiber ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Hotulainen and Lappalainen, 2006)

1) Focal adhesion

Focal adhesion เป็นกลุ่มโปรตีนอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในของไซโตพลาสซึม เป็นตัวกลางในการยึดติดระหว่างเซลล์กับเยื่อฐาน ผ่านการเชื่อมต่อกันระหว่าง Integrin และ Actin stress fiber และยังมีหน้าที่ในการส่งทอดสัญญาณจากผ่านนอกเซลล์สู่ภายในเซลล์ Focal adhesion ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนหลายตัว ได้แก่ Paxillin (PAX), α -actinin (ACTN), Talin (TLN), Vinculin (Vin), Actopaxin, Focal adhesion kinase (FAK), Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Scr), Extracellular signal-regulated kinases (ERK), Integrin-linked kinase (ILK), Crk และ ARF GTPase-activating protein GIT (GIT) เป็นต้น (López-Colomé et al., 2017)

ในการศึกษา Focal adhesion นิยมใช้โปรตีน Paxillin เป็นโปรตีนบ่งชี้ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของ Focal adhesion โปรตีน Paxillin เป็น single transduction adaptor protein สร้างจากยีน *PXN* จับอยู่กับโปรตีนอื่นที่ทำงานร่วมกัน เช่น FAK และ Src (Tyrosine kinases), Vinculin และ Actopaxin (Structural protein) เมื่อโปรตีน Paxillin ได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งอะมิโนซีรีนหรือทรีโอนีนต่างกัน จะส่งผลต่อการทำงานที่แตกต่างกันเช่นกัน โดยส่วนมากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งไทโรซีนจะส่งผลให้มีการสร้าง Paxillin ที่บริเวณ Focal adhesion โปรตีน Paxillin จะส่งสัญญาณไปควบคุม Cdc42 และ Rac/Ras ในการสร้าง Filopodia และ Lamellipodia ที่ใช้ในการยึดเกาะของเซลล์กับตำแหน่งใหม่ในการเคลื่อนที่ (López-Colomé et al., 2017; Vindis et al., 2004; Nakamura et al., 2000) (รูปที่ 2.18)



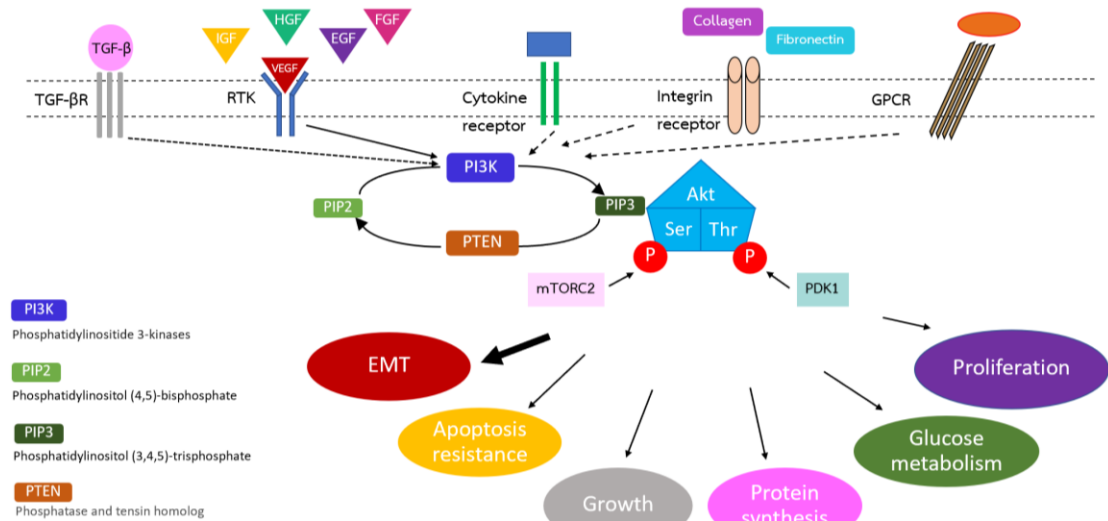
รูปที่ 2.18 แสดงวิถีสัญญาณของ Paxillin ในการควบคุม Focal adhesion (ข้อมูลจาก López-Colomé et al., 2017)

2.5 วิธี Akt-dependent tyrosine kinase (Akt)

โปรตีน Akt (protein kinase B หรือ PKB) เป็นไคนเนสเอนไซม์ มีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตอย่างจำเพาะเจาะจงให้กับหมู่อะมิโนซีรีน/ทรีโอนีนของโปรตีนเป้าหมาย โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตอาจกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนเหล่านั้น วิธี Akt เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ กระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งที่ต้องการตายแบบอะพอพโทซิส กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ควบคุมการเมตาบอลิซึมของกลูโคส และ กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Hers et al., 2011)

กลไกการควบคุมการทำงานของวิธี Akt เริ่มจากการจับกันระหว่างไลแกนด์ (Ligand) และ ตัวรับ (Receptor) เช่น TGF- β จับกับตัวรับของ TGF- β , Hepatocyte growth factor (HGF), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF) และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) จับกับตัวรับไทโรซีนไคนเนส (RTK) ทำให้เกิดการกระตุ้น PI3K จากนั้น PI3K ทำการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับสารสื่อสัญญาณตัวที่สอง (Second messenger) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) ได้เป็น Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ Akt เคลื่อนที่มายังเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้น Akt จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตได้ทั้งจาก PDK1 ที่บริเวณ Thr308 และจาก mTORC2 ที่บริเวณ Ser473 โปรตีน Akt ที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตแล้วจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการกระตุ้นหรือยับยั้งโปรตีนเป้าหมายต่างๆ เป็นผลให้เกิดกระบวนการต่างๆ ตามที่ได้กล่าวข้างต้น (รูปที่ 2.19) (Hennessy et al., 2005; Facchinetti et al., 2008)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Phospho-Akt (Ser473) หรือ Active form มีการเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็กมากถึงร้อยละ 89 (Brognaud et al., 2001) ของเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็กทั้งหมด เมื่อทำการทดลองยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt ที่ตำแหน่ง Ser473 ด้วย LY294002 พบว่าเซลล์มะเร็งปอดมีการตายแบบอะพอพโทซิสมากขึ้น ในเซลล์มะเร็งปอดที่ได้รับ LY294002 ร่วมกับยาเคมีบำบัด พบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมากกว่าเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (Scrima et al., 2012) วิธี Akt จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการยับยั้งมะเร็งปอด นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี Akt มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อทำการลดการแสดงออกของ Akt ด้วย RNA interference หรือ ลดการทำงานของ Akt สามารถลดการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งปอด ผ่านทางการยับยั้งกลไกการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Qu et al., 2015)

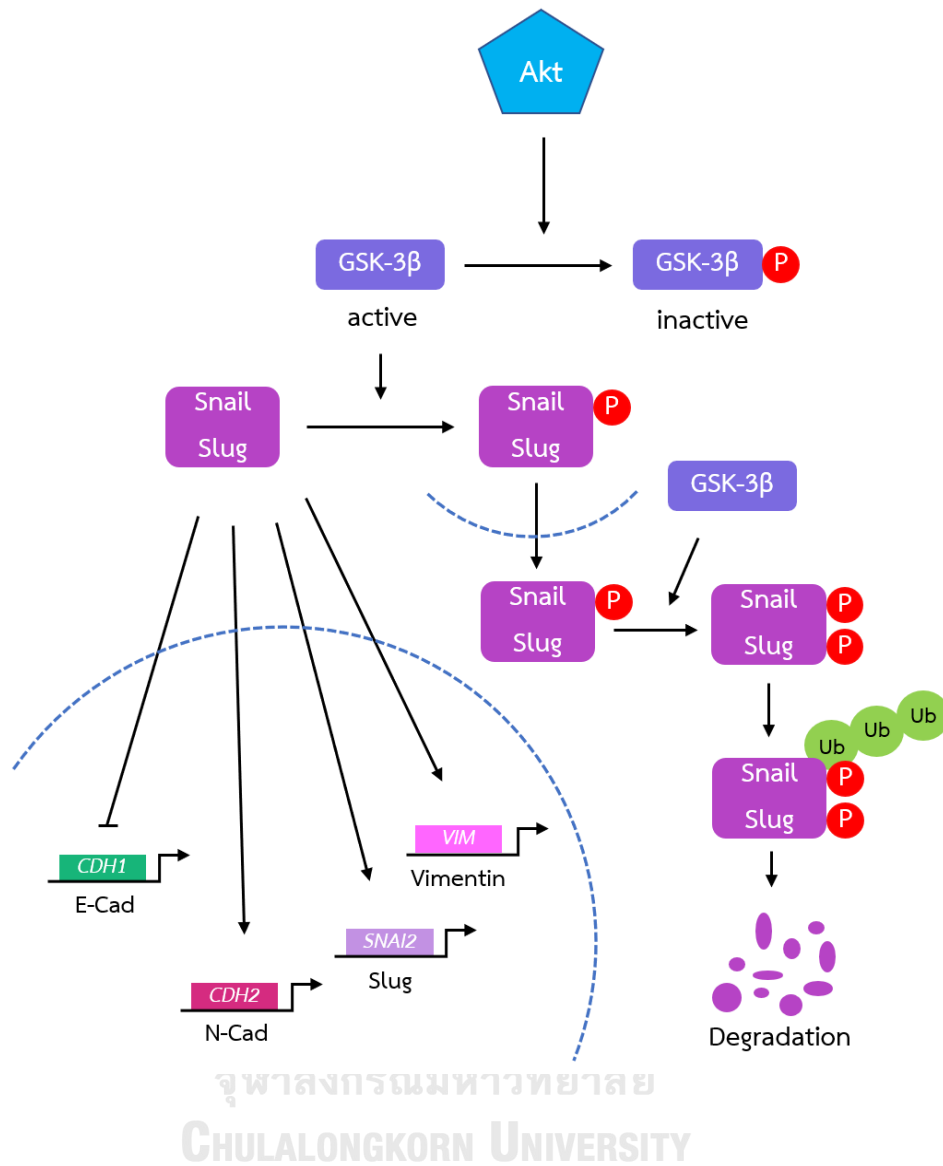


รูปที่ 2.19 วิถีสัญญาณ AKT-dependent tyrosine kinase (Akt)

จากที่กล่าวข้างต้น วิถี Akt มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ทั้งการควบคุมกระบวนการแปลรหัสหรือการตัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัสของโปรตีนเป้าหมาย (Irie et al., 2005; Larue and Bellacosa, 2005) ดังนี้

1) บทบาทของ Akt ต่อโปรตีนบ่งชี้ EMT ได้แก่ Snail, Slug, E-Cad และ N-Cad

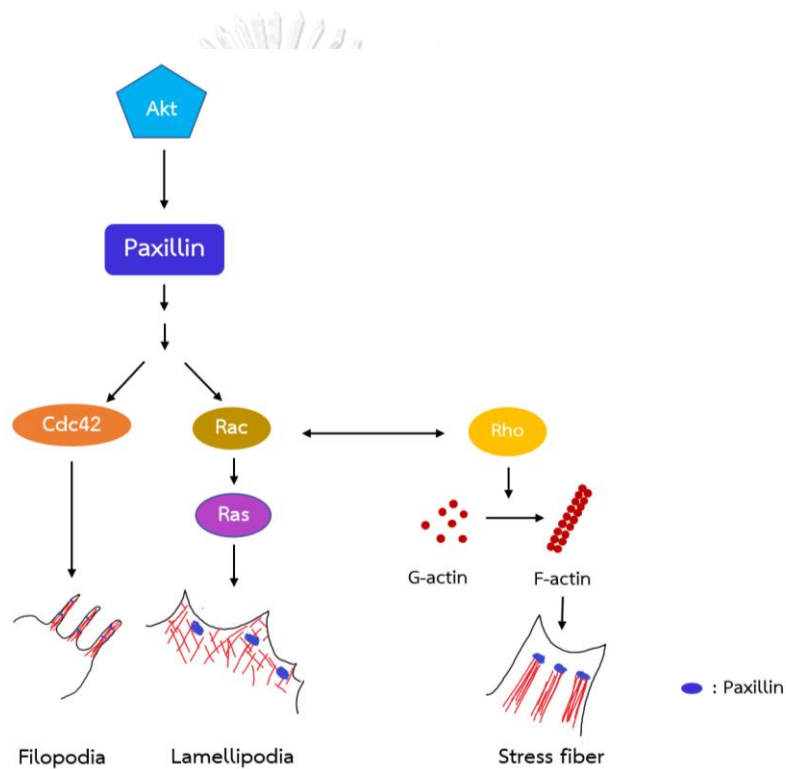
ทั้ง Snail และ Slug มีค่าครึ่งชีวิตสั้น โปรตีนนี้จะถูกทำลายด้วยกระบวนการ Proteolytic ผ่าน Ubiquitination โดยวิถี Akt/GSK-3 β โปรตีน GSK-3 β จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Snail และ Slug ครั้งแรกเพื่อส่งเสริมการเคลื่อนที่ออกนอกนิวเคลียส และเติมหมู่ฟอสเฟตอีกครั้งเพื่อกระตุ้นให้ Ubiquitin มาจับและเกิดการทำลายผ่าน 26s Ribosome ในการทำงานของ GSK-3 β จะถูกควบคุมด้วยโปรตีน Akt กล่าวคือ เมื่อ Akt เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ GSK-3 β ทำให้ GSK-3 β เปลี่ยนจากรูปที่สามารถทำงานได้ ไปเป็นรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (รูปที่จับกับหมู่ฟอสเฟต) ทำให้ Snail และ Slug ไม่ถูกทำลาย นอกจากนั้นโปรตีน Akt ยังสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ N-Cad, Slug และ Vimentin ในทางตรงกันข้ามยังยับยั้งการสังเคราะห์ E-Cad ในเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Peinado et al., 2007; Schlessinger and Hall, 2004) จากการศึกษาพบว่าการลดการทำงานของ Akt ทำให้มีปริมาณ Snail และ Slug ลดลง ส่งผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Li et al., 2015; Li et al., 2017) (รูปที่ 2.20)



รูปที่ 2.20 แสดงการทำงานของวิถี Akt/GSK-3 β ต่อโปรตีน Snail และ Slug

2) บทบาทของ Akt ต่อ Paxillin

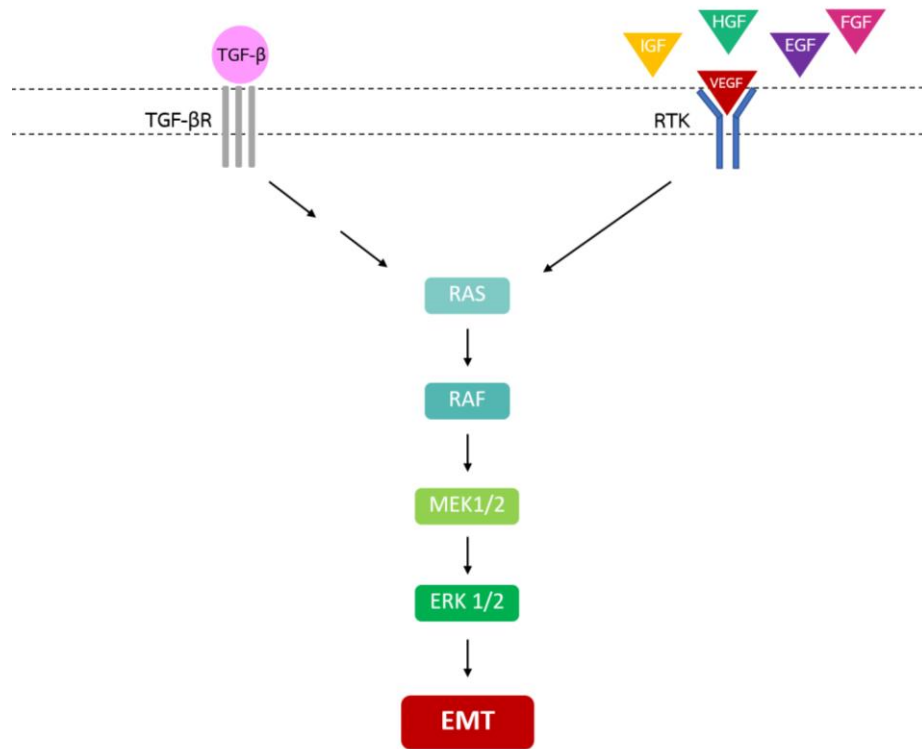
เมื่อ Paxillin ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วย Akt จะเกิดการกระตุ้นให้มีการสร้าง Paxillin ที่บริเวณ Focal adhesion ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ Cdc42, Rac และ Rho ให้มีการสร้าง Filopodia Lamellipodia และ Stress fiber ตามลำดับ (รูปที่ 2.21) ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Zhang et al., 2010; Metalli et al., 2010; Schaller, 2001; Tsukada et al., 2008) จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งที่มีการเพิ่มการแสดงออกของ Akt ทำให้มีปริมาณ Paxillin เพิ่มขึ้นและมีการแพร่กระจายมากขึ้น (Zhang et al., 2010)



รูปที่ 2.21 แสดงกลไกการสร้าง Filopodia, Lamellipodia และ Stress fiber ผ่านวิถี Akt (ข้อมูลจาก Tsukada et al., 2008)

2.6 วิธี Extracellular signal-regulated kinase (ERK)

วิธี ERK ที่มีบทบาทต่อการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้เช่นเดียวกัน ERK เป็นไคเนสเอนไซม์ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเป้าหมายตอบสนองต่อ Growth factor เช่น IGF, HGF, VEGF, EGF และ FGF ที่จับกับตัวรับไทโรซีนไคเนส (RTK) หรือการกระตุ้นจาก TGF- β ผ่านตัวรับ TGF- β เช่นเดียวกับ Akt กลไกการทำงานของวิธี ERK เริ่มจากการจับกันระหว่างไลแกนด์กับตัวรับ หลังจากนั้นสัญญาณจะถูกส่งผ่านไปยัง RAS (Rat sarcoma; โปรตีน small GTPase), Rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF), Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2) และ ERK1/2 ตามลำดับ (Thomas GM and Huganir RL, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.22 จากนั้น ERK ที่อยู่ในรูปกัมมันต์ (Phospho-ERK) จะเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่นิวเคลียสและจับกับ Transcription factor เช่น ZEB1, ZEB2, Snail และ Slug เป็นต้น กระตุ้นให้เกิดกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Singh, et al 2018; Navandar et al., 2017) จากหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบการเพิ่มขึ้นของวิธี ERK ในเซลล์มะเร็งหลายชนิดเช่น เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี เซลล์มะเร็งหลอดลม และเซลล์มะเร็งปอด (Bae et al., 2013; Joannes et al., 2014; Wu et al., 2015; Buchegger et al., 2017) มีการศึกษาโดยกระตุ้นการทำงานของ ERK พบว่าเพิ่มการเกิดกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ และทำให้มะเร็งเกิดการแพร่กระจายมากขึ้น (Xie et al., 2004) และเมื่อลดการแสดงออกของ ERK ด้วย U0126 หรือตัวยับยั้ง ERK (Buonato and Lazzara, 2013) หรือโปรตีนภายในเซลล์ที่สามารถยับยั้งวิธี ERK ได้เช่น Scribble ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการคงรูปของเซลล์เยื่อผิว (Elsum et al., 2013) สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้ ดังนั้นวิธี ERK จึงเป็นอีกวิธีที่น่าสนใจในการศึกษาเพื่อยับยั้งการเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์



รูปที่ 2.22 วิธีสัญญาณ Extracellular signal-regulated kinase (ERK) ต่อการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (ข้อมูลจาก Lamouille et al., 2014)

2.7 ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง Akt ในปัจจุบัน

แนวทางในการรักษาโรคมะเร็งด้วยการยับยั้งวิถี Akt เป็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมะเร็งส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของวิถี Akt (Yap et al., 2008) การศึกษาสารที่ใช้ในการยับยั้งวิถี Akt แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่ม Allosteric inhibitors เป็นสารที่ยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Akt ที่บริเวณ PH-domain ของ Akt เพื่อป้องกันไม่ให้ Akt ถูกกระตุ้นและเคลื่อนมายังบริเวณ Plasma membrane เกิดการทำงานต่อไปได้ และกลุ่ม ATP-competitive inhibitors ของ Akt (Brown and Banerji, 2017)

1. กลุ่ม Allosteric inhibitors ตัวอย่างยาที่มีการศึกษาและใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ได้แก่

- Perifosine เป็นยาตัวแรกในกลุ่ม Akt inhibitor ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษามะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ใหญ่ อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Figg et al., 2014; Unger et al., 2010; Crul et al., 2002) และใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่2 (Natasha, 2008) และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ Perifosine ร่วมกับ Docetaxel ในการรักษามะเร็งเยื่อหุ้มรังไข่ (Fu et al., 2012) และใช้ร่วมกับ Lenalidomide ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด multiple myeloma (Jakubowiak et al., 2014)

- ARQ751 และ ARQ092 ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษามะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ของ PI3K หรือมีการกลายพันธุ์ของ Akt อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ ARQ751 และ ARQ092 ร่วมกับ Carboplatin และ Paclitaxel ในการรักษามะเร็งรังไข่และมะเร็งปากมดลูก (Yu et al., 2015)

- BAY1125976 ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษา Solid tumor อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Janku et al., 2018)

- MK2206 ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Ahn et al., 2015; Dasari et al., 2016) อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่2 และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ MK2206 ร่วมกับ Paclitaxel ในมะเร็งเต้านม (Gonzalez-Angulo et al., 2015) หรือการใช้ร่วมกับ Carbotaxol รักษา มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก (Molife et al., 2014)

2. กลุ่ม ATP-competitive inhibitors ของ Akt ตัวอย่างยาที่มีการศึกษาและใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันได้แก่

- Ipatasertib ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษา Solid tumor อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Saura et al., 2017) และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ Ipatasertib ร่วมกับ Paclitaxel ในการรักษามะเร็งเต้านม (Isakoff et al., 2014)

- Afuresertib ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด multiple myeloma (Spencer et al., 2014) อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ Afuresertib ร่วมกับ Carboplatin และ Paclitaxel ในการรักษามะเร็งรังไข่ที่มีการติดต่อ Platinum (Blagden et al., 2016)

- Triciribine ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษา Solid tumor อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Garrett et al., 2011) และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ Triciribine ร่วมกับ Carboplatin ในการรักษามะเร็งรังไข่ (Mabuchi et al., 2016)

- AZD5363 ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษา Solid tumor อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Tamura et al., 2016; Banerji et al., 2018) ใช้ในการรักษามะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่2 (Sundar et al., 2017) และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ AZD5363 ร่วมกับ Olaparib ในการรักษามะเร็งรังไข่ (Michalarea et al., 2016)

- GSK2141795 ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษามะเร็งรังไข่ อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Aghajanian et al., 2018) มีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ GSK2141795 ร่วมกับ Trametinib ในการรักษามะเร็งเมลาโนมา (Shoushtari et al., 2016)

- LY2780301 ใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษา Solid tumor อยู่ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสที่1 (Azaro et al., 2015) และมีการศึกษาทางคลินิกของการใช้ LY2780301 ร่วมกับ Gemcitabine ในการรักษามะเร็งเต้านม (Angevin et al., 2017)

2.8 ไชพริพิติน

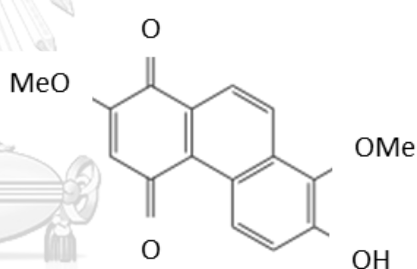
กล้วยไม้เป็นพืชที่มีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรในการแพทย์ทางเลือกในประเทศทางตะวันออกมาช้านาน (Xu et al., 2013) กล้วยไม้เป็นไม้ดอกในวงศ์ *Orchidaceae* และสกุล *Dendrobium* มีจำนวนมากเป็นอันดับที่สองของวงศ์นี้ มีรายงานว่ากล้วยไม้ในสกุลนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพและต้านเชื้อรา ป้องกันเซลล์ประสาทเสื่อม ปรับระบบภูมิคุ้มกัน ต้านการเกาะกันของเกล็ดเลือด ต้านการกลายพันธุ์ และ ต้านมะเร็ง (Lam et al., 2015; Kova'cs et al., 2008) *Dendrobium densiflorum* (รูปที่ 2.23ก) เป็นหนึ่งในสมาชิกของ *Dendrobium* ซึ่งมีสาระสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิด ได้แก่ ไชพริพิติน (Cypripedin) ใจแกนทอล (Gigantol) มอสคาทิลิน (Moscatilin) ทริสติน (Tristin) นารินจินิน (Naringenin) และ โฮโมอีริโอติสโทอล (Homoeriodictyol) (Fan et al., 2001) ผลจากหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสารสกัดที่ได้จาก *Dendrobium densiflorum* มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งซึ่งได้ทดสอบในเซลล์มะเร็งหลายชนิด นารินจินินสามารถยับยั้งการโตของก้อนมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 (Kanno et al., 2005) ยับยั้งการเจริญเติบโต หยุดวงจรชีวิตของเซลล์ และเพิ่มการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 (Arul et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการทดลองให้ นารินจินิน (Naringenin) ร่วมกับ ABT-737 ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กใช้ในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่านารินจินินสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของ ABT-737 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้ (Zhang et al., 2016a) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลของสารสกัด จาก *Dendrobium densiflorum* ที่มีโครงสร้างเป็น Phenolic มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งปอด ได้แก่ มอสคาทิลินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งปอด ผ่านการยับยั้ง Focal adhesion kinase (FAK) (Kowitdamrong et al., 2013) ใจแกนทอลสามารถเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งปอดเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านทาง การยับยั้งกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อไขว้ไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Charoenrungruang et al., 2014; Unahabhokha et al., 2016a; Unahabhokha et al., 2016b) นอกจากนี้ในสารสกัดที่ได้จาก *Dendrobium densiflorum* ยังมีสารที่มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ Quinone ที่มีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเช่นกัน (Matsunaga et al., 2008) โดยความเข้มข้น เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง และกลไกของสารต่อเซลล์มะเร็งของสารต่างๆ ที่สกัดจาก *Dendrobium densiflorum* สรุปดังตารางที่ 2.1

ไซพริพีดิน (1-4 phenanthrenequinone) เป็นสารที่มีโครงสร้างอยู่ในกลุ่มของ Phenanthrenequinone (รูปที่ 2.23ข) ที่สกัดได้จาก *Dendrobium densiflorum* เช่นเดียวกัน มีรายงานว่าได้มีการนำสารไซพริพีดินมาใช้ในการแพทย์ทางเลือก ได้แก่ ยับยั้งอาการปวดเกร็ง กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง อาการปวดศีรษะ ไมเกรน ด้านอาการชัก และระดับประสาท เป็นต้น โดยขนาดที่ใช้ในการรับประทานเพื่อการรักษาคือ 1-3 เกรน หรือเท่ากับ 65-195 มิลลิกรัม (Martindale et al., 1888; Hamilton et al., 1888; Parke et al., 1890; London hospital, 1894; Waugh et al., 1904; Redue, 1907; Singh and Duggal., 2009) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์และกลไกของไซพริพีดินในการต้านมะเร็งปอด ดังนั้นการศึกษาทดลองครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาฤทธิ์ของไซพริพีดิน ในการยับยั้งกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก

(ก)



(ข)



รูปที่ 23 (ก) ดอกของ *Dendrobium densiflorum* (ข) โครงสร้างของ Cypridin (1-4 phenanthrenequinone)

ตารางที่ 2.1 แสดงความเข้มข้น เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง และกลไกของสารต่อเซลล์มะเร็ง ของสารต่างๆ ที่สกัดจาก *Dendrobium densiflorum*

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	เซลล์ที่ใช้ในทดลอง	กลไกของสารต่อ เซลล์มะเร็ง	อ้างอิง
นารินจีนิน	300	มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231	ยับยั้งการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง	Kanno et al., 2005
	500	มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2		
	200	มะเร็งตับชนิด Hep G2	เพิ่มการตายของเซลล์ แบบอะพอพโทซิส	Arul D et al., 2013
นารินจีนิน ร่วมกับ ABT-737 (5 ไมโครโมลาร์)	40	มะเร็งกระเพาะอาหาร ชนิด SGC7901	เพิ่มการตายของ เซลล์มะเร็งแบบ อะพอพโทซิส	Zhang et al., 2016a
มอสคาทีลิน	1	มะเร็งปอดชนิด H23	ยับยั้งการเคลื่อนที่และ การรุกรานของ เซลล์มะเร็ง	Kowitdamrong et al., 2013
ใจแกนทอล	100	มะเร็งปอดชนิด H460	เพิ่มการตายของ เซลล์มะเร็งแบบ อะพอพโทซิส	Charoenrung- ruang et al., 2014
	20	มะเร็งปอดชนิด H460	-เพิ่มการตายของเซลล์ แบบอะนอยคิส -ยับยั้งกระบวนการ เปลี่ยนแปลงจากเซลล์ เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มี เซนไคม์	Unahabhokha et al., 2016a; Unahabhokha et al., 2016b
9,10 Phenanthrene- quinone	5	มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด MOLT-4	เพิ่มการตายของเซลล์ แบบอะพอพโทซิส	Matsunaga et al., 2008

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 และ H23 ซึ่งได้จาก American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 ที่มีการเติม Fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10, L-glutamine 2 มิลลิโมลาร์, Streptomycin และ Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5

3.1.2 การเตรียมสารสกัดไซโทพรีตีน

สารไซโทพรีตีนได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ เกศชกร ดร.บุญชู ศรีตุลาภิรักษ์ ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตรียมสารละลายเข้มข้นของสารไซโทพรีตีน ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในการทดลองแต่ละครั้งจะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ในการเจือจางสารละลายเข้มข้น เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในแต่ละการทดลองน้อยกว่า ร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

3.1.3 สารเคมี

- Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 medium [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- L-glutamine [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- Penicillin [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- Streptomycin [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- Fetal bovine serum (FBS) [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- 0.25% Trypsin-EDTA [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- Phosphate-buffered saline (PBS) [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) [Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)]

- DMSO [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- Hoechst33342 [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- LY294002 (Akt inhibitor) [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- Cycloheximide (CHX) [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- MG132 (Proteasome inhibitor) [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- Matrigel [Corning (Steuben, NY, USA)]
- Agar noble [BD Difco (Franklin Lakes, NJ, USA)]
- Protein G Sepharose beads [GE Healthcare (Björkgatan, Uppsala, Sweden)]
- Mouse anti-paxillin [BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)]
- Mouse anti-GAPDH [Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)]
- Rabbit anti-Ubiquitin [Dako (Santa Clara, CA, USA)]
- Rabbit anti-Snail, rabbit anti-Slug, rabbit anti-Vimentin, rabbit anti-N-cadherin, rabbit anti-phosphorylated Akt (Ser473), rabbit anti-Akt, rabbit anti-phosphorylated GSK-3 β (Ser9), rabbit anti-GSK-3 β , rabbit anti-phosphorylated ERK 1/2 (Thr202 and Thr204) and rabbit anti-ERK [Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)]
- Secondary antibodies Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 568 phalloidin [Life Technologies (Eugene, OR, USA)]
- Secondary antibody anti-rabbit IgG HRP-linked, anti-mouse IgG HRP-linked [Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)]
- Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate [Merck Millipore, Corp (Billerica, MA, USA)] and [Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)]
- First stairs cDNA synthesis kit (ProtoScript II reverse transcriptase M0368) [NEB (Ipswich, MA, USA)]
- iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix [Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)]
- BCA protein assay kits [(Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)]
- 10X Tris Transfer buffer [Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)]

- 10X Tris Running buffer [Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)]
- 40% Acrylamide [Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)]
- Protein ladder [Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)]
- Ammonium persulfate [Sigma Chemical, Inc (St. Louis, MO, USA)]
- TMED [Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)]
- Hydrochloric acid [Merck Millipore, Corp (Billerica, MA, USA)]
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) [Merck Millipore, Corp (Billerica, MA, USA)]
- Sodium bicarbonate [Merck Millipore, Corp (Billerica, MA, USA)]
- Sodium chloride [Merck Millipore, Corp (Billerica, MA, USA)]
- Skim milk powder for blotting [SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany)]
- Bovine serum albumin (BSA) [Nacalai tesque, Inc (Nakagyo-ku, Kyoto, Japan)]
- Opti-MEM™ [GIBCO (Grand Island, NY, USA)]
- Lipofectamin®2000 [Invitrogen, (Carlsbad CA, USA)]
- Akt plasmid (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ญ. ดร.สุจิตต์ ล้วนพิชญ์พงศ์ จากศูนย์ความเป็นเลิศทางงานวิจัยสเต็มเซลล์ของศิริราช สังกัดงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล)

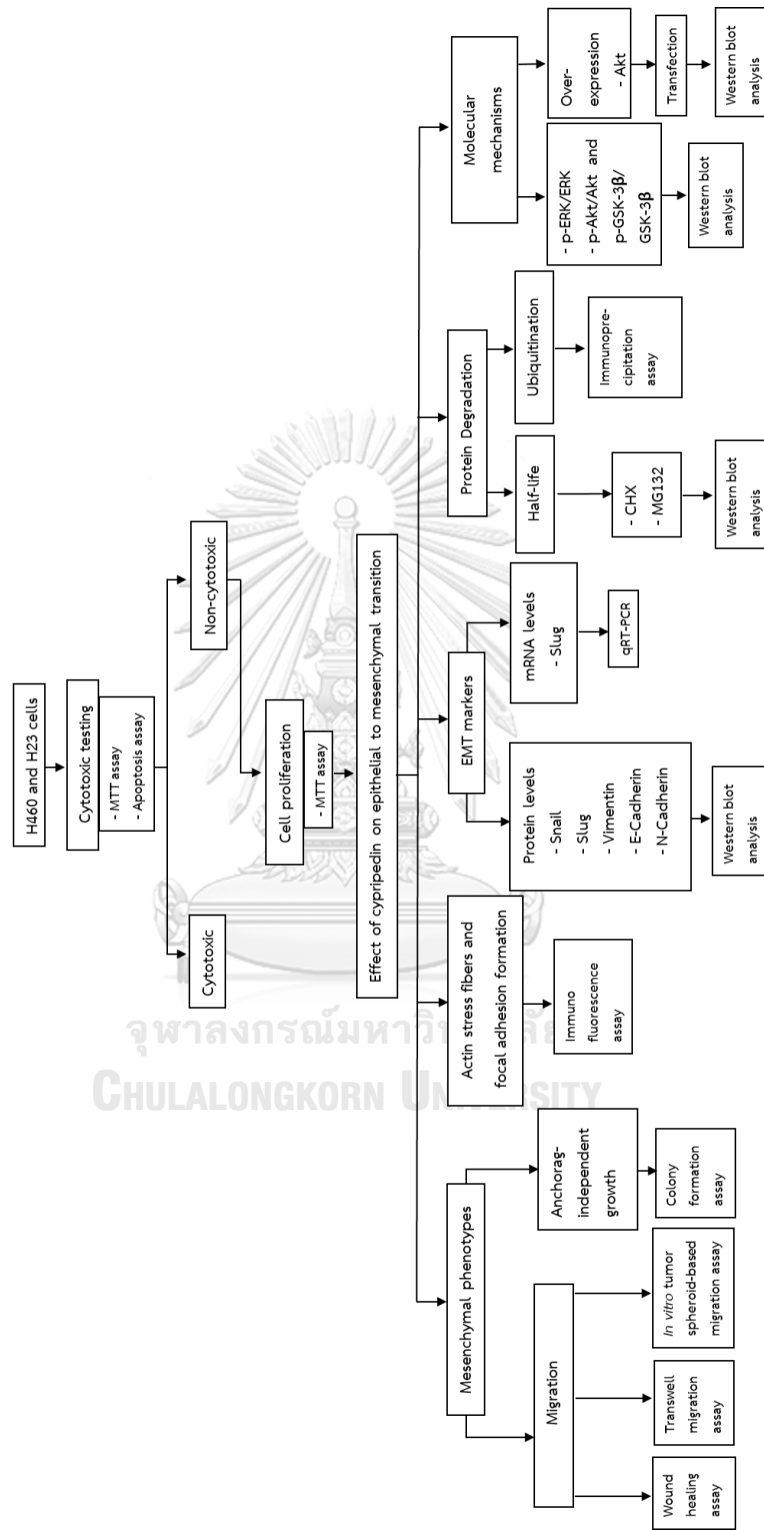
3.1.4 อุปกรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ตู้ Laminar flow
- ตู้ Humidified incubator
- เครื่อง Vortex mixer
- เครื่อง Centrifuge
- เครื่อง Mini rocker
- เครื่อง pH meter
- เครื่อง Microplate reader
- กล้อง Fluorescence microscope
- กล้อง Light microscope
- เครื่อง Heat box
- ชุดอุปกรณ์ Western blot (Bio-rad)

- งานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด: 6 หลุม, 24 หลุม และ 96 หลุม
- งานเพาะเลี้ยงเซลล์เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด: 60 มิลลิเมตร และ 10 เซนติเมตร
- Autopipette: 0.2-2 ไมโครลิตร, 2-20 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ 200-1,000 ไมโครลิตร
- Pipette tip: 1-20 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ 200-1,000 ไมโครลิตร
- Conical tube: 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
- Centrifuge tube: 1.5 ไมโครลิตร และ 5 ไมโครลิตร



3.2 รูปแบบงานวิจัย



รูปที่ 3.1 รูปแบบงานวิจัย

3.3 การออกแบบการทดลอง

3.3.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารไซพรีพิดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพรีพิดิน ต่อการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธีการ MTT assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 10^4 เซลล์ต่อหลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับไซพรีพิดินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-200 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงใส่สารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในเซลล์ที่ทำการทดสอบไว้ แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม DMSO ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อละลายผลึก formazan และวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย formazan ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer VICTOR³/Wallac 1420) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาอัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพัทธ์ (Relative cell viability) จากสมการ

$$\text{อัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพัทธ์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}}$$

นอกจากนั้นทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยทำการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst 33342 ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 10^4 เซลล์ต่อหลุมของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับไซพรีพิดินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-200 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงบ่มกับ Hoechst 33342 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นนำเซลล์ไปถ่ายรูปร่างอย่างสุ่มอย่างน้อย 5 รูปต่อความเข้มข้นเพื่อศึกษาลักษณะนิวเคลียสโดยกล้อง Fluorescence microscopy (Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-U Ti-U/B) เซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส นิวเคลียสจะมีลักษณะหดเล็กลง โครมาตินเกาะกลุ่ม มีการแยกออกของ apoptotic body และคำนวณหาร้อยละของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากสมการ

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสในกลุ่มทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดในกลุ่มทดลอง}}$$

3.3.2 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดิน ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ด้วยวิธีการ MTT assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^3 เซลล์ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใส่สารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จากการศึกษาที่ 3.3.1 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 3×10^3 เซลล์ต่อหลุมและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงใส่สารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในเซลล์ที่ทำการทดสอบไว้ แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม DMSO ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อละลายผลึก formazan และวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย formazan ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer VICTOR³/Wallac 1420) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สัมพัทธ์ (Relative cell proliferation) ที่เวลาต่างๆเทียบกับเวลาเริ่มต้นจากสมการ

$$\text{อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สัมพัทธ์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลองที่เวลาต่างๆ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลองที่เวลาเริ่มต้น}}$$

เนื่องจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้ Wound healing assay ผลการเพิ่มจำนวนเซลล์อาจรบกวนการแปลผลการวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ เพื่อเป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์อย่างแท้จริง จึงนำความเข้มข้นของสารที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มาใช้ศึกษาในการทดลองต่อไป

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3.3 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อลักษณะเซลล์มีเซนไคม์

3.3.3.1 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด

H460

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดิน ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย Wound healing assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อหลุมบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ที่ 37 องศาเซลเซียส และใส่สารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุมและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปลาย Pipette tip ขนาด 10 ไมโครลิตร ชีตลงบนพื้นผิวเซลล์เป็นเส้นตรง เพื่อให้เกิดเป็นช่องว่าง จากนั้นล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วย

PBS แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีปริมาณ Fetal bovine serum ร้อยละ 1 ทำการถ่ายรูปเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงขนาดช่องว่าง ณ ตำแหน่งเดิมที่เวลาต่างๆ ภายใต้กล้อง Light microscope (Meiji Techno TC 5100) นำระยะห่างช่องว่างที่เวลาต่างๆ มาคำนวณอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์จากสมการ

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์} = \frac{(X_0 - X_t)}{(Y_0 - Y_{24})}$$

เมื่อ X_0 = ความกว้างของช่องว่างที่เวลาเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ

X_t = ความกว้างของช่องว่างที่เวลา 24, 48, 72 ชม. ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Y_0 = ความกว้างของช่องว่างที่เวลาเริ่มต้น ของกลุ่มควบคุม

Y_{24} = ความกว้างของช่องว่างที่เวลา 24 ชม. ของกลุ่มควบคุม

นอกจากนั้นทำการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย Transwell migration assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารทดสอบไซพริฟิดินในความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาเพาะบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Transwell ชนิด 24 หลุมเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณ Fetal bovine serum ร้อยละ 1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่ชั้นบนของ Transwell และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณ Fetal bovine serum ร้อยละ 10 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ด้านล่างของ Transwell บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่มายังด้านล่างของเยื่อกั้นมาบ่มกับ Ethanol ที่เย็นเป็นเวลา 5 นาที ที่ -20 องศาเซลเซียส และบ่มกับสีย้อมนิวเคลียส DAPI 10 นาที ในที่มีดที่อุณหภูมิห้อง นำเซลล์ไปถ่ายรูปอย่างสุมด้วยกล้อง Fluorescence microscope (Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-U Ti-U/B) อย่างน้อย 5 รูปต่อความเข้มข้นและคำนวณจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่สัมพันธ์ของกลุ่มทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุมจากสมการ

$$\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่สัมพันธ์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อกั้นในกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อกั้นในกลุ่มควบคุม}}$$

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีฟิดิน ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจากก้อนเซลล์มะเร็งด้วย *In vitro* tumor spheroid-based migration ในการทดลองนี้นำเซลล์จำนวน 10^3 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ FBS ร้อยละ 1 ผสมกับ Matrigel ความเข้มข้นร้อยละ 4 และเพาะเลี้ยงบน Agarose ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน จนได้ Spheroid จากนั้นทำการเจือจาง Matrigel ที่มี Spheroid ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ FBS ร้อยละ 10 เพาะในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เพื่อให้ Spheroid กระจายตัวเป็นก้อนเดี่ยวในแต่ละหลุม บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่สารทดสอบไซพรีฟิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 จากนั้นทำการถ่ายภาพขนาดของ Spheroid ที่เวลาเริ่มต้น 0 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์จากสมการ

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์} = \frac{(X_{72} - X_0)}{(Y_{72} - Y_0)}$$

X_{72} = ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของ Spheroid ที่ 72 ชั่วโมงของกลุ่มทดลอง

X_0 = ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของ Spheroid ที่ 0 ชั่วโมงของกลุ่มทดลอง

Y_{72} = ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของ Spheroid ที่ 72 ชั่วโมงของกลุ่มควบคุม

Y_0 = ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของ Spheroid ที่ 0 ชั่วโมงของกลุ่มควบคุม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3.2 การทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีฟิดิน ต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะไร้การยึดเกาะ ด้วยวิธี Colony formation assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารทดสอบไซพรีฟิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาทำการทดสอบ โดยเคลือบพื้นจานเพาะเลี้ยงชั้นล่างด้วย Agarose ร้อยละ 0.5 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อ Agarose ชั้นล่างแข็งตัวแล้วจึงเติม Agarose ร้อยละ 0.3 ผสมกับเซลล์จำนวน 10^3 เซลล์ต่อหลุม นำมาเพาะในจานเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน โดยทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน เพื่อป้องกัน Agarose แห้ง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงย้อมโคโลนีด้วย

สารละลาย Crystal violet ร้อยละ 0.01 ในเอทานอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งแล้วนำไปถ่ายรูปร่างอย่างน้อย 5 รูปต่อความเข้มข้นและคำนวณหาจำนวนและขนาดของโคโลนี ด้วยโปรแกรม Image J

3.3.4 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเรียงตัวของ Actin stress fiber และการสร้าง Focal adhesion ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดิน ต่อการจัดเรียงตัวของ Actin stress fiber และการสร้าง Focal adhesion ของเซลล์ โดยศึกษาจากการแสดงออกของโปรตีน Paxillin ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้ของ Focal adhesion ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์และเส้นใย Actin ด้วย Immunofluorescence assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^3 เซลล์บนกระจก Coverslip ที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการใส่สารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงบ่มเซลล์ กับ Paraformaldehyde ร้อยละ 4 ใน PBS เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด บ่มต่อด้วย Triton-x ร้อยละ 0.1 ใน PBS เป็นเวลา 10 นาที และ BSA ร้อยละ 4 ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำการบ่มเซลล์กับ Primary antibodies ที่จำเพาะกับโปรตีน Paxillin ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและบ่มเซลล์กับ Secondary antibodies ต่อ Phalloidin และ DAPI ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด ล้างเซลล์ด้วย PBS และน้ำกลั่นตามลำดับ ทำการติดกระจก Coverslip ลงบนกระจกสไลด์ด้วย FluorSave (Billerica, MA, USA) และนำไปถ่ายรูปร่างด้วยกล้อง Fluorescence microscope กำลังขยาย 40x objective lens (Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-U Ti-U/B) อย่างน้อย 5 รูปต่อความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์จำนวน Actin stress fiber และ Focal adhesion ด้วยโปรแกรม Image J

3.3.5 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อบุผิวในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดิน ต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ของเซลล์ โดยศึกษาจากการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์ ได้แก่ Snail, Slug, Vimentin และ N-Cadherin และโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์เยื่อบุผิว E-Cadherin ด้วย Western blot analysis ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1

และ 3.3.2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์กับ TMEM lysis buffer ที่ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 20 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 150 มิลลิโมลาร์, NaF 20 มิลลิโมลาร์, Sodium metavanadate ($NaVO_3$) 1 มิลลิโมลาร์, Nonidet-40 ร้อยละ 1, Phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 มิลลิโมลาร์ และ Protease inhibitor cocktail (Roche) บนน้ำแข็ง 40 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 20,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายด้านบนที่ทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุด BSA protein assay kit นำสารละลายโปรตีน 80 ไมโครกรัม ผสมกับ Sampling buffer จากนั้นนำมาต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ทำการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่น PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) บ่มกับ Skim milk ร้อยละ 5 ในบัฟเฟอร์ TBS-T (Tris-HCl pH 7.5 1 โมลาร์, NaCl 2.5 โมลาร์ และ Tween 20 ร้อยละ 0.075) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการบ่ม membrane กับ Primary antibodies ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้าง Antibodies ส่วนเกินด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T จากนั้นจึงบ่มกับ Peroxidase-conjugated secondary antibody ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดการแสดงผลของโปรตีนที่สนใจด้วย Chemiluminescence ของ SuperSignal West Pico หรือ Immobilon Western เกิดเป็นสารเรืองแสง แล้วนำไปล้างฟิล์ม ทำการวัดปริมาณและความเข้มของแถบโปรตีนบนแผ่นฟิล์มด้วยโปรแกรม Image J

3.3.6 การทดสอบผลของสารไซพริพิดินต่อปริมาณ mRNA ของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์ และเซลล์เยื่อผิวในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการศึกษาการแสดงผลของ mRNA ของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อผิวของเซลล์มะเร็งปอดด้วย Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 6×10^5 เซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารทดสอบไซพริพิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาทำการสกัด RNA ด้วย GENEzol reagent (Geneaid Biotech, Shijr, New Taipei, Taiwan) และ RNAprep Pure Kits (TIANGEN® Biotech, Xuhui, Shanghai, China) แล้วทำการเปลี่ยนสาย RNA ให้เป็น cDNA ด้วย ProtoScript® II Reverse Transcriptase (NEB® England, Ipswich, MA, USA) จากนั้นเตรียม Reaction mixture ที่มีส่วนผสมของ 2x iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร Primer ที่จำเพาะต่อ mRNA แต่ละชนิด (แสดงในตารางที่ 1) ปริมาณ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ cDNA template ปริมาณ 500 นาโนกรัม จากนั้นบ่ม Reaction mixture ในเครื่อง

IO-RAD T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และลดอุณหภูมิลงเหลือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ โดยมี *GAPDH* gene เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001)

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับของ Primers ที่ใช้ในการทดลอง

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>SLUG</i>	5'-AGCATTTC AACGCCTCCA-3'	5'-GGATCTCTGGTTGTGGTATGAC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'

3.3.7 การศึกษาหากกลไกของสารไซพรีพิดินในการลดปริมาณ Slug

เพื่อทดสอบว่าสารไซพรีพิดินลดระดับ Slug ผ่านกลไกยับยั้งการสร้าง Slug หรือ เหนี่ยวนำการทำลาย Slug โดยศึกษาอัตราการทำลายของโปรตีนภายในเซลล์ ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อจานของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 5 กลุ่ม

- บ่มสาร Cycloheximide (CHX) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้างโปรตีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรกับเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง
- บ่มสาร CHX ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรกับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงใส่สารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง
- บ่มสารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ กับเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง
- บ่มสาร MG132 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ Proteasome ในการทำลายโปรตีน ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์กับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงใส่สารทดสอบไซพรีพิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง
- บ่มตัวทำละลายสารไซพรีพิดิน DMSO ความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ในการทำละลายสารไซพรีพิดินที่ใช้ในการทดลองนี้กับเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำเซลล์ที่ผ่านการทดสอบแล้วมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Slug ด้วยวิธี Western blot analysis วัดความเข้มของแถบโปรตีน Slug โดยใช้โปรแกรม Image J นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าครึ่งชีวิตจากสูตร

$$\text{ค่าครึ่งชีวิต} = \frac{\text{เวลาที่ใช้ในการทดลอง} \times \log 2}{\log[\text{จำนวนโปรตีนเริ่มต้น}/\text{จำนวนโปรตีนที่เหลือ}]}$$

3.3.8 เพื่อทดสอบว่าสารว่าสารไซพรีพิตินลดระดับ Slug ผ่านการเพิ่มการทำลาย Slug โดยวิธี Ubiquitin-proteasomal

โดยทดสอบหาโปรตีนคู่ทำปฏิกิริยากันระหว่าง Slug และ Ubiquitin จึงใช้ Immunoprecipitation assay ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อจานของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใส่สาร MG132 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงใส่สารทดสอบไซพรีพิตินในความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการบ่มเซลล์กับ TMEM lysis buffer ที่มี Nonidet-40 ร้อยละ 1 ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 20 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 150 มิลลิโมลาร์, NaF 20 มิลลิโมลาร์, Sodium deoxychlorate ร้อยละ 0.5, Nonidet-40 ร้อยละ 1, Phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 มิลลิโมลาร์ และ Protease inhibitor cocktail (Roche) บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 20,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายด้านบนที่ทำการเติม Protein G sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) หมุนกลับหลอดซ้ำๆ เบาๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 20,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เก็บสารละลายด้านบนแล้วทำการเติม Anti-Slug antibodies 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร หมุนกลับหลอดซ้ำๆ เบาๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Protein G sepharose beads เพื่อตกตะกอนโปรตีน Slug-ubiquitin complex หมุนกลับหลอดซ้ำๆ เบาๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 20,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เก็บ Beads มาล้างต่อด้วย TMEM lysis buffer ที่มี Nonidet-40 ร้อยละ 0.5 เพื่อแยกคู่ทำปฏิกิริยาออกจาก Beads แล้วนำโปรตีนที่ได้ทดลองต่อด้วยวิธี Western blot

3.3.9 การทดสอบผลของสารไซฟริพิดินต่อวิถี ERK ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบผลของสารไซฟริพิดินต่อวิถี ERK ของเซลล์ โดยวัดจากการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของวิถี ERK ได้แก่ p-ERK และ ERK ด้วยวิธีการ western blot analysis ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อจานของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและใส่สารทดสอบไซฟริพิดินในความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจึงนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบไซฟริพิดิน มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของวิถี ERK ได้แก่ p-ERK และ ERK ด้วยวิธี Western blot analysis

3.3.10 การทดสอบผลของสารไซฟริพิดินต่อวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการทดสอบผลของสารไซฟริพิดินต่อวิถี Akt ของเซลล์ โดยวัดจากการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของวิถี Akt ได้แก่ p-Akt และ Akt รวมทั้งวัดโปรตีนเป้าหมายหลักของวิถี Akt ได้แก่ p-GSK-3 β และ GSK-3 β ด้วยวิธีการ western blot analysis ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อจานของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและใส่สารทดสอบไซฟริพิดินในความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือสาร LY294002 ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจึงนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบไซฟริพิดินและ LY294002 มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของวิถี Akt ได้แก่ p-Akt และ Akt รวมทั้งโปรตีนเป้าหมายหลักได้แก่ p-GSK-3 β และ GSK-3 β ด้วย Western blot analysis

3.3.11 การทดสอบผลของสารไซฟริพิดินต่อวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งปอด เมื่อทำการเพิ่มการแสดงออกของ Akt (Akt overexpression) ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

ทำการเพิ่มการแสดงออกของ Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยการ Transfection เซลล์ H460 ด้วย Akt plasmid ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 7×10^5 เซลล์ต่อจานของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ Transfect เซลล์ด้วย Akt plasmid โดยผสม pcDNA3-Akt หรือ pcDNA3 (Vector ควบคุม) ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมใน Opti-MEM™ กับ Lipofectamin® 2000 ใน Opti-MEM™ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วหยดสารละลายผสมที่บ่มไว้ลงบนเซลล์และบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม Fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 และบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการใส่สารทดสอบ

ไซพริฟิดินในความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจึงนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบไซพริฟิดิน มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของวิถี Akt ได้แก่ p-Akt และ Akt รวมทั้งโปรตีนเป้าหมายหลักได้แก่ p-GSK-3 β และ GSK-3 β และ Slug ด้วยวิธี Western blot analysis

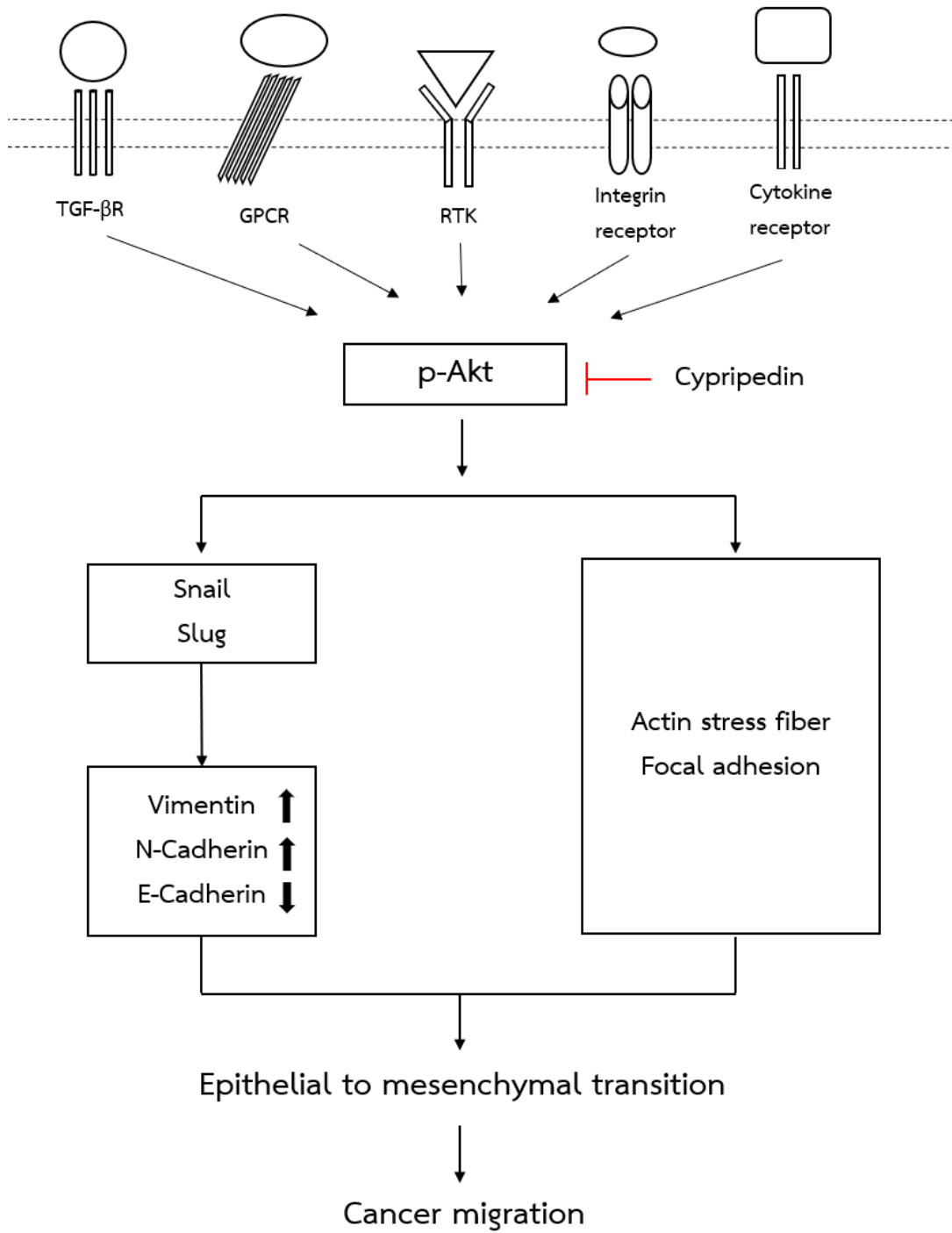
3.3.12 การทดสอบผลของสารไซพริฟิดินต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23

เพื่อเป็นการยืนยันผลของสารไซพริฟิดินว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งปอด จึงทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับที่ทดสอบในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 เริ่มต้นด้วยการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพริฟิดินต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 บ่มเซลล์กับไซพริฟิดินในความเข้มข้นต่างๆ (0-200 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการวัดผลด้วยวิธี MTT assay เมื่อได้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แล้วจึงนำความเข้มข้นเหล่านั้น มาทำการทดสอบผลของสารไซพริฟิดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เช่นเดียวกัน จากนั้นนำความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ส่งผลต่อการเพิ่มหรือการลดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มาใช้ในการทดสอบอื่นๆ ต่อไปได้แก่ ทดสอบผลของสารไซพริฟิดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay, ต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อบุผิว และ ต่อวิถี Akt ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับที่ทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

3.3.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษาแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (mean \pm SEM) จากการศึกษาอย่างน้อย 4 ซ้ำในการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ในการคำนวณ และเลือกใช้สถิติ One way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.4 กรอบแนวคิดงานวิจัย



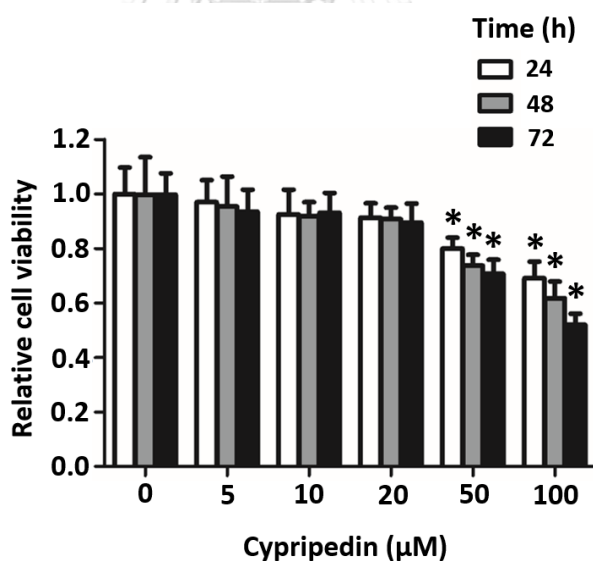
รูปที่ 3.2 กรอบแนวคิดงานวิจัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

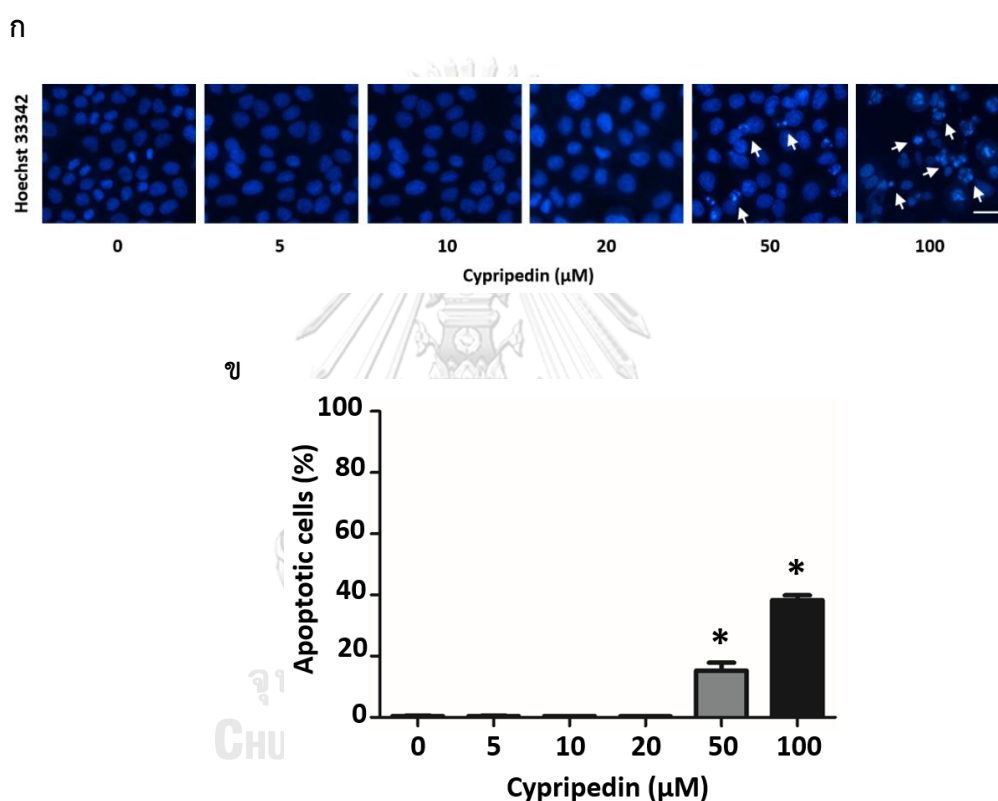
4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารไซพริพิดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

เนื่องจากการในการทดลองผลของสารไซพริพิดินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง เพื่อไม่ให้ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์รบกวนผลการทดลองต่อไป ขั้นแรกจึงต้องทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารไซพริพิดินที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในเซลล์มะเร็งปอด H460 ด้วยวิธี MTT โดยการบ่มสารทดสอบไซพริพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าอัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพันธ์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลดลงเหลือ 0.79 และ 0.69 เท่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง ลดลงเหลือ 0.73 และ 0.61 และที่ 72 ชั่วโมง ลดลงเหลือ 0.7 และ 0.52 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งเวลาที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 แสดงกราฟระหว่างอัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

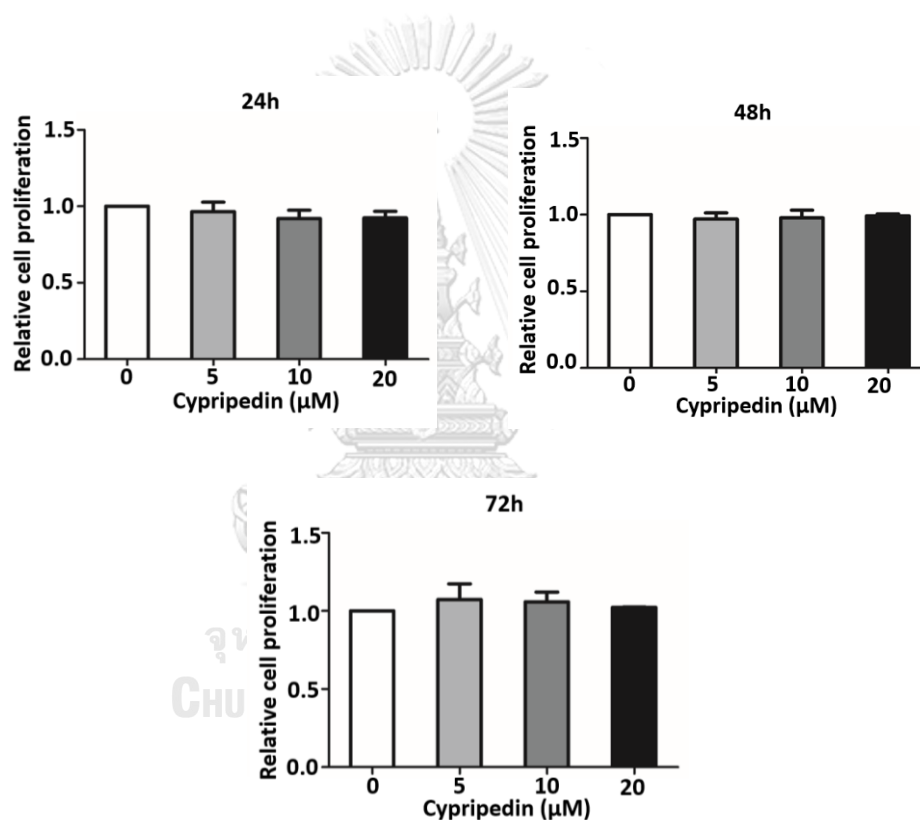
จากนั้นยืนยันผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพริพิดินจากผลการทดลองข้างต้นด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst 33342 เพื่อทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส พบว่าสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส ร้อยละ 15.28 และ 38.29 ตามลำดับ ผลการทดลองทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันและทำให้ทราบถึงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ก. แสดงลักษณะของเซลล์ H460 ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst 33342 ข. แสดงกราฟระหว่างร้อยละของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน เมื่อย้อมเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

4.2 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

เนื่องจากในการทดลองนี้ต้องการศึกษาผลของสารไซพรีพิดินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ มะเร็งปอด เพื่อเป็นการลดปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อผลการทดลอง จึงทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารไซพรีพิดินที่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มหรือการลดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีการ MTT โดยทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นและเวลาบ่มดังกล่าว ไม่ส่งผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นหรือการลดลงของจำนวนเซลล์สัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 แสดงกราฟระหว่างอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีพิดินเมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพรีพิดิน

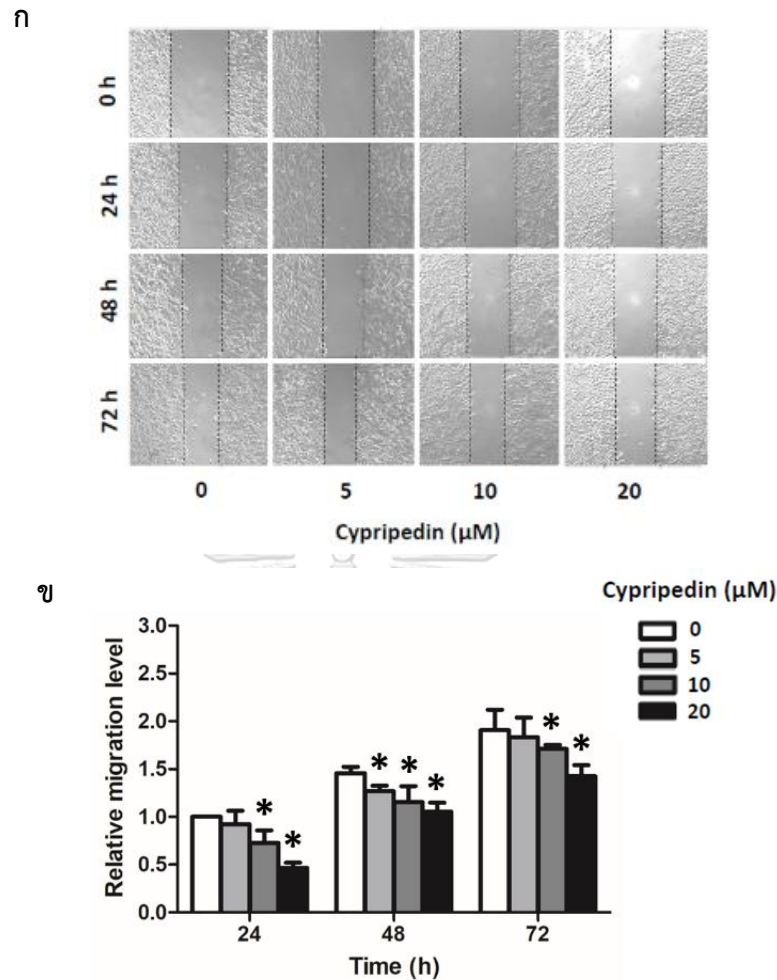
4.3 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อลักษณะเซลล์มีเซนไคม์

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของเซลล์ จากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ การแพร่กระจายและการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ในขณะที่เซลล์หลุดออกจากฐานเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวเพื่อไหลเวียนในกระแสเลือด และถือเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อลักษณะเซลล์มีเซนไคม์ โดยแบ่งการทดลองได้เป็น 2 ส่วนดังนี้

4.3.1 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

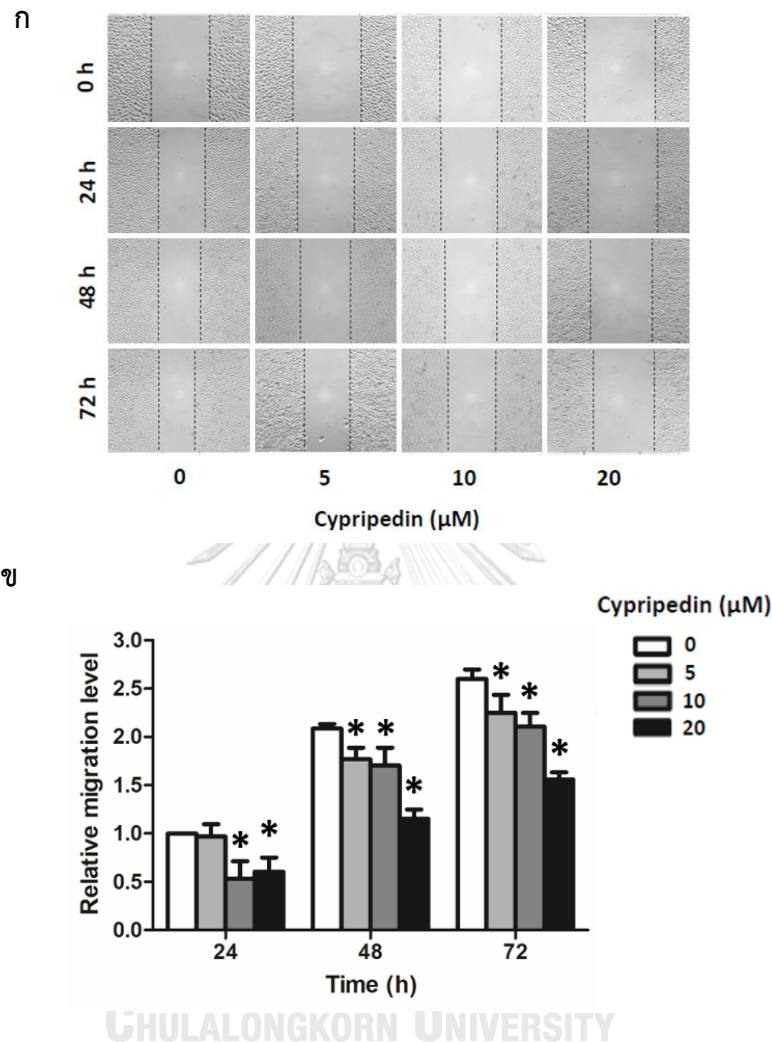
วิธี Wound healing

เมื่อทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับสารแล้วมาทดลองด้วยวิธี Wound healing พบว่าสารไซพรีพิดินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยเริ่มสังเกตเห็นผลได้ตั้งแต่วันที่ 24 ชั่วโมงแรก มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 0.73 และ 0.47 ตามลำดับและเห็นผลชัดเจนขึ้นที่ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 1.27, 1.15 และ 1.05 ตามลำดับ และที่ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 1.71 และ 1.42 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 ก. แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับ สารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

เมื่อทำการบ่มสารไซพริพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับสารแล้วมาทดลองด้วยวิธี Wound healing พบว่าสารไซพริพิดินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์ที่ 0.53 และ 0.6 ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์ที่ 1.77, 1.7 และ 1.15 ตามลำดับ และที่ 72 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์ที่ 2.25, 2.11 และ 1.56 ตามลำดับ (รูปที่ 4.5)

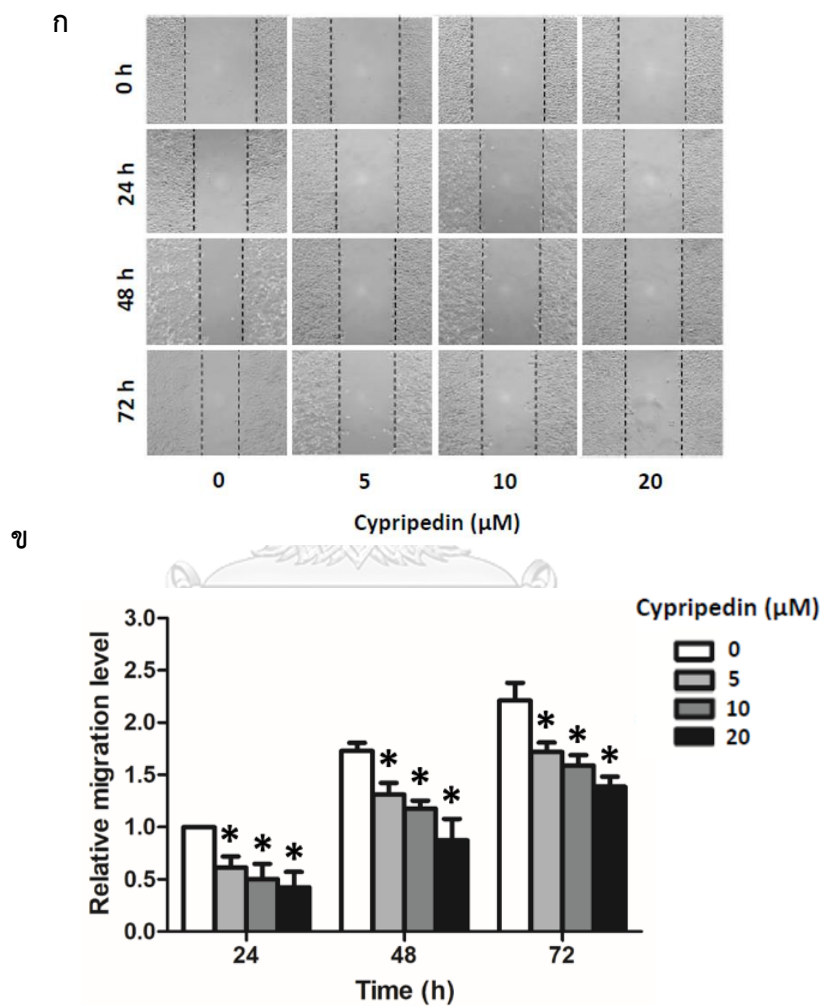


รูปที่ 4.5 แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

เมื่อทำการบ่มสารไซพริพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับสารแล้วมาทดลองด้วยวิธี Wound healing พบว่าสารไซพริพิดินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24

ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 0.61, 0.5 และ 0.42 ตามลำดับที่ 48 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 1.31, 1.18 และ 0.87 ตามลำดับ และที่ 72 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 1.72, 1.59 และ 1.39 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

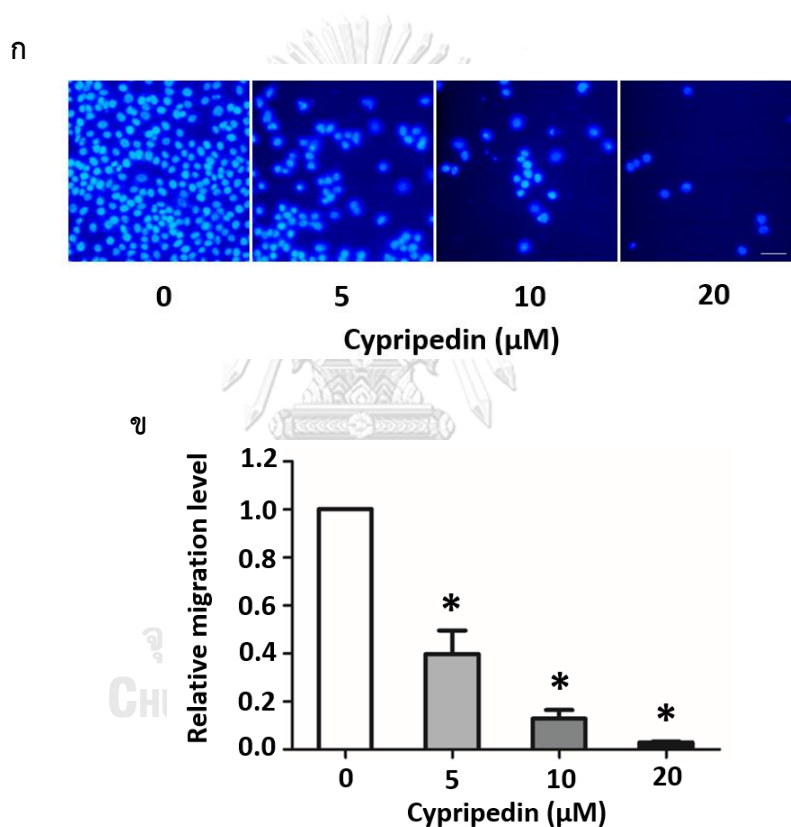
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า การบ่มสารไซพริพิดินกับเซลล์ก่อนเริ่มทำการทดสอบด้วยวิธี Wound healing เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ชัดเจนที่สุด จึงทำการทดลองต่อไปด้วยการบ่มกับสารไซพริพิดิน 72 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.6 ก. แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

วิธี Transwell migration

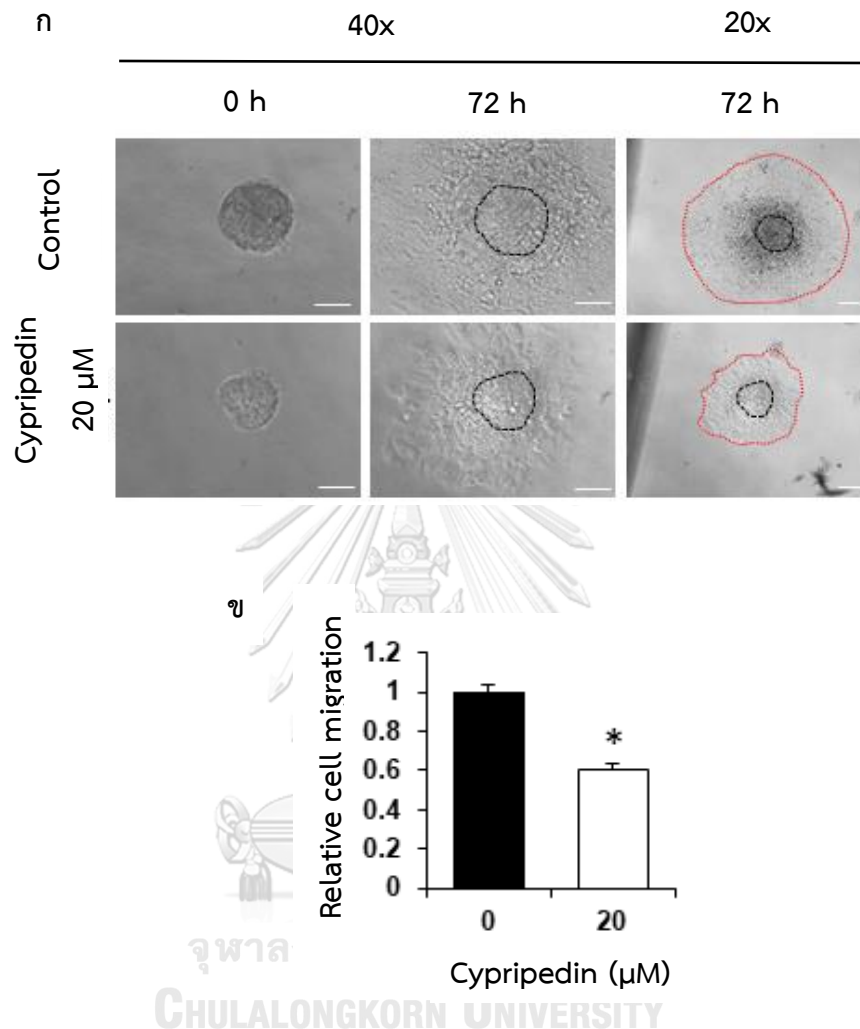
จากนั้นทำการทดสอบผลของสารไซพริพิดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Transwell migration บ่มสารไซพริพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาเพาะบนจานเพาะเลี้ยงแบบ Transwell ชนิด 24 หลุม พบว่าสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่สัมพันธ์เท่ากับ 0.39, 0.15 และ 0.03 ตามลำดับ ผลที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับผลจากการทดลองด้วยวิธี Wound healing (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 ก. แสดงจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อกัน เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข. แสดงกราฟระหว่างจำนวนเซลล์เคลื่อนที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

วิธี *In vitro* tumor spheroid-based migration

ทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อเคลื่อนที่ของเซลล์ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระนาบสามมิติด้วยวิธี *In vitro* tumor spheroid-based migration ซึ่งจะเป็นการจำลองสภาพแวดล้อมของเซลล์ในการทดลอง ให้ใกล้เคียงกับสถานะของเซลล์มะเร็งจริงมากขึ้น เซลล์มะเร็งจะอยู่เกาะกลุ่มกันเป็นก้อนในลักษณะสามมิติ (Spheroid) มีการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ การแสดงออกของวิธีสัญญาณการแสดงออกของยีนบางอย่างที่แตกต่างจากเซลล์ที่อยู่ในระนาบสองมิติ เช่น เซลล์ในระนาบสามมิติตรงกลางของกลุ่มก้อนเซลล์จะเกิดการขาดอาหารและออกซิเจน (Hypoxia) ซึ่ง Hypoxia สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดวิธีสัญญาณ HIF1 α ส่งผลเพิ่มการเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้ เป็นต้น (Vinci et al., 2013) ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มเติมและยืนยันผลให้กับสองการทดลองที่ผ่านมาที่เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระนาบสองมิติซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้น ในการทดลองนี้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวใน Matrigel เพื่อให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้เป็น Spheroid ในลักษณะสามมิติและใกล้เคียงกับการทดลองใน *In vivo* มากที่สุด แล้วจึงนำ Spheroid ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง แล้วทำการใส่สารทดสอบไซพรีพิดินเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าสารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ออกจาก Spheroid ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ลดลงเหลือ 0.6 เมื่อให้กลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 1 (รูปที่ 4.8)



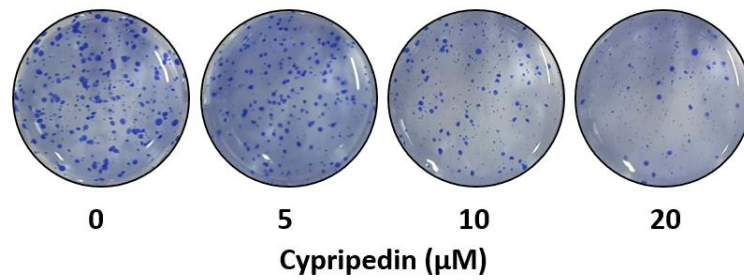
รูปที่ 4.8 ก. แสดงรัศมีของเซลล์ที่เคลื่อนที่ออกจากกลุ่มก้อนเซลล์มะเร็งเมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0 และ 20 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 และ 72 ชั่วโมง ภาพขนาดกำลังขยายของภาพ 40x และ 20x ตามลำดับ ข.แสดงกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

4.3.2 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

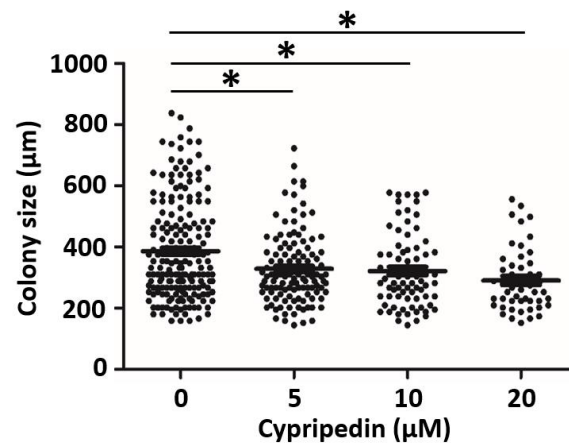
โดยปกติเซลล์ที่หลุดออกจากฐานเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวจะเกิดการตายแบบอะพอโทซิส เนื่องจากขาดการส่งสัญญาณจากฐานเซลล์และเซลล์ข้างเคียง แต่ในเซลล์มะเร็งจะพบว่าเซลล์สามารถมีชีวิตรอดในขณะที่เป็นเซลล์หลุดออกจากฐานเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว ดังนั้นจึงทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปอด ทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาผสมกับ Agarose เพาะในจานเลี้ยงให้เป็นเซลล์เดี่ยว เพื่อจำลองสภาวะที่เซลล์ไร้การยึดเกาะกับฐานเซลล์และบ่มไว้เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เซลล์เดี่ยวเกิดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเป็นโคโลนี ผลการทดลองพบว่าสารไซพรีพิดินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ทั้งขนาดและปริมาณของโคโลนีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่แต่ละจุดที่แสดงในกราฟจุดแสดงถึงจำนวนโคโลนีเดี่ยวแปลผลได้ถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งที่อยู่ในสภาวะไร้การยึดเกาะ และขนาดของเซลล์แปลผลได้ถึงการเจริญเติบโตแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่อยู่ในสภาวะไร้การยึดเกาะ (รูปที่ 4.9)

จากผลการทดลองที่ 4.3 สรุปได้ว่าสารไซพรีพิดินสามารถยับยั้งคุณลักษณะของเซลล์มีเซนไคม์ได้ ทั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ทั้งสองมิติและสามมิติ และยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะไร้การยึดเกาะได้

ก



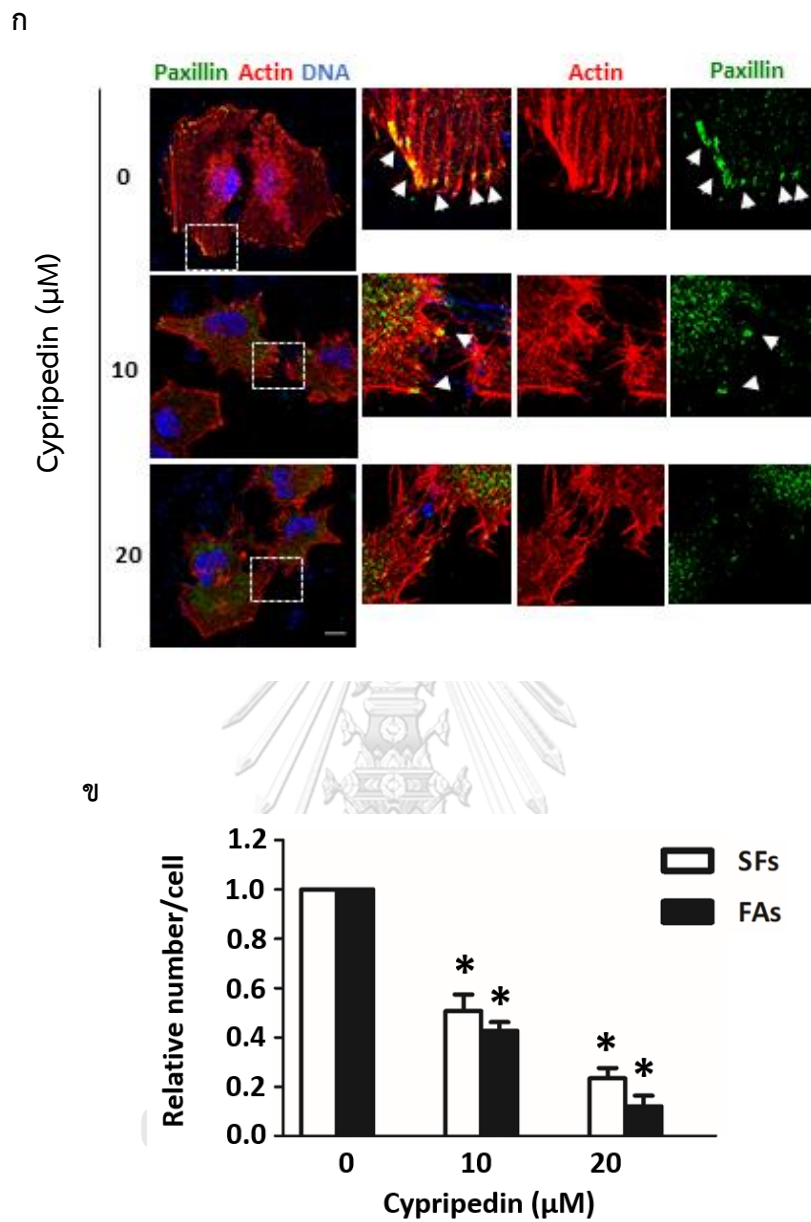
ข



รูปที่ 4.9 ก. แสดงจำนวนและขนาดโคโลนีที่เจริญเติบโตใน agarose เมื่อปมเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อใน Agarose เป็นเวลา 14 วัน ข.แสดงกราฟระหว่างจำนวนเซลล์เคลื่อนที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

4.4 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเรียงตัวของ Actin stress fiber และการสร้าง Focal adhesion ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

เนื่องจากการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่าง Actin stress fiber และ Focal adhesion ดังนั้นจึงทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเรียงตัวของ Actin stress fiber และการสร้าง Focal adhesion ในเซลล์มะเร็ง โดยทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunofluorescence เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของ Actin stress fiber (สีแดง) การแสดงออกของโปรตีน Paxillin (สีเขียว) ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้ของ Focal adhesion และตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนทั้งสอง ผลการทดลองพบว่า สารไซพรีพิดินสามารถลดการแสดงออกของ Actin stress fiber และ Focal adhesion (สีเหลือง) (เกิดจาก Actin stress fiber และ Paxillin อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีปริมาณ Actin stress fiber ต่อเซลล์สัมพันธ์เท่ากับ 0.51 และ 0.23 และ ปริมาณ Focal adhesion ต่อเซลล์สัมพันธ์เท่ากับ 0.43 และ 0.12 ที่ความเข้มข้นของไซพรีพิดิน 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)

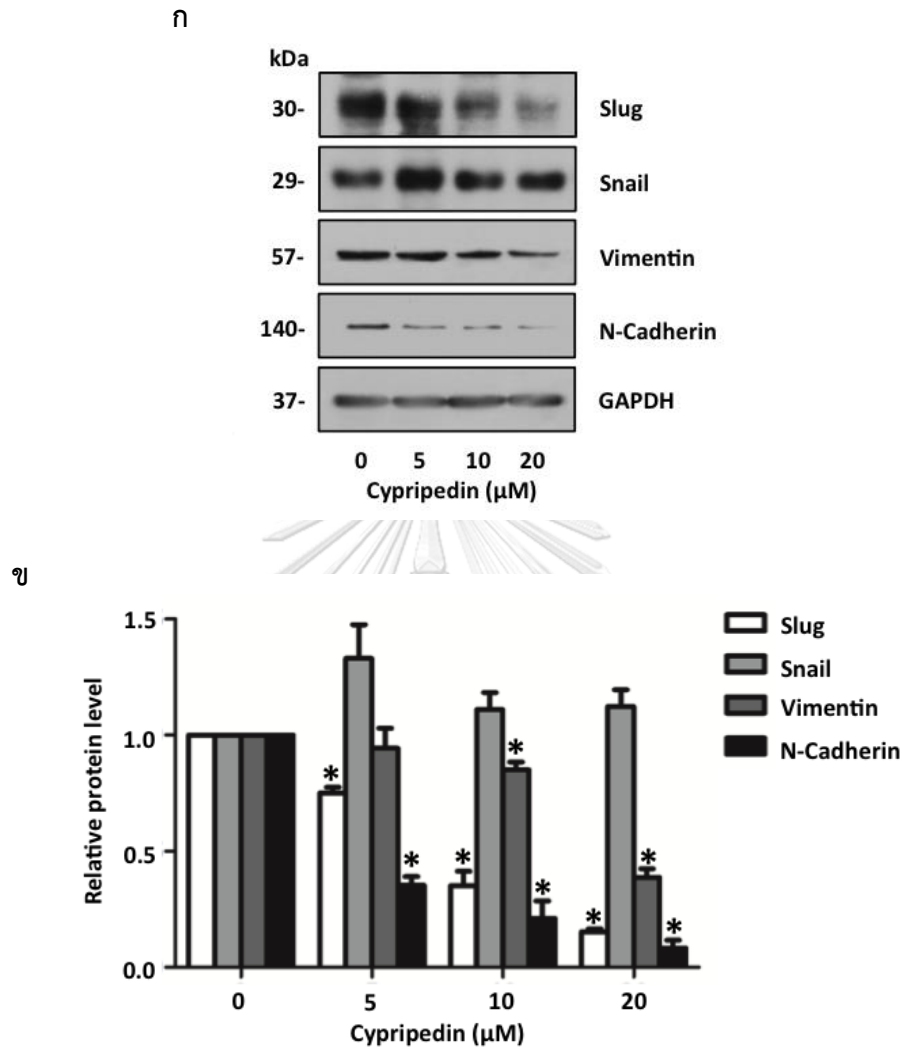


รูปที่ 4.10 ก. แสดงจำนวนและตำแหน่ง Actin stress fiber (สีแดง) โพรตีน Paxillin (สีเขียว) Focal adhesion (สีเหลือง) และ นิวเคลียส (สีน้ำเงิน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาย้อม Immunofluorescence ข. แสดงกราฟระหว่างจำนวน Actin stress fiber (แท่งสีดำ) และ จำนวน Focal adhesion (แท่งสีขาว) ต่อเซลล์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

4.5 การทดสอบผลของไซพรีพิดินต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อหุ้มในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

เพื่อเป็นการยืนยันผลของสารไซพรีพิดินต่อการยับยั้งคุณลักษณะของเซลล์มีเซนไคม์ที่ได้ทำการศึกษาไปแล้วข้างต้น จึงทำการศึกษาผลของสารไซพรีพิดินต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อหุ้มไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ด้วยวิธี Western blot ทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีน พบว่าโปรตีน Slug, N-Cadherin และ Vimentin มีปริมาณลดลงแปลผลผันกับความเข้มข้นที่มากขึ้นของสารไซพรีพิดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ Snail ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.11)

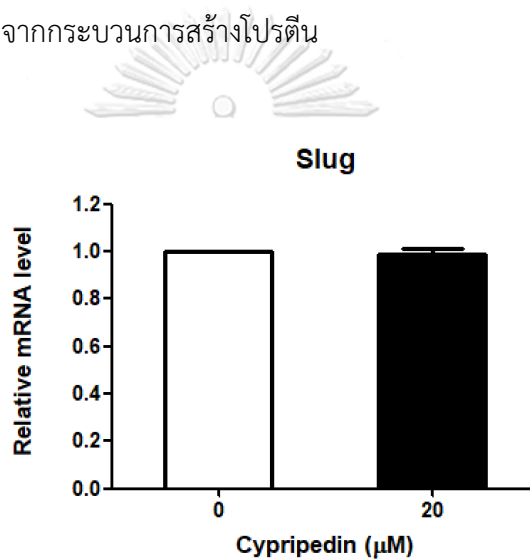




รูปที่ 4.11 ก. แสดงปริมาณโปรตีน Slug, Snail, Vimentin, N-Cadherin และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพีดินที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข. แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพีดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพีดิน

4.6 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อปริมาณ mRNA ของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อหุ้มในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

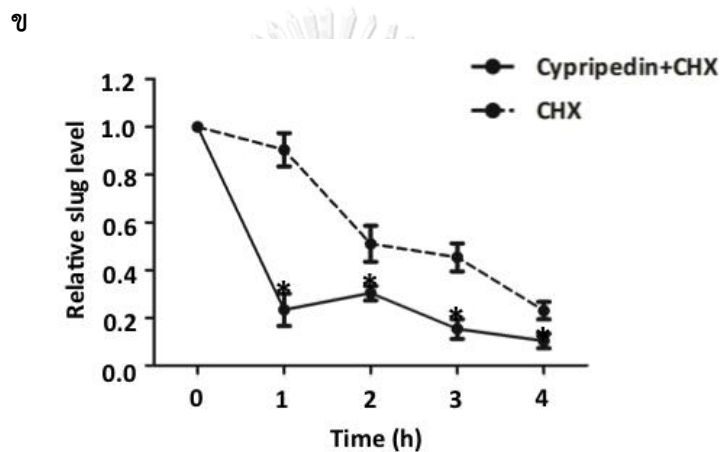
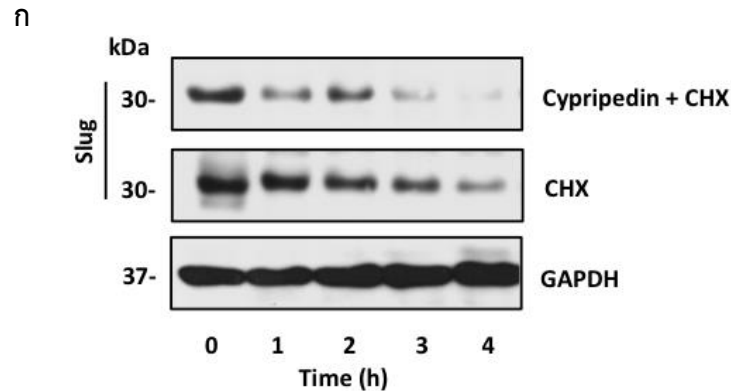
หลังจากที่พบว่าสารไซพรีพิดินสามารถทำให้ปริมาณโปรตีน Slug ลดลงได้ จึงทำการทดลองต่อเพื่อทดสอบว่าสารไซพรีพิดินยับยั้งการ Transcription ของ Slug หรือไม่ โดยทำการศึกษาปริมาณ mRNA ด้วยวิธีการ qRT-PCR ทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมา ศึกษาระดับ mRNA ของ Slug พบว่าไม่พบความแตกต่างของระดับ mRNA สัมพัทธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าโปรตีน Slug ที่มีปริมาณลดลงหลังจากได้รับสารไซพรีพิดิน ไม่ได้ลดลงจากกระบวนการสร้างโปรตีน



รูปที่ 4.12 แสดงกราฟระหว่างปริมาณ mRNA สัมพัทธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีพิดิน เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 0 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพรีพิดิน

4.7 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อค่าครึ่งชีวิตของ Slug และกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

จากการทดลองที่ 4.5 พบว่าโปรตีน Slug มีปริมาณลดลงหลังได้รับสารไซพรีพิดิน และเมื่อทำการศึกษาต่อพบว่าการลดลงของ Slug ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการลดการสร้าง (การทดลองที่ 4.6) จึงทำการทดลองต่อเพื่อหาสาเหตุที่ทำให้โปรตีน Slug มีปริมาณลดลงโดยมีสมมติฐานว่าสารไซพรีพิดิน อาจเพิ่มการทำลายของโปรตีน Slug จากการศึกษาก่อนพบว่า Slug ถูกทำลายด้วยกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin (Peinado H et al., 2007; Schlessinger K and Hall A, 2004) Ubiquitin เป็นพอลิเปปไทด์ทำหน้าที่กำหนดโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการให้เกิดการทำลายผ่าน Proteasome 26S ทำการทดลองโดยบ่มเซลล์กับสาร Cycloheximide (CHX) ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนก่อนแล้วจึงใส่สารไซพรีพิดิน เพื่อต้องการดูอัตราการทำลายโปรตีนภายในเซลล์ โดยไม่มีปัจจัยด้านการสร้างโปรตีนใหม่มารบกวน พบว่าสารไซพรีพิดินสามารถเพิ่มอัตราการทำลายโปรตีนโดยลดค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน Slug ได้ โดยจะเห็นได้ว่าที่เวลาเดียวกันปริมาณโปรตีน Slug ในกลุ่มที่ได้สารไซพรีพิดินมีประมาณน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ CHX เพียงอย่างเดียวและเมื่อนำปริมาณโปรตีน Slug ที่ได้จากการทดลอง มาคำนวณหาค่าครึ่งชีวิตของ Slug พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ CHX เพียงอย่างเดียวมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 1.88 ชั่วโมง (รูปที่ 4.13 และ 4.15) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารไซพรีพิดินร่วมกับสาร CHX โปรตีน Slug มีค่าครึ่งชีวิตลดลงเหลือประมาณ 0.72 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าสารไซพรีพิดินสามารถลดค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน Slug ได้ (รูปที่ 4.13 และ 4.15)

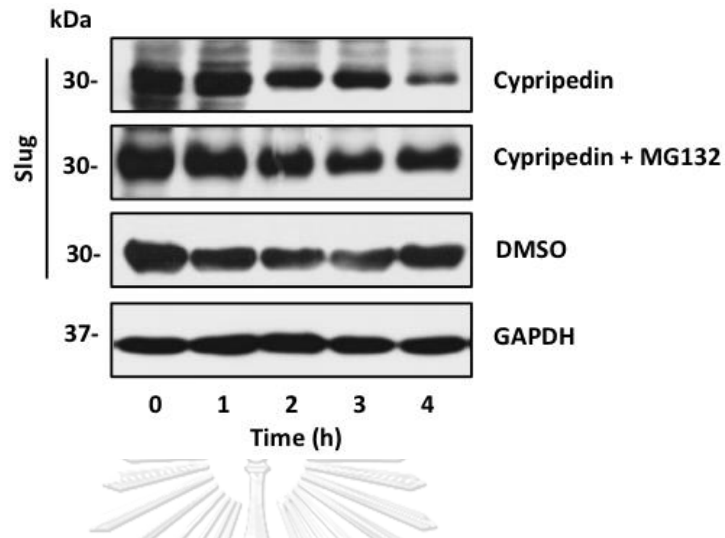


รูปที่ 4.13 ก. แสดงปริมาณโปรตีน Slug และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับ CHX ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงใส่สารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ บ่มไว้เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (บน) และ บ่มเซลล์ H460 กับ CHX ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (กลาง) ข.แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีน Slug สัมพันธ์กับเวลา แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร CHX อย่างเดียว

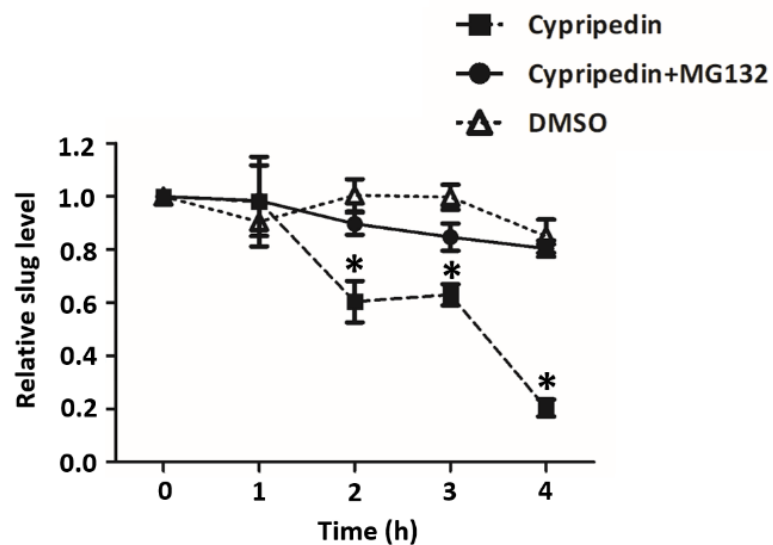
เพื่อพิสูจน์ว่าสารไซพรีพิดินเพิ่มการทำลายโปรตีน Slug ผ่าน Proteasome จึงทำการทดลองโดยการใส่สาร MG132 ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้ง Proteasome ป้องกันไม่ให้ Proteasome ทำลายโปรตีนเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารไซพรีพิดินเพียงอย่างเดียว พบว่าในกลุ่มที่ใส่สารไซพรีพิดิน ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียวโปรตีน Slug มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 2.73 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการยับยั้ง Proteasome ด้วย MG132 ก่อนแล้วจึงใส่สารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์เท่ากัน พบว่าค่าครึ่งชีวิตของ Slug มากขึ้นคือมีค่าประมาณ 12 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าโปรตีน Slug ถูกทำลายผ่าน Proteasome (รูปที่ 4.14 และ ตารางที่ 4.1)



ก



ข



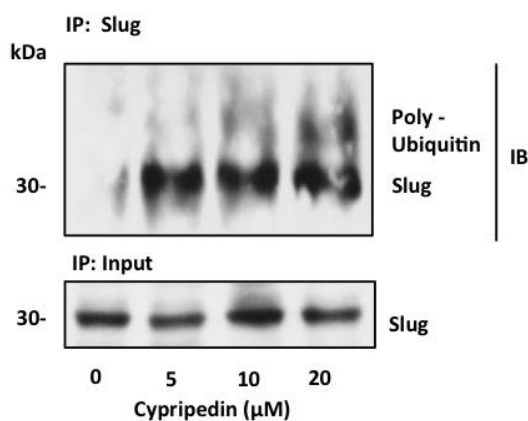
รูปที่ 4.14 ก. แสดงปริมาณโปรตีน Slug และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (บน) บ่มไว้เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ บ่มเซลล์ H460 กับสาร MG132 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงใส่สารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ บ่มไว้เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (กลาง) และ บ่มเซลล์ H460 กับ DMSO ที่ความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ใช้ในการทำละลายสารไซพรีพิดินเป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (แถบล่าง) ข. แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีน Slug สัมพันธ์กับเวลา แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร DMSO อย่างเดียว

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน Slug เมื่อทำการทดลองด้วยสาร CHX, ไซพรีดีน + CHX, ไซพรีดีน + MG132, ไซพรีดีน และ DMSO ตามลำดับ

Treatment	Half-Life (h)
CHX	1.88 ± 0.16
Cypripedin + CHX	0.72 ± 0.13
Cypripedin + MG132	12.43 ± 2.09
Cypripedin	2.73 ± 0.22
DMSO	17.07 ± 2.99

การทำลายโปรตีนมักเกิดจากกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin การทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันว่าสารไซพรีดีนสามารถเพิ่มการทำลายโปรตีน Slug ผ่านการเพิ่มการจับกันระหว่างโปรตีนเป้าหมายและ Ubiquitin ทำการบ่มสาร MG132 กับเซลล์ก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีน Slug ถูกทำลายด้วย Proteasome เพราะต้องการศึกษาโปรตีน Slug-ubiquitin complex จากนั้นบ่มสารไซพรีดีนกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์ที่ได้มาตกตะกอนโปรตีน Slug-ubiquitin complex ด้วย Anti-Slug antibodies และศึกษาระดับโปรตีนด้วยวิธี Western blot และ Anti-Ubiquitin antibodies พบว่าสารไซพรีดีนสามารถเพิ่มการจับกันระหว่างโปรตีน Slug และ Ubiquitin ได้ตามความเข้มข้นของสารไซพรีดีน (รูปที่ 4.15)

การทดลองนี้สรุปได้ว่าสารไซพรีพิดินสามารถลดปริมาณโปรตีน Slug ด้วยการทำลายโปรตีนจากกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin

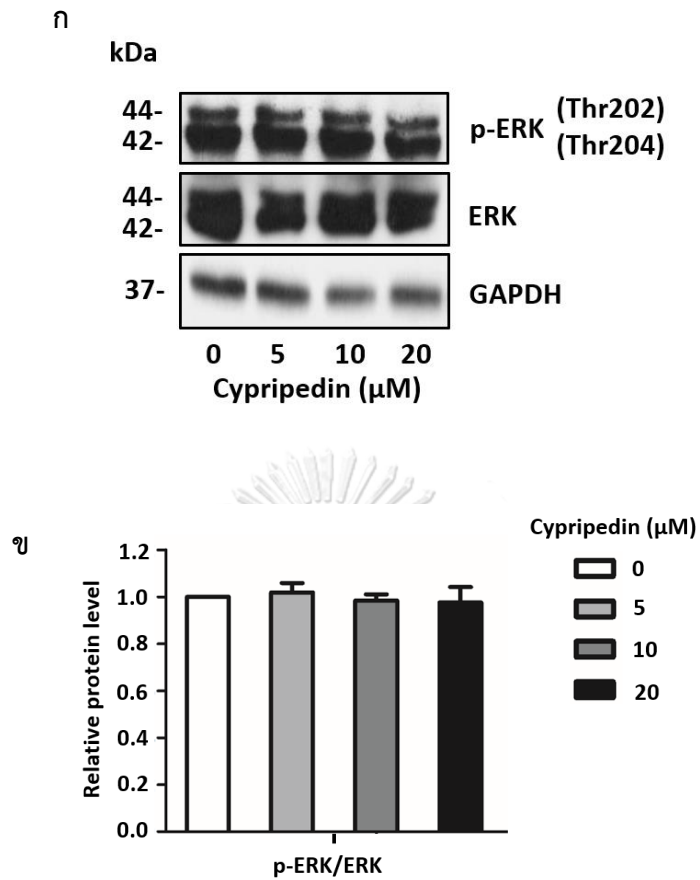


รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณโปรตีน Ubiquitin ที่ติดอยู่กับโปรตีน Slug เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับ MG132 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงใส่สารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.8 การทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อวิถี ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ถูกควบคุมได้จากหลายวิถีสัญญาณ และจากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่า สารไซพรีพิดินสามารถลดปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองหาวิถีสัญญาณที่อาจเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารไซพรีพิดิน จึงทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อวิถีหลักที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ วิถี Akt และ ERK

ทำการบ่มสารไซพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน p-ERK และ ERK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีปริมาณโปรตีนสัมพันธ์ที่แสดงในรูปอัตราส่วนโปรตีน p-ERK/ERK เท่ากับ 1, 1.02, 0.98 และ 0.98 ตามลำดับความเข้มข้น (รูปที่ 4.16)

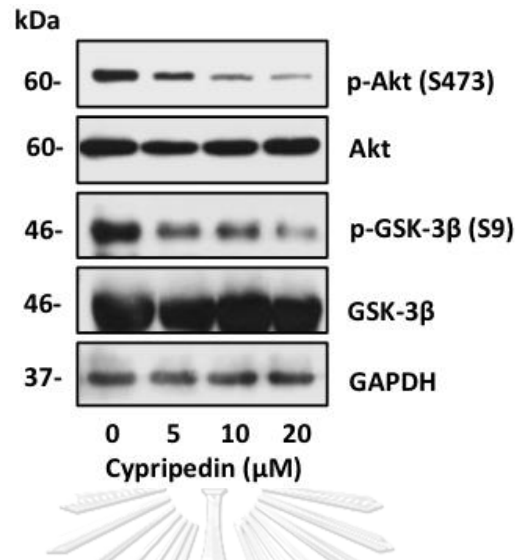


รูปที่ 4.16 ก. แสดงปริมาณโปรตีน p-ERK, ERK และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-ERK/ERK ที่ความเข้มข้นของไซพริพิดินที่แตกต่างกัน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

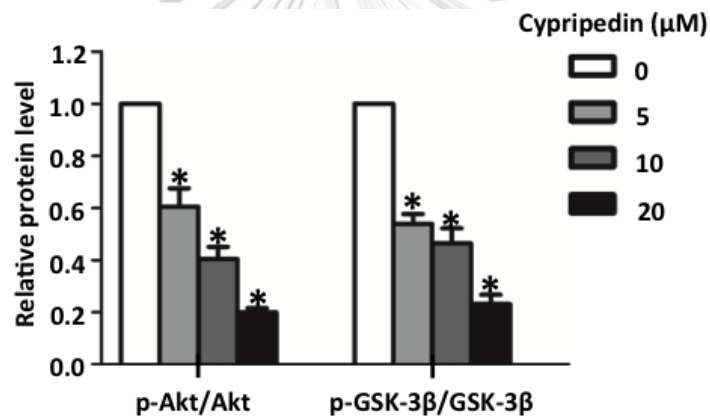
จากผลการทดลองก่อนหน้า ทำให้ทราบว่าสารไซเพรีพิดินไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านทางวิถีสัญญาณ ERK ดังนั้นจึงทำการทดสอบผลของสารไซเพรีพิดินต่อวิถีสัญญาณ Akt ต่อไป เนื่องจากวิถี Akt เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีน Slug ผ่านทาง GSK-3 β จึงมีสมมติฐานว่าสารไซเพรีพิดินสามารถยับยั้งการทำงานของ Akt จึงทำให้ Slug มีความคงตัวลดลง ทดสอบโดยทำการบ่มสารไซเพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการ Western blot พบว่าสารไซเพรีพิดินที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณโปรตีน p-Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่ปริมาณ Akt ไม่เปลี่ยนแปลง มีปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ที่แสดงในรูปอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt เท่ากับ 0.62, 0.43, และ 0.21 ตามลำดับ (รูปที่ 4.17)

เมื่อพบว่าสารไซเพรีพิดินสามารถลดปริมาณโปรตีนของวิถีสัญญาณ Akt ได้ จึงได้ทำการทดลองศึกษาโปรตีนเป้าหมายหลักของ Akt ได้แก่ GSK-3 β โดยทำการบ่มสารไซเพรีพิดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการใส่สารทดสอบแล้วมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการ Western blot พบว่าสารไซเพรีพิดินที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณโปรตีน p-GSK-3 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่ปริมาณ GSK-3 β รวม ไม่เปลี่ยนแปลง มีปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ที่แสดงในรูปอัตราส่วนโปรตีน p-GSK-3 β /GSK-3 β เท่ากับ 0.54, 0.46, และ 0.23 ตามลำดับ (รูปที่ 4.17)

ก



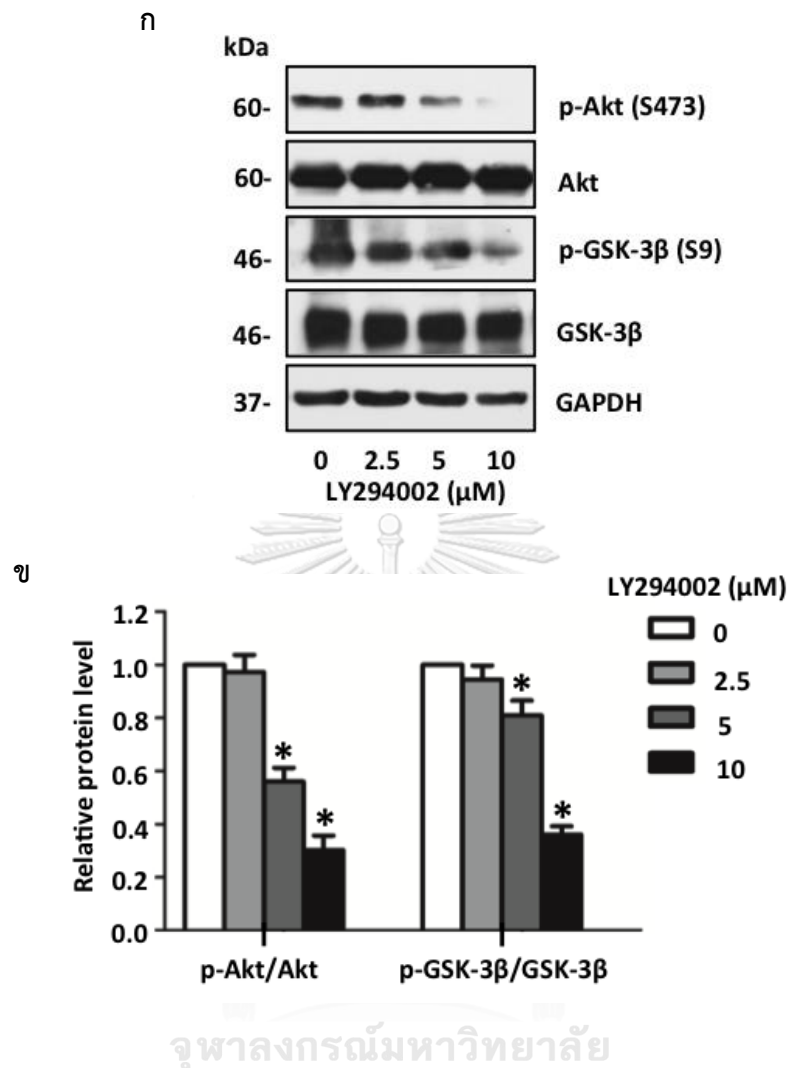
ข



รูปที่ 4.17 ก. แสดงปริมาณโปรตีน p-AKT, Akt, p-GSK-3β, GSK-3β และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับสารไซพรีพีดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3β/GSK-3β ที่ความเข้มข้นของไซพรีพีดินที่แตกต่างกัน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน การวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพรีพีดิน

เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่าสารไซเพริฟิไดนออกฤทธิ์ผ่านทางวิถีสัญญาณ Akt จึงทำการทดลองด้วยการใช้ LY294002 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt แล้วเปรียบเทียบผลการแสดงออกของระดับโปรตีนเช่นเดียวกับที่ศึกษาในการทดสอบด้วยสารไซเพริฟิไดน ทำการบ่มสาร LY294002 กับเซลล์ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการ Western blot พบว่า LY294002 ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์สามารถลดปริมาณโปรตีน p-Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่ปริมาณ Akt ไม่เปลี่ยนแปลง มีปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ที่แสดงในรูปอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt เท่ากับ 0.97, 0.56, และ 0.3 ตามลำดับ และผลการทดสอบใน GSK-3 β พบว่า LY294002 สามารถลดปริมาณโปรตีน p-GSK-3 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่ปริมาณ GSK-3 β ไม่เปลี่ยนแปลง มีปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ที่แสดงในรูปอัตราส่วนโปรตีน p-GSK-3 β /GSK-3 β เท่ากับ 0.94, 0.81 และ 0.36 ตามลำดับ (รูปที่ 4.18)



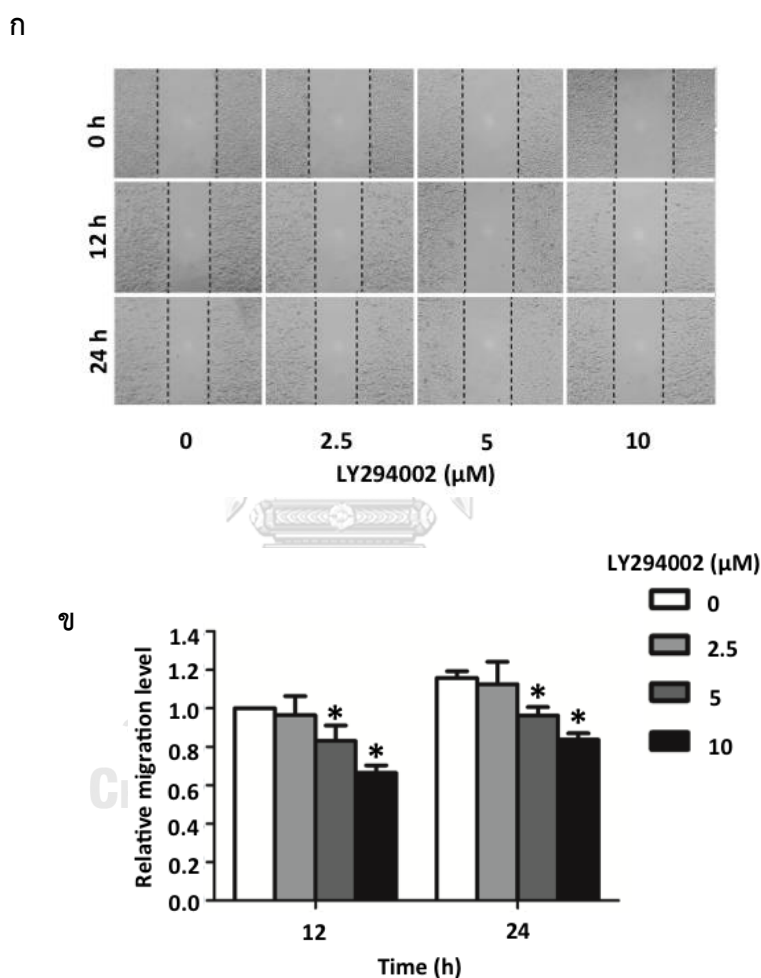


รูปที่ 4.18 ก. แสดงปริมาณโปรตีน p-AKT Akt p-GSK-3β GSK-3β และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับ LY294002 (Akt inhibitor) ที่ความเข้มข้น 0–10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3β/GSK-3β ที่ความเข้มข้นของ LY294002 ที่แตกต่างกัน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร LY294002

จากนั้นทำการทดสอบผลของสาร LY294002 ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ ทำการบ่มสาร LY294002 กับเซลล์ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับสารแล้วมาทดลองด้วยวิธี Wound healing พบว่าสาร LY294002 สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ

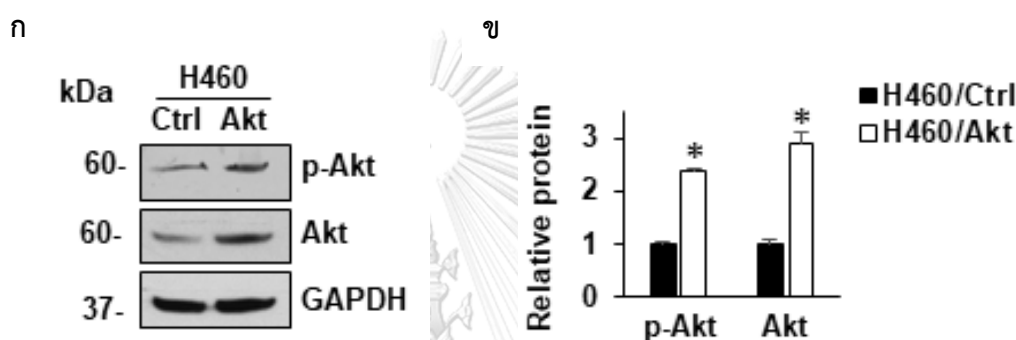
เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 0.83 และ 0.66 ตามลำดับที่ 24 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์ที่ 0.96 และ 0.84 ตามลำดับ (รูปที่ 4.19)

ซึ่งผลการทดสอบของสาร LY294002 ให้ผลของทั้งปริมาณโปรตีน p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β และ ผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์จาก Wound healing ไปในทิศทางเดียวกันกับผลของสารไซพรีพิติน จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารไซพรีพิตินออกฤทธิ์ผ่านทางวิธี Akt



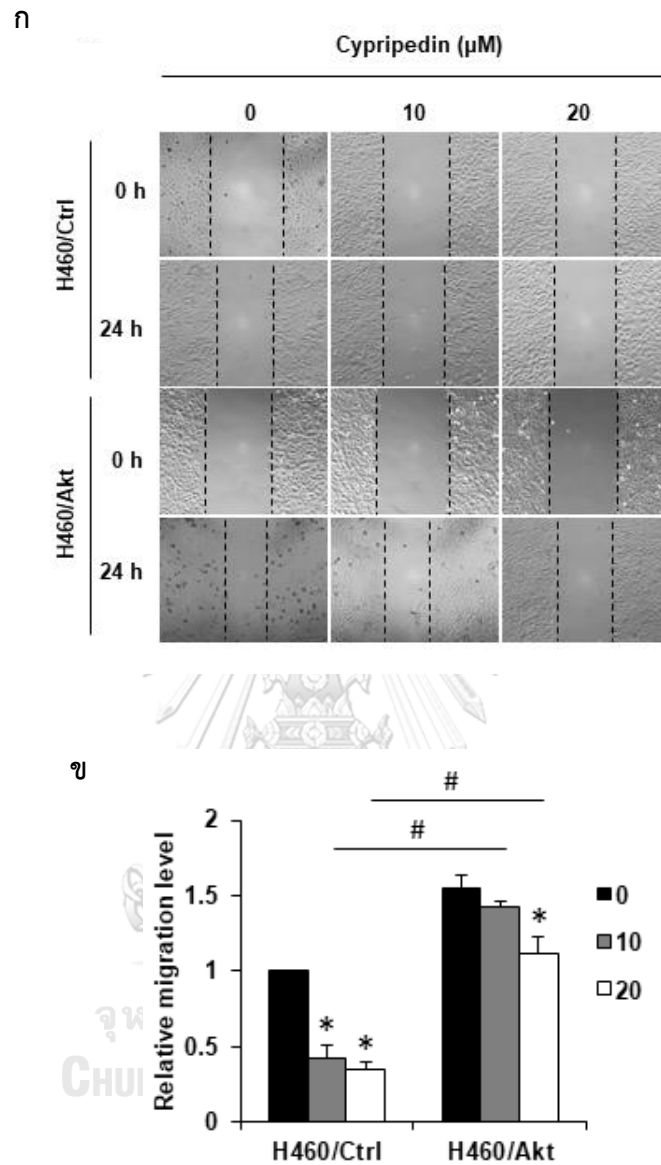
รูปที่ 4.19 ก. แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ H460 กับ LY294002 ที่ความเข้มข้น 0 – 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพัทธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ LY294002 แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร LY294002

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารไซพรีพีดินสามารถยับยั้งการบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ผ่านทางวิถี Akt จึงทำการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 โดยทำการ Transfection ด้วย Plasmid ที่มียีน Akt แล้วทำการทดสอบผลการ Transfect ด้วยการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Western blot พบว่า Akt plasmid สามารถเพิ่มปริมาณทั้ง p-Akt และ Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vector plasmid) (รูปที่ 4.20)



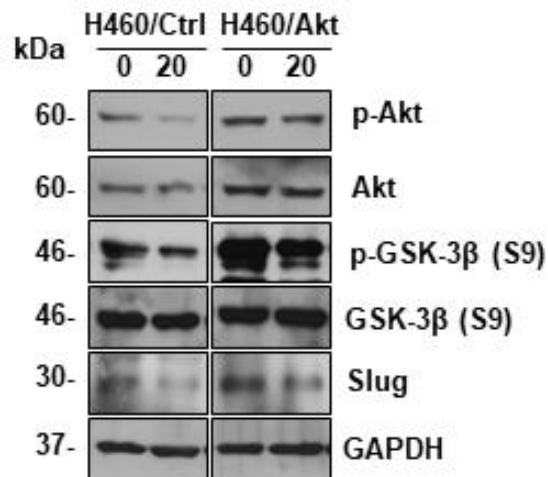
รูปที่ 4.20 ก. แสดงปริมาณโปรตีน p-Akt, Akt และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) ของเซลล์ H460 ที่ถูก Transfect ด้วย Akt plasmid ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข. แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์ของ p-Akt และ Akt ของเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการ Transfect ด้วย Akt plasmid ผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม H460/Ctrl

จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ Akt แล้ว มาทำการทดสอบผลของสารไซพรีพีดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ บ่มสารไซพรีพีดินกับเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษและไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับสารแล้วมาทดลองด้วยวิธี Wound healing พบว่า Akt สามารถยับยั้งผลของสารไซพรีพีดิน ในการลดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 4.21) นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มการแสดงออกของ Akt สามารถยับยั้งผลของสารไซพรีพีดิน ในการลดการทำงานของ p-Akt, ลดการแสดงออกของ Slug และปริมาณ p-GSK-3 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.22)

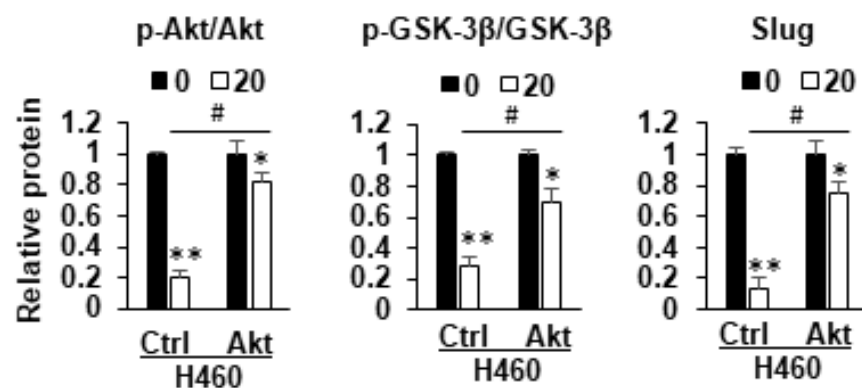


รูปที่ 4.21 ก. แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ H460 ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกของ Akt แล้ว กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข. แสดงกราฟระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการ Transfect ด้วย Akt plasmid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน และ # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม H460/Ctrl

ก



ข



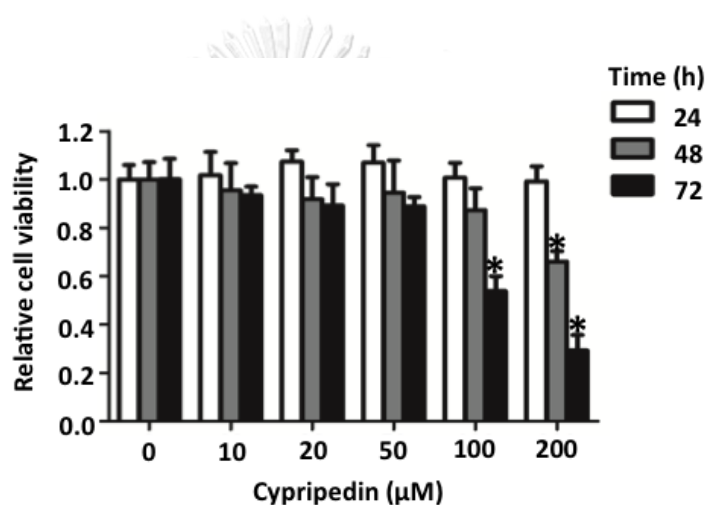
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.22 ก. แสดงปริมาณโปรตีน p-Akt, Akt, p-GSK-3 β , GSK-3 β , Slug และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H460 ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกของ Akt กับสารไซเพรีฟิดินที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข. แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt ค. p-GSK-3 β /GSK-3 β และ ง. Slug ในแต่ละกลุ่มเซลล์ (กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกเพิ่มการแสดงออกของ Akt) ที่ความเข้มข้นของสารไซเพรีฟิดินที่แตกต่างกัน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซเพรีฟิดิน # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม H460/Ctrl

4.9 การทดสอบผลของสารไซพริพิดินต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23

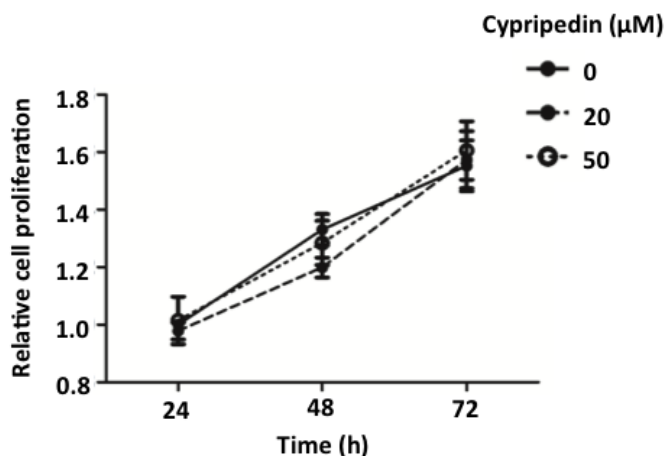
เพื่อเป็นการยืนยันความจำเพาะเจาะจงของสารไซพริพิดินต่อเซลล์มะเร็งปอด จึงทำการทดลองเช่นเดียวกันกับเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23

ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพริพิดินในเซลล์มะเร็งปอด H23 เพื่อหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งเวลาที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.23)



รูปที่ 4.23 แสดงกราฟระหว่างอัตราการมีชีวิตของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพิดินเมื่อป้อนเซลล์ H23 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0–200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

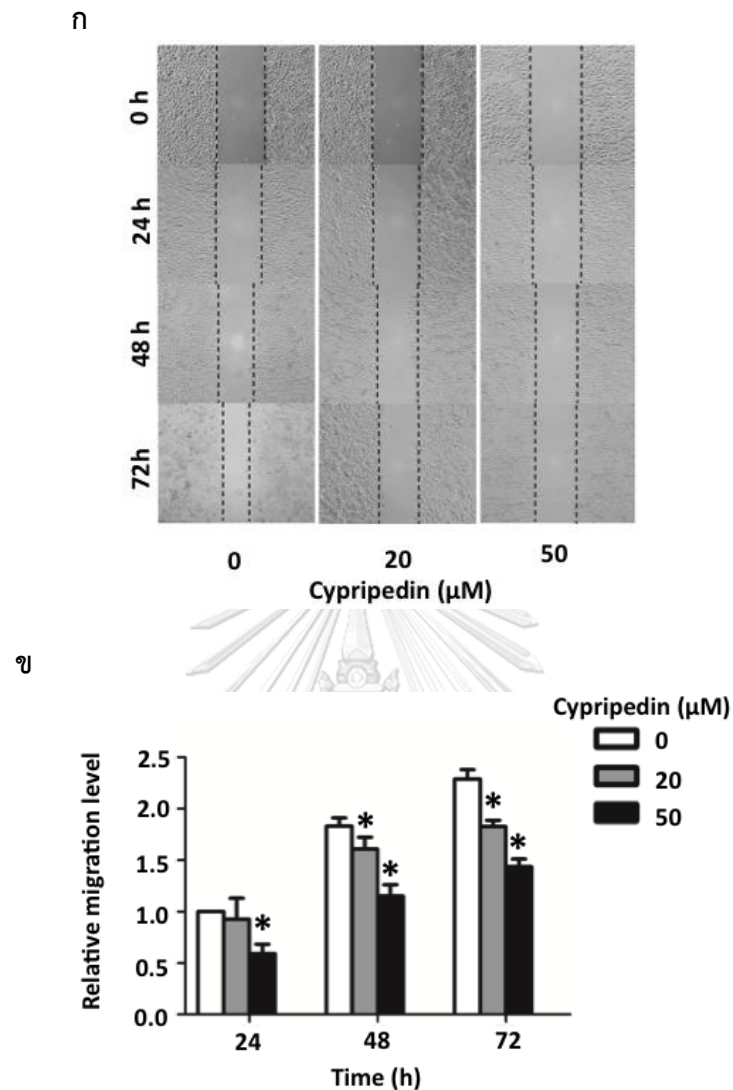
ทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารไซพรีพิดินที่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มหรือการลดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าสารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ เวลาบ่มที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่ส่งผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นหรือการลดลงของจำนวนเซลล์สัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.24 แสดงกราฟระหว่างอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพรีพิดินเมื่อบ่มเซลล์ H23 กับสารไซพรีพิดินที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพรีพิดิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

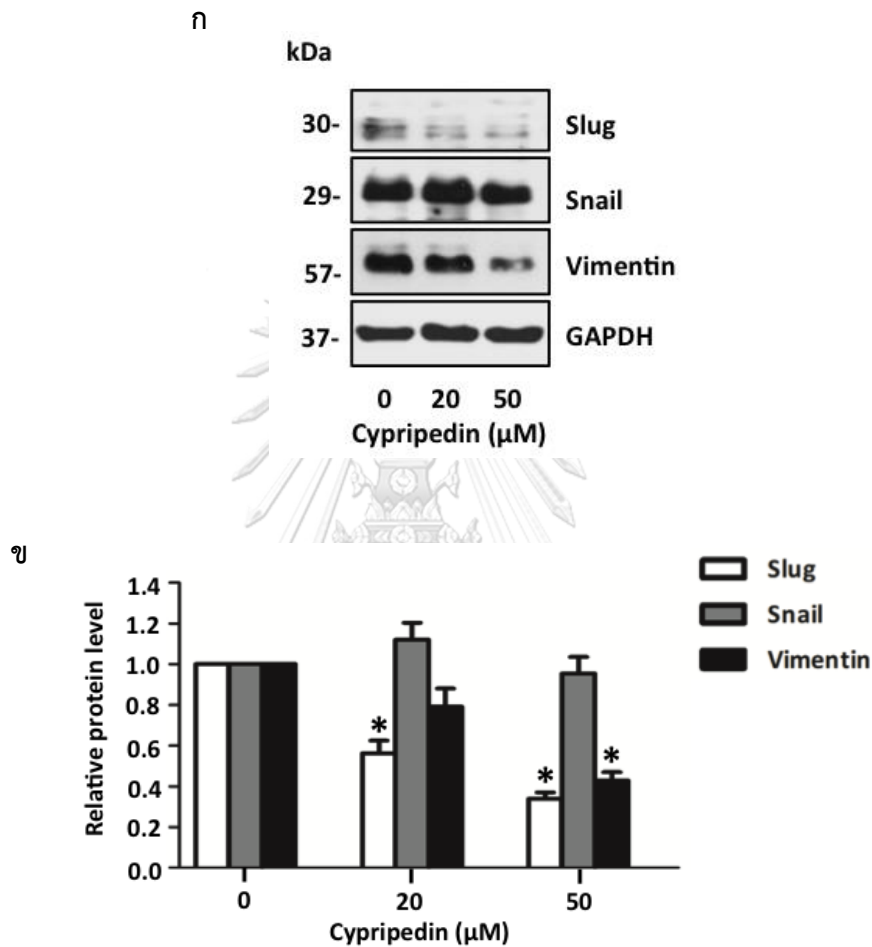
ทำการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ด้วยวิธี Wound healing พบว่าสารไซพรีพิดินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเริ่มสังเกตเห็นผลได้ตั้งแต่วันที่ 24 ชั่วโมงแรกที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เห็นผลชัดเจนขึ้นที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.25)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

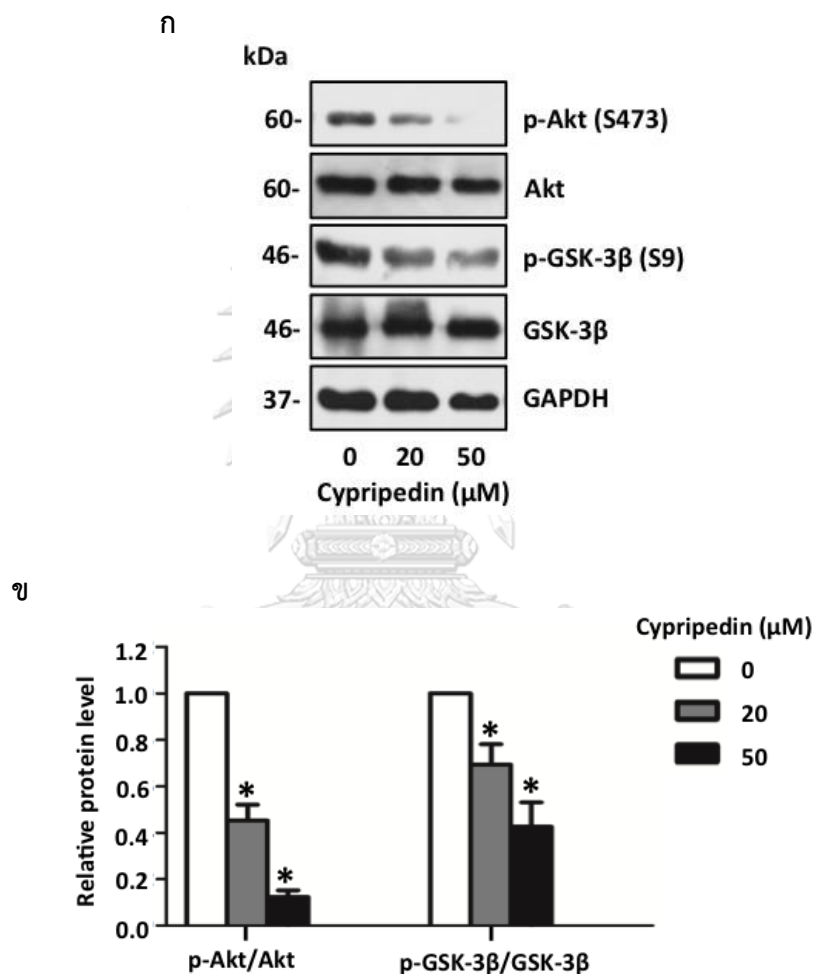
รูปที่ 4.25 ก. แสดงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อปมเซลล์ H23 กับ สารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างอัตรา การเคลื่อนที่ของเซลล์สัมพันธ์กับเวลา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารไซพริพิดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

ทำการทดสอบผลของไซพริพีดินต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อหุ้มในเซลล์มะเร็งปอด พบว่าโปรตีน Slug และ Vimentin มีปริมาณลดลงแปลผลผันกับความเข้มข้นที่มากขึ้นของสารไซพริพีดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ Snail ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.26)



รูปที่ 4.26 ก. แสดงปริมาณโปรตีน Slug Snail Vimentin และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H23 กับสารไซพริพีดินที่ความเข้มข้น 0–50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารไซพริพีดิน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพีดิน

ทำการทดสอบผลของสารไซพริพิดินต่อวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งรังปอด พบว่าสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 20 และ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณโปรตีน p-Akt และ p-GSK-3 β ในขณะที่ปริมาณ Akt และ GSK-3 β ไม่เปลี่ยนแปลง มีปริมาณโปรตีนสัมพันธ์ที่แสดงในรูปอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3 β /GSK-3 β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.27)



รูปที่ 4.27 ก. แสดงปริมาณโปรตีน p-AKT Akt p-GSK-3 β GSK-3 β และ GAPDH (โปรตีนควบคุมภายใน) เมื่อบ่มเซลล์ H23 กับสารไซพริพิดินที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข.แสดงกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนสัมพันธ์กับอัตราส่วนโปรตีน p-Akt/Akt และ p-GSK-3 β /GSK-3 β ที่ความเข้มข้นของไซพริพิดินที่แตกต่างกัน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน การวัด (ทำการทดลอง 4 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไซพริพิดิน

จากผลการทดลองในข้อ 10 ทั้งหมด พบว่าสารไซพรีพิดินให้ผลยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อหุ้มไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 ไปในทางเดียวกันกับในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 จึงสรุปได้ว่าสารไซพรีพิดินสามารถยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อหุ้มไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงในเซลล์มะเร็งปอด



บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารไซพรีพิดินในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด H460 และ H23 โดยผ่านการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง และการเจริญเติบโตของโคโลนีภายใต้สภาวะไร้การยึดเกาะกับฐานเซลล์ ไซพรีพิดินสามารถลดโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ได้แก่ Slug, Vimentin, และ N-Cadherin โดยลดการทำงานของ Akt (ลดรูปกัมมันต์ของ Akt) เมื่อ Akt ถูกยับยั้งการทำงาน ทำให้ GSK-3 β สามารถทำงานได้ ซึ่ง GSK-3 β มีหน้าที่กระตุ้นการทำลาย Slug ด้วยกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin ส่งผลให้ Slug มีปริมาณลดลง นอกจากนี้การลดการทำงานของ Akt ยังส่งผลในการลดปริมาณของ Actin stress fiber และ Focal adhesion ด้วย (รูปที่ 5.1)

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าสารประกอบประเภท Phenolic จากสารสกัดกล้วยไม้ในกลุ่ม *Dendrobium densiflorum* ตัวอย่างเช่น มอสคาทีลินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งผ่านการยับยั้ง Focal-adhesion kinase-dependent (Kowitdamrong A et al., 2013) สารใจแกนทอลมีฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านการเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งเมื่อเซลล์หลุดออกจากฐานเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว และการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Charoenrungruang et al., 2014; Unahabhokha et al., 2016b) นอกจากนี้ในสารสกัดที่ได้จากกล้วยไม้สกุลนี้ ยังมีสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น Quinone ซึ่งสารประกอบในกลุ่มนี้ก็มีรายงานว่ามียุทธิต้านมะเร็งได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่นกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Saibu et al., 2014; Wattanathamsan et al., 2018) และจากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารไซพรีพิดินซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างในกลุ่ม Phenanthrenequinone มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งปอด

เป็นที่ทราบกันดีว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ เป็นกระบวนการแรกเริ่มที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งลักษณะจากเซลล์เยื่อผิวที่มีลักษณะหลายเหลี่ยมมุมไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์มีเซนไคม์ที่มีลักษณะคล้ายกระสวย และพฤติกรรมเพื่อให้เอื้อต่อการอยู่รอด เช่นการเคลื่อนที่และการแพร่กระจาย และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งภายใต้สภาวะไร้การยึดเกาะกับฐานเซลล์ (Karlsson et al., 2017) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วนส่งเสริม

ให้มะเร็งมีความรุนแรงและอันตรายต่อผู้ป่วยมากขึ้น (Le Bras et al., 2012) การเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์เกิดจากการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของโปรตีน Cadherin ที่เชื่อมระหว่างเซลล์ (Cadherin switching) โดยจะมีการลดลงของโปรตีน E-Cadherin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เชื่อมระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว และมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน N-Cadherin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เชื่อมระหว่างเซลล์มีเซนไคม์ (Gheldof and Berx, 2013) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเพิ่มขึ้นของ N-Cadherin เกี่ยวข้องกับการเกิดการแพร่กระจายของมะเร็งและเมื่อทำให้ N-Cadherin ลดลงสามารถลดการแพร่กระจายของมะเร็งลดลงได้ (Shih and Yamada, 2012) ดังนั้น N-Cadherin จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการรักษามะเร็งปอด (Lade-Keller et al., 2013) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าสารไซพรีพีดินสามารถรบกวนกระบวนการ Cadherin switching โดยทำให้ N-Cadherin มีปริมาณลดลงได้

การเกิดกระบวนการ Cadherin switching ถูกควบคุมได้ทั้งจากระดับการสร้างโปรตีน (Transcriptional) และการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสร้างโปรตีน (Post-transcriptional modification) (Peinado et al., 2004; Kanemaru et al., 2013; Rago et al., 2014) ซึ่ง Transcription factor หลักที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน Cadherin คือ Snail และ Slug (Bolós et al., 2003) แม้ว่าการศึกษานี้สารไซพรีพีดินจะสามารถลดปริมาณโปรตีน Slug แต่ไม่มีผลต่อโปรตีน Snail ซึ่งก็เป็นไปได้ว่าการลดลงของ N-Cadherin ในการศึกษานี้เกิดจากการควบคุมของ Slug เพียงอย่างเดียวโดยไม่เกี่ยวข้องกับ Snail เพราะให้ผลสอดคล้องกับศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ N-Cadherin เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของ Slug โดยไม่เกี่ยวข้องกับ Snail (Cao et al., 2015) นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่า N-Cadherin ลดลงจากการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสร้างโปรตีน เช่น ผ่านทางการควบคุมของวิถี PI3K/mTOR (Palma-Nicolás and López-Colomé, 2013) หรือ ผ่านทาง microRNAs (Rago et al., 2014; Sheth et al., 2012; Han et al., 2012)

นอกจากนี้ไซพรีพีดินยังสามารถลดปริมาณ Vimentin ซึ่งเป็นเส้นใยโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้างในเซลล์มีเซนไคม์ และสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Liu et al., 2015) จากผลการทดลองนี้ Vimentin อาจลดลงจากการลดลงของ Slug ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ระบุว่า Slug กระตุ้นการแสดงออกของ Vimentin และส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในมะเร็งเต้านม (Vuoriluoto et al., 2011; Cheng et al., 2012; Zhang et al., 2016b) จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า Slug มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ ดังนั้น Slug จึงจัดเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการยับยั้งมะเร็งปอด

ในการศึกษานี้พบว่าสารไซเพรีพิดินลดปริมาณ Slug ได้ แม้ว่าจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงในระดับการสร้าง mRNA ของ Slug เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบการแสดงออก mRNA ของ Slug พบว่าไซเพรีพิดินไม่สามารถลดการแสดงออก mRNA แต่สารไซเพรีพิดินสามารถเพิ่มการทำลายของ Slug ได้ โดยผ่านกระบวนการ Ubiquitination ผ่านการกระตุ้นการทำงานจาก Akt

จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าวิถี Akt เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การอยู่รอด การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Grille et al., 2003; Hers et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ระบุว่า Akt สามารถยับยั้งการทำลาย Slug ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ GSK-3 β ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายหลักของ Akt เนื่องจากโดยปกติ GSK-3 β มีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ Slug เพื่อกระตุ้นให้ Slug เคลื่อนที่ออกนอกนิวเคลียสและจับกับ Ubiquitin เกิดการทำลายผ่าน Proteasome แต่เมื่อ GSK-3 β ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจาก Akt ที่ตำแหน่ง Ser9 จะทำให้ GSK-3 β เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้น Slug จึงไม่ถูกทำลาย (Voutsadakis 2012; Beurel et al., 2015) และจากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ Akt จะสามารถเพิ่มการทำลายของ Slug (Unahabhokha et al., 2016a; Kao et al., 2014) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากสารไซเพรีพิดินสามารถยับยั้งการทำงานของ Akt ส่งผลให้ GSK-3 β สามารถทำงานได้ ดังนั้น Slug จึงไม่ถูกยับยั้งการทำลาย

นอกจากนั้นวิถี Akt ยังสามารถควบคุมการแสดงออกของ Paxillin ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญของ Focal adhesion และส่งผลต่อการจัดเรียงตัวใหม่ของ Actin stress fiber ที่ช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อีกด้วย (Metalli et al., 2010; Schaller, 2001) จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Actin stress fiber ทำงานร่วมกับ Paxillin ที่ตำแหน่งเดียวกันบริเวณ Focal adhesion เพื่อส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Liu et al., 2015) และอีกการศึกษาพบว่าเมื่อวิถี Akt ถูกยับยั้งการทำงาน จะส่งผลในการลดการแสดงออกของ Paxillin และสามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ (Zhang et al., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่า สารไซเพรีพิดินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ Akt ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของ Actin stress fiber และ Paxillin ที่บริเวณ Focal adhesion

อะนอยคิสเป็นการตายของเซลล์แบบอะพอพอโทซิสอย่างหนึ่ง ถูกกระตุ้นโดยการหลุดออกจากรูขุมขนเซลล์และเซลล์ข้างเคียงเป็นเซลล์เดี่ยว ทำให้เซลล์เดี่ยวขาดการรับสัญญาณอยู่รอดจากเซลล์ข้างเคียงเซลล์จึงเกิดการตายแบบอะพอพอโทซิส เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ที่หลุดออกไปเจริญเติบโตผิดตำแหน่งยังส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้ เมื่อเซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ จะทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการต่อต้านการตายแบบอะนอยคิส (Frisch et al., 2013) โดยกระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการตายแบบอะพอพอ

โทซิส ได้แก่ Bcl-2 Bcl-xL และ Mcl-1 หรือยับยั้งโปรตีนที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ Bad และ Bim ซึ่งจะสามารถยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะนอยคิสได้ (Paoli et al., 2013; Onder et al., 2008) ส่งผลให้เซลล์มะเร็งที่เกิดการหลุดออกจากก้อนมะเร็งปฐมภูมิมีชีวิตรอดและแพร่กระจายไปยังอวัยวะเป้าหมายได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการทำงานของวิถี Akt ส่งผลในการลดการทำงานของ Bad และ Bim ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Qi et al., 2006) ร่วมกับการศึกษาที่ระบุว่า Slug ส่งผลให้เซลล์ต่อต้านการตายแบบอะนอยคิสด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของ ZEB1 ในเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมา (Wels et al., 2011) และเมื่อทดลองยับยั้งการแสดงออกของ Slug พบว่าสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ได้ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Vitali et al., 2008) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารไซเพรีพิตินสามารถเพิ่มการตายของเซลล์แบบอะนอยคิส (จากผลการทดลอง Colony formation) ได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่สารไซเพรีพิตินสามารถลดการทำงานของวิถี Akt และการลดลงของปริมาณ Slug

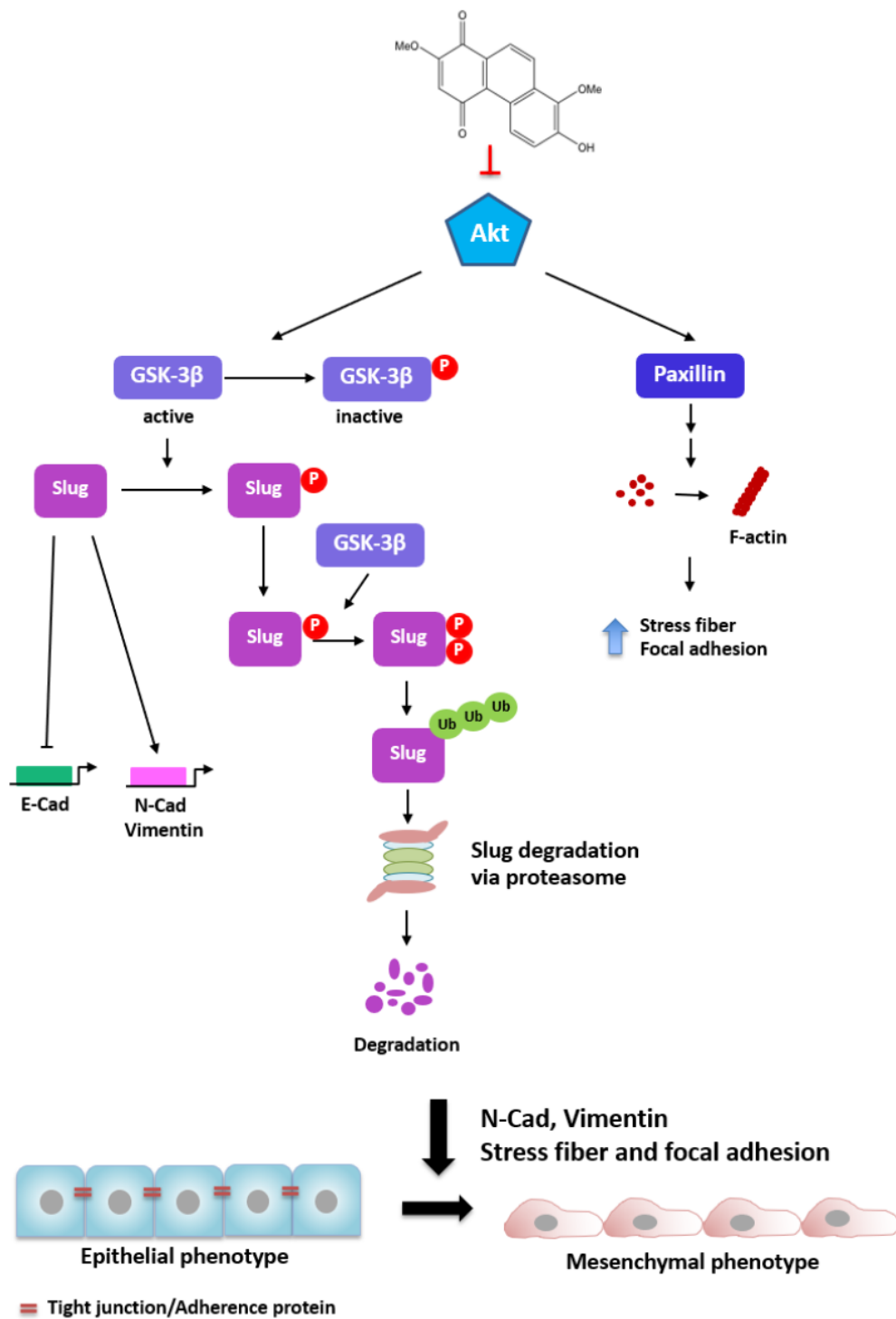
Ubiquitination เป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Proteasome โดยกระบวนการจะเกิดขึ้นจากโปรตีน Ubiquitin ไปจับกับโปรตีนเป้าหมายแล้วนำพาโปรตีนเป้าหมายเข้าสู่ Proteasome เพื่อเกิดการทำลายต่อไป (Shah et al., 2001; Mani and Gelmann, 2005; Lecker, 2006) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Slug ถูกทำลายผ่านกระบวนการ Ubiquitination (Voutsadakis, 2012) และการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพบความผิดปกติของการทำงานของ Proteasome ในเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้ Slug ถูกทำลายช้าลง ส่งผลกระตุ้นกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ (Proia et al., 2011) และในการศึกษานี้พบว่า สารไซเพรีพิตินสามารถลดปริมาณโปรตีน Slug ด้วยการเพิ่มการทำลายโปรตีนจากกระบวนการ Proteolysis ผ่าน Ubiquitin

แม้ว่าทั้ง Slug และ Snail จะเป็นโปรตีนในกลุ่มของ Snail family ทั้งคู่และเกิดการทำลายผ่านวิถี GSK-3 β ได้เหมือนกัน (Kim et al., 2012; Zhou et al., 2004) แต่ผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าสารไซเพรีพิตินสามารถลดปริมาณ Slug ได้แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของ Snail อาจเนื่องมาจาก Snail และ Slug มีโครงสร้างบางส่วนที่แตกต่างกัน ทำให้มีโปรตีนมาจับแล้วเกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งได้แตกต่างกัน ส่งผลต่อความคงตัวของ Snail ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Snail ถูกควบคุมการทำงานได้จากวิถีอื่นนอกเหนือจาก Akt/GSK-3 β เช่น หาก Snail ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser 11 ด้วย Protein kinase D1 (PKD1) Snail จะถูกทำลายผ่านทาง FOXB11 (F-box protein) (Zheng et al., 2014; Du et al., 2010) หรือการเกิดการดึงหมู่ฟอสเฟตออกจาก Snail ด้วยเอนไซม์ Small C-terminal domain phosphatases (SCPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงกับ Snail ทำให้ Snail มีความคงตัวไม่ถูกทำลาย (Wu et al., 2009a) นอกจากนี้ยังมีวิถีอื่นที่ส่งผลต่อความคงตัวของ

Snail เช่น $TNF\alpha$ สามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ Snail ผ่านทาง COP9 signalosome 2 (CSN2) (เป็นเอนไซม์ Isopeptidase ใช้ทำลายพันธะ Isopeptide) (Wu et al., 2009b) และ HSP27 (heat-shock protein) (เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียด) สามารถป้องกันไม่ให้ Snail ถูกทำลายโดยการยับยั้ง Proteasome (Wettstein et al., 2013) ในการศึกษานี้อาจเป็นไปได้ว่า Snail ไม่ได้เป็นเป้าหมายของไซพรีพิดินในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์

จากผลการศึกษาทั้งหมดทำให้ทราบว่าสารไซพรีพิดินสามารถยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อบุผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอด โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของ Akt ซึ่งส่งผลเพิ่มการทำงานของ GSK-3 β เป็นผลให้ Slug ถูกทำลายมากขึ้น การค้นพบในครั้งนี้จะช่วยให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารไซพรีพิดิน และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาสารนี้เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดต่อไปในอนาคต





รูปที่ 5.1 แสดงแผนภาพสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของสารไซฟริทีดินในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เยื่อผิวไปเป็นเซลล์มีเซนไคม์ในเซลล์มะเร็งปอด

รายการอ้างอิง

- Aghajanian C, Bell-McGuinn KM, Burris HA, Siu LL, Stayner L-A, Wheeler JJ, et al. A phase I, open-label, two-stage study to investigate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the oral Akt inhibitor GSK2141795 in patients with solid tumors. *Invest New Drugs*. 2018;1-10.
- Ahn DH, Li J, Wei L, Doyle A, Marshall JL, Schaaf LJ, et al. Results of an abbreviated phase-II study with the Akt inhibitor MK-2206 in patients with advanced biliary cancer. *Sci Rep*. 2015;5(12122):1-8.
- American Joint Committee on Cancer. Lung cancer staging [Internet]. *lungevity.org*. 2016. Available from: <https://www.lungevity.org/about-lung-cancer/lung-cancer-101/lung-cancer-staging>
- Angevin E, Cassier PA, Italiano A, Gonçalves A, Gazzah A, Terret C, et al. Safety, tolerability and antitumour activity of LY2780301 (p70S6K/Akt inhibitor) in combination with gemcitabine in molecularly selected patients with advanced or metastatic cancer: a phase IB dose escalation study. *Eur J Cancer*. 2017;83:194-202.
- Arul D, Subramanian P. Naringenin (Citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathol Oncol Res*. 2013;19(4):763-770.
- Azaro A, Rodon J, Calles A, Braña I, Hidalgo M, Lopez-Casas PP, et al. A first-in-human phase I trial of LY2780301, a dual p70 S6 kinase and Akt inhibitor, in patients with advanced or metastatic cancer. *Invest New Drugs*. 2015;33(3):710-719.
- Bae G-Y, Choi S-J, Lee J-S, Jo J, Lee J, Kim J, et al. Loss of E-cadherin activates EGFR-MEK/ERK signaling, which promotes invasion via the ZEB1/MMP2 axis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2013;4(12):2512-2522.

- Banerji U, Dean EJ, Alejandro Perez-Fidalgo J, Batist G, Bedard PL, You B, et al. A phase I open-label study to identify a dosing regimen of the pan-Akt inhibitor a5363 for evaluation in solid tumors and in PIK3CA-mutated breast and gynecologic cancers. *Clin Cancer Res.* 2018;24(9):2050-2059.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005;132(14):3151-3161.
- Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):84-89.
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015;148:114-131.
- Blagden SP, Gabra H, Hamilton AL, Wong SS, Michael A, Mileskin LR, et al. Phase I/II dose-escalation and expansion study of afuresertib+carboplatin and paclitaxel in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(15):2551-2551.
- Bolós V, Peinado H, Peez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003;116:499-511.
- Bowden ET, Onikoyi E, Slack R, Myoui A, Yoneda T, Yamada KM, et al. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2006;321(8):1240-1253
- Brogard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* 2001;61:3986-3997
- Brown JS, Banerji U. Maximising the potential of Akt inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol Therapeut.* 2017;172:101-115.
- Buchegger K, Silva R, López J, Ili C, Araya JC, Leal P, et al. The ERK/MAPK pathway is overexpressed and activated in gallbladder cancer. *Pathol Res Pract.* 2017;213(5):476-482.

- Buonato JM, Lazzara MJ. ERK1/2 blockade prevents epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and promotes their sensitivity to EGFR inhibition. *Cancer Res.* 2014;74(1):309-319.
- Burridge K, Guilluy C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res.* 2016;343(1):14-20.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):76-83.
- Cao Y-W, Wan G-X, Sun J-P, Cui X-B, Hu J-M, Liang W-H, et al. Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci.* 2015;31:70-76.
- Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 2004;14(5):241-249.
- Charoenrungruang S, Chanvorachote P, Sritularak B, Pongrakhananon V. Gigantol, a bibenzyl from *Dendrobium draconis*, inhibits the migratory behavior of non-small cell lung cancer cells. *J Nat Prod.* 2014;77(6):1359-1366.
- Cheng C-W, Wang H-W, Chang C-W, Chu H-W, Chen C-Y, Yu J-C, Chao J-I, et al. MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134:1081-1093.
- Comijn J, Bex G, Vermassen P, Verschuere K, Grunsvan LV, Bruyneel E, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell.* 2001;7(6):1267-1278.
- Craene BD, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:97-110.
- Crul M, Rosing H, de Klerk GJ, Dubbelman R, Traiser M, Reichert S, et al. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38(12):1615-1621.

- Dasari A, Overman MJ, Fogelman DR, Kee BK, Menter D, Morris VK, et al. A phase II and co-clinical study of an Akt inhibitor in patients (pts) with biomarker-enriched, previously treated metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol*. 2016;34(15):3563-3563.
- Derycke LDM, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*. 2004;48:463-476.
- Du C, Zhang C, Hassan S, Biswas MHU, Balaji KC. Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of Snail. *Cancer Res*. 2010;70(20):7810-7819.
- Elsum IA, Martin C, Humbert PO. Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. *J Cell Sci*. 2013;126(17):3990-3999.
- Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J*. 2008;27(14):1932-1943.
- Fan C, Wang W, Wang Y, Qin G, Zhao W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. *Phytochemistry*. 2001;57(8):1255-1258.
- Fan F, Samuel S, Evans KW, Lu J, Xia L, Zhou Y, et al. Overexpression of Snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med*. 2012;1(1):5-16.
- Fedor-Chaiken M, Meigs TE, Kaplan DD, Brackenbury R. Two regions of cadherin cytoplasmic domains are involved in suppressing motility of a mammary carcinoma cell line. *J Biol Chem*. 2003;278(52):52371-52378.
- Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, Soo JK, et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor Slug (Snail2) is a downstream target of Sparc and Akt in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One*. 2012;7(7):e40378.

- Figg WD, Monga M, Headlee D, Shah A, Chau CH, Peer C, et al. A phase I and pharmacokinetic study of oral perifosine with different loading schedules in patients with refractory neoplasms. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(5):955-967.
- Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(5):1016-1036.
- Frisch SM, Schaller M, Cieply B. Mechanism that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci.* 2013;126(1):21-29.
- Fu S, Hennessy BT, Ng CS, Ju Z, Coombes KR, Wolf JK, et al. Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2012;126(1):47-53.
- Garrett CR, Coppola D, Wenham RM, Cubitt CL, Neuger AM, Frost TJ, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of triciribine phosphate monohydrate, a small-molecule inhibitor of AKT phosphorylation, in adult subjects with solid tumors containing activated Akt. *Invest New Drugs.* 2011;29(6):1381-1389.
- Gheldof A, Bex G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;116:317-336.
- Gonzalez-Angulo AM, Krop I, Akcakanat A, Chen H, Liu S, Li Y, et al. SU2C phase IB study of paclitaxel and MK-2206 in advanced solid tumors and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(3):1-9.
- Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, Roy FV, Lee-Kwon W, Donowitz M et al., The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* 2003;63:2172-2178.
- Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, Kobierzycki C, Olbromski M, Gomulkiewicz A, et al. Expression of EMT markers Slug and Twist in breast cancer. *Anticancer Res.* 2015;35(7):3961-3968.
- Hamilton AM. *The modern treatment of headaches.* Detroit, Mich: G.S. Gavis; 1888.

- Han M, Wang Y, Liu M, Bi X, Bao J, Zeng N, et al. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1 α expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells. *Cancer Sci.* 2012;103(6):1058-1064.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 2000;148(4):779-790.
- Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, et al. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med.* 2015;4(6):1-13.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drugdisc.* 2005;4:988-1004
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal.* 2011;23(10):1515-1527.
- Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* 2006;173(3):383-394.
- Irie HY, Pearline R V, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005;171(6):1023-1034.
- Isakoff SJ, Infante JR, Juric D, Chan WY, Jia S, Musib L, et al. Phase IB dose-escalation study of the Akt inhibitor ipatasertib (Ipat) with paclitaxel (P) in patients (pts) with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 2014; 25(4):iv146-iv164
- Jackson A. The dominant malignancy: lung cancer: of schemes and memes blog [Internet]. Of schemes and memes a community blog from nature.com. 2014. Available from: <http://blogs.nature.com/ofschemasandmemes/2014/09/11/the-dominant-malignancy-lung-cancer>
- Jakubowiak AJ, Richardson PG, Zimmerman T, Alsina M, Kaufman JL, Kandarpa M, et al. Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a phase I multiple myeloma research consortium study. *Br J Haematol.* 2012;158(4):472-480.

- Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(5):273-291.
- Joannes A, Grelet S, Duca L, Gilles C, Kileztky C, Dalstein V, et al. Fhit regulates EMT targets through an EGFR/Src/ERK/Slug signaling axis in human bronchial cells. *Mol Cancer Res*. 2014;12(5):775-783.
- Kanemaru K, Kubota J, Sekiya H, Hirose K, Okubo Y, Iino M. Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(28):11612-11617.
- Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, et al. Inhibitory effects of Naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(3):527-530
- Kao S-H, Wang W-L, Chen C-Y, Chang Y-L, Wu Y-Y, Wang Y-T, et al. GSK-3 β controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene*. 2014;33(24):3172-3182.
- Karlsson MC, Gonzalez SF, Welin J, Fuxe J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Mol Oncol*. 2017;11(7):781-791.
- Kim JY, Kim YM, Yang CH, Cho SK, Lee JW, Cho M. Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 β -mediated phosphorylation. *FEBS J*. 2012;279(16):2929-2939.
- Kovács A, Vasas A, Hohmann J. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*. 2008;69:1084-1110.
- Kowitdamrong A, Chanvorachote P, Sritularak B, Pongrakhananon V. Moscatilin inhibits lung cancer cell motility and invasion via suppression of endogenous reactive oxygen species. *Biomed Res Int*. 2013;2013:765894.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*. 2003;63(5):1138-1143.

- Lade-Keller J, Riber-Hansen R, Guldberg P, Schmidt H, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *Br J Dermatol*. 2013;169(3):618-628.
- Lam Y, Ng TB, Yao RM, Shi J, Xu K, Sze SCW, et al. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *dendrobium* plants. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:841752.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196.
- Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/Akt pathways. *Oncogene*. 2005;24(50):7443-7454.
- Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr*. 2012;6(4):365-373.
- Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):1807-1819.
- Leighl NB, Dent S, Clemons M, Vandenberg TA, Tozer R, Warr DG, et al. A phase II study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;108(1):87-92.
- Li J, Deng Z, Wang Z, Wang D, Zhang L, Su Q, et al. Zipper-interacting protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis through Akt and NF- κ B signaling and is associated with metastasis and poor prognosis in gastric cancer patients. *Oncotarget*. 2015;6(10):8323-8338.
- Li X-L, Liu L, Li D-D, He Y-P, Guo L-H, Sun L-P, et al. Integrin β 4 promotes cell invasion and epithelial-mesenchymal transition through the modulation of Slug expression in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2017;7:40464.

- Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015;6(18):15966-15983.
- Liu Y-N, Lee W-W, Wang C-Y, Chao T-H, Chen Y, Chen JH. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene*. 2005;24(56):8277-8290.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
- Lombaerts M, Wezel TV, Philippo K, Dierssen JWF, Zimmerman RME, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2006;94(5):661-671.
- London hospital. The pharmacopoeia of the London hospital. London: J. and A. Churchill; 1882.
- Long B, Kern J, Carr LL. Detecting lung cancer early [Internet]. nationaljewish.org. 2012. Available from: <https://www.nationaljewish.org/conditions/lung-cancer/overview/detecting-lung-cancer-early>
- López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R, López E. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol*. 2017;10(50):1-15.
- Mabuchi S, Sugiyama T, Kimura T. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *J Gynecol Oncol*. 2016;27(3):e31
- Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(21):4776-4789.
- Martindale W, Westcott WW. Extra pharmacopoeia: with the additions introduced into the British pharmacopoeia. London: H.K. Lewis; 1888.
- Matsunaga T, Kamiya T, Sumi D, Kumagai Y, Kalyanaraman B, Hara A. L-Xylulose reductase is involved in 9,10-phenanthrenequinone-induced apoptosis in human T lymphoma cells. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(6):1191-1202.

- Metalli D, Lovat F, Tripodi F, Xu S-Q, Alberghina L, Vanoni M, et al. The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and MAPK-dependent activation of paxillin. *Am J Pathol.* 2010;176(6):2997-3006.
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(2):117-134.
- Michalarea V, Roda D, Drew Y, Carreira S, O’Carrigan B, Shaw H, et al. Phase I trial combining the PARP inhibitor olaparib (Ola) and Akt inhibitor AZD5363 (AZD) in germline (g) BRCA and non-BRCA mutant (m) advanced cancer patients (pts) incorporating noninvasive monitoring of cancer mutations. *Clin Cancer Res.* 2016;76(14): Abstract nr CT010.
- Mikami S, Katsube K-I, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Investig.* 2011;91(10):1443-1458.
- Molife L, Yan L, Vitfell-Rasmussen J, Zernhelt AM, Sullivan DM, Cassier PA, et al. Phase I trial of the oral Akt inhibitor MK-2206 plus carboplatin/paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors. *J Hematol Oncol.* 2014;7(1):1-12.
- Naci D, Vuori K, Aoudjit F. Alpha2beta1 integrin in cancer development and chemoresistance. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:145-153.
- Nakamura K, Yano H, Uchida H, Hashimoto S, Schaefer E, Sabe H. Tyrosine phosphorylation of paxillin α is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27155-27164.
- Navandar M, Garding A, Sahu SK, Pataskar A, Schick S, Tiwari VK, et al. ERK signalling modulates epigenome to drive epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget.* 2017;8(17):29269-29281.
- Nurwidya F, Takahashi F, Murakami A, Takahashi K. Epithelial mesenchymal transition in drug resistance and metastasis of lung cancer. *Cancer Res Treat.* 2012;44(3):151-156.

- Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008; 68(10):3645-3654
- Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, Waseem A, Gutkind JS, Zehner ZE, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2894-2903.
- Palma-Nicolás JP, López-Colomé AM. Thrombin induces Slug-mediated E-cadherin transcriptional repression and the parallel up-regulation of N-cadherin by a transcription-independent mechanism in RPE cells. *J Cell Physiol.* 2013;228(3):581-589.
- Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833:3481-3498.
- Park BK, Zeng X, Glazer RI, Klein-Szanto AJ, Roy F van, Lee-Kwon W, et al. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2001;61(20):7647-7653.
- Parke D. *Organic materia medica.* Detroit, Mich: s.n.; 1890.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(6):415-428.
- Proia TA, Keller PJ, Gupta PB, Klebba I, Jones AD, Sedic M, et al. Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell.* 2011;8(2):149-163.
- Putzke AP, Ventura AP, Bailey AM, Akture C, Opoku-Ansah J, Celiktaş M, et al. Metastatic progression of prostate cancer and E-cadherin regulation by Zeb1 and Src family kinases. *Am J Pathol.* 2011;179(1):400-410.
- Qi XJ, Wildey GM, Howe PH. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem.* 2006;281(2):813-823.
- Qu BL, Yu W, Huang YR, Cai BN, Du LH, Liu F. 6-OH-BDE-47 promotes human lung cancer cells epithelial mesenchymal transition via the Akt/Snail signal pathway. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39(1):271-279.

- Rago L, Beattie R, Taylor V, Winter J. miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J*. 2014;33(8):906-920.
- Redue WF. A manual of treatment of the diseases of children. n.p.: The clinic publishing; 1907.
- Saibu M, Sagar S, Green I, Ameer F, Meyer M. Evaluating the cytotoxic effects of novel quinone compounds. *Anticancer Res*. 2014;34(8):4077-4086.
- Sánchez-Tilló E, Liu Y, Barrios OD, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(20):3429-3456.
- Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(18):3033-3046.
- Saura C, Roda D, Roselló S, Oliveira M, Macarulla T, Pérez-Fidalgo JA, et al. A first-in-human phase I study of the ATP-competitive Akt inhibitor ipatasertib demonstrates robust and safe targeting of Akt in patients with solid tumors. *Cancer Discov*. 2017;7(1):102-113.
- Schlessinger K, Hall A. GSK-3 β sets Snail's pace. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):913-915.
- Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol* 2010;189:541-556.
- Schaller, M.D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. 2001;20(44):6459-6472.
- Scrima M, De Marco C, Fabiani F, Franco R, Pirozzi G, Rocco G, et al. Signaling networks associated with Akt activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS One*. 2012;7(2):e30427.
- Shah SA, Potter MW, Callery MP. Ubiquitin proteasome pathway: implications and advances in cancer therapy. *Surg Oncol*. 2001;10:43-52.
- Shang Y, Cai X, Fan D. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;13(9):915-929

- Sheth S, Jajoo S, Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Rybak LP, et al. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway. *PLoS One*. 2012;7(12):e51655.
- Shih J-Y, Yang P-C. The EMT regulator Slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2011;32(9):1299-1304.
- Shih W, Yamada S. N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix. *J Cell Sci*. 2012;125(15):3661-3670.
- Shoushtari AN, Kudchadkar RR, Panageas K, Murthy RK, Jung M, Shah R et al. A randomized phase II study of trametinib with or without GSK2141795 in patients with advanced uveal melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(15):9511-9511.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
- Singh A, Duggal S. Medicinal orchids - an overview. *Ethnobot Leafl*. 2009;13(3):399-412.
- Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2018;182:80-94.
- Smith JJ, Deane NG, Wu F, Merchant NB, Zhang B, Jiang A, et al. Experimentally derived metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in patients with colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(3):958-968.
- Spencer A, Yoon SS, Harrison SJ, Morris SR, Smith DA, Brigandi RA, et al. The novel Akt inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. *Blood*. 2014;124(14):2190-2195.
- Sundar R, Chénard-Poirier M, Collins DC, Yap TA. Imprecision in the era of precision medicine in non-small cell lung cancer. *Front Med*. 2017;4(39):1-13.
- Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1438-1449.
- Tamura K, Hashimoto J, Tanabe Y, Kodaira M, Yonemori K, Seto T, et al. Safety and tolerability of AZD5363 in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77:787-795.

- Tanagornmeatar K, Chaotham C, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Chanvorachote P. Cytotoxic and anti-metastatic activities of phenolic compounds from *Dendrobium ellipsophyllum*. *Anticancer Res.* 2014;34(11):6573-6579.
- Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(2):91-100.
- Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(3):173-183.
- Tsukada Y, Aoki K, Nakamura T, Sakumura Y, Matsuda M, Ishii S. Quantification of local morphodynamics and local GTPase activity by edge evolution tracking. *PLoS Comput Biol.* 2008;4(11):e1000223.
- Unahabhokha T, Chanvorachote P, Sritularak B, Kitsongsermthon J, Pongrakhananon V. Gigantol inhibits epithelial to mesenchymal process in human lung cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016a;2016:4561674.
- Unahabhokha T, Chanvorachote P, Pongrakhananon V. The attenuation of epithelial to mesenchymal transition and induction of anoikis by gigantol in human lung cancer H460 cells. *Tumor Biol.* 2016b;37(7):8633-8641.
- Unger C, Berdel W, Hanauske AR, Sindermann H, Rgen Engel J, Mross K. First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumours. 2010;46(5):920-925
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-292.
- Vallenius T. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol.* 2013;3(6):130001.
- Vinci M, Box C, Zimmermann M, Eccles SA. Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. Totowa, NJ: In Humana Press; 2013.
- Vindis C, Teli T, Cerretti DP, Turner CE, Huynh-Do U. EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118*. *J Biol Chem.* 2004;279:27965-27970.
- Vitali R, Mancini C, Cesi V, Tanno B, Mancuso M, Bossi G, et al. Slug (SNAI2) down-regulation by interference facilitates apoptosis and inhibits invasive growth in neuroblastoma preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2008;14(14):4622-4630.

- Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796(2):75-90.
- Voutsadakis IA. Ubiquitination and the ubiquitin–proteasome system as regulators of transcription and transcription factors in epithelial mesenchymal transition of cancer. *Tumor Biol*. 2012;33(4):897-910.
- Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi J-P, Nevo J, Gjerdrum C, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2010;30:1436-1448.
- Wattanathamsan O, Treesuwan S, Sritularak B, Pongrakhananon V. Cypripedin, a phenanthrenequinone from *Dendrobium densiflorum*, sensitizes non-small cell lung cancer H460 cells to cisplatin-mediated apoptosis. *J Nat Med*. 2018;72(2):503-513.
- Waugh WF, Abbott WC, Epstein EM. A text-book of alkaloidal therapeutics. Chicago,IL: The Clinici publishing; 1904.
- Weaver AM. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2006;(23):97-105.
- Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaidler H. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011;131(10):1877-1885.
- Wettstein G, Bellaye P-S, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, et al. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J*. 2013;27(4):1549-1560.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci*. 2008;121(6):727-735.
- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(7):512-522.

- Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of Snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009b;15:416-428.
- Wu Y, Liu H, Weng H, Zhang X, Li P, Fan C-L, et al. Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. *Int J Oncol*. 2015;46:1275-1285
- Wu Y, Mark Evers B, Zhou BP. Small C-terminal domain phosphatase enhances Snail activity through dephosphorylation. *J Biol Chem*. 2009a;284(1):640-648.
- Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE. TGF β 1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(3):427-439
- Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the ERK pathway is required for TGF- β 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*. 2004;6(5):603-610
- Xu J, Han Q-B, Li S-L, Chen X-J, Wang X-N, Zhao Z-Z, et al. Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic herb in traditional Chinese medicine. *Phytochem Rev*. 2013;12(2):341-367.
- Yan X, Yan L, Liu S, Shan Z, Tian Y, Jin Z. N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2999-3006.
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(4):393-412.
- Ye X, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz Y, Reinhardt F, Eaton EN, et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*. 2015;525(7568):256-272.
- Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1):15-33.

- Yu Y, Savage RE, Eathiraj S, Meade J, Wick MJ, Hall T, et al. Targeting Akt1-E17K and the PI3K/Akt pathway with an allosteric Akt inhibitor, ARQ 092. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140479.
- Zhang F, Yang H, Pan Z, Wang Z, Wolosin JM, Gjorstrup P, et al. Dependence of resolvin-induced increases in corneal epithelial cell migration on EGF receptor transactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(11):5601-5609.
- Zhang H, Zhong X, Zhang X, Shang D, Zhou Y, Zhang C. Enhanced anticancer effect of ABT-737 in combination with naringenin on gastric cancer cells. *Exp Ther Med*. 2016a;11:669-673.
- Zhang J, Liu D, Feng Z, Mao J, Zhang C, Lu Y, et al. MicroRNA-138 modulates metastasis and EMT in breast cancer cells by targeting vimentin. *Biomed Pharmacother*. 2016b;77:135-141.
- Zhang LL, Mu GG, Ding QS, Li YX, Shi YB, Dai JF, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) represses colon cancer progression through inhibiting paxillin transcription via PI3K/AKT/NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2015;290(24):15018-15029.
- Zhang X, Liu G, Kang Y, Dong Z, Qian Q, Ma X. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines. *PLoS One*. 2013;8(3):e57692.
- Zhao Q-Y, Ju F, Wang Z-H, Ma X-Z, Zhao H. ING5 inhibits epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by suppressing PI3K/Akt pathway. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):15498-15505.
- Zheng H, Shen M, Zha Y-L, Li W, Wei Y, Blanco MA, et al. PKD1 phosphorylation-dependent degradation of Snail by SCF-FBXO11 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Cell*. 2014;26:358-373.
- Zheng M, Jiang Y-P, Chen W, Li K-D, Liu X, Gao S-Y, et al. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(9):6794-6810.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):931-940.





การเจือจาง Antibody ในแต่ละการทดลอง

วิธี Western blot

Primary antibodies

- Rabbit anti-Snail (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-Slug (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-Vimentin (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-N-cadherin (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-Phosphorylated Akt (Ser473) (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-Akt (1:2000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-Phosphorylated GSK-3 β (Ser9) (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-GSK-3 β (1:2000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-Phosphorylated ERK 1/2 (Thr202 and Thr204) (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Rabbit anti-ERK (1:2000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Mouse anti-GAPDH (1:1000 ละลายใน Milk ร้อยละ 0.5)

Secondary antibodies

- Rabbit anti-IgG HRP-linked (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Mouse anti-IgG HRP-linked (1:1000 ละลายใน Milk ร้อยละ 0.5)

วิธี Immunofluorescence

- Mouse anti-Paxillin (1:500 ละลายใน BSA ร้อยละ 1 และ Triton-x ร้อยละ 0.1)
- Mouse anti-IgG Alexa Fluor 488 (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 1 และ Triton-x ร้อยละ 0.1)
- Rabbit anti-Phalloidin 568 (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 1 และ Triton-x ร้อยละ 0.1)

วิธี Immunoprecipitation

ป่ม Lysate กับ antibodies

- Rabbit anti-Slug (Cell signaling) cat.no 9585 C19G7 lot.6
มี Slug 349 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ในการทดลองนี้ใช้ 1 ไมโครลิตร antibodies ต่อ Lysate ประมาณ 280 ไมโครลิตร

Western blot

- Primary antibodies: Rabbit anti-Slug (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Secondary antibodies: Rabbit anti-IgG HRP-linked (1:1000 ละลายใน BSA ร้อยละ 5)
- Primary antibodies: Rabbit anti-Ubiquitin (1:1000 ละลายใน Milk ร้อยละ 0.5)
- Secondary antibodies: Rabbit anti-IgG HRP-linked (1:1000 ละลายใน Milk ร้อยละ 0.5)

ส่วนประกอบใน TMEN lysis buffer (Western blot)

- TMEN buffer
 - Tris-HCl pH 7.5 20 มิลลิโมลาร์
 - $MgCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์
 - NaCl 150 มิลลิโมลาร์
 - EGTA 100 มิลลิโมลาร์
- Sodium fluoride (NaF) 5 มิลลิโมลาร์
- Sodium metavanadate ($NaVO_3$) 1 มิลลิโมลาร์
- Nonidet-40 ร้อยละ 1
- Phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 มิลลิโมลาร์ และ
- Protease inhibitor cocktail (Roche)

ส่วนประกอบ SDS-PAGE

Separating gel

- น้ำกลั่น (dH₂O)
- 37.5 Acrylamide/bis-acrylamide ร้อยละ 40 (40% 37.5 Acry/Bis)
- 4X Separating buffer
- Ammonium persulfate ร้อยละ 10 (10% APS)
- TMED

Stacking gel

- น้ำกลั่น
- 37.5 Acrylamide/bis-acrylamide ร้อยละ 40
- 4X Stacking buffer
- Ammonium persulfate ร้อยละ 10
- TMED

4X Separating buffer

- Tris-HCl pH 8.8 1.5 มิลลิโมลาร์
- SDS ร้อยละ 0.4

4X Stacking buffer

- Tris-HCl pH 6.8 1.5 มิลลิโมลาร์
- SDS ร้อยละ 0.4

โดยเลือกใช้ % gel ตามน้ำหนักโปรตีน (kDa) ดังแสดงในตาราง

Protein kDa	50-212	30-200	25-100	10-70	18-45
Separating gel %	5%	7.5%	10%	12%	15%
dH ₂ O	4.625 ml	4.225 ml	3.75 ml	3.375 ml	2.825 ml
40% 37.5 Acry/Bis	1 ml	1.4 ml	1.875 ml	2.25 ml	2.8 ml
4X Separating	1.875 ml	1.875 ml	1.875 ml	1.875 ml	1.875 ml
10% APS	37.5 μ l	37.5 μ l	37.5 μ l	37.5 μ l	37.5 μ l
TMED	7.5 μ l	7.5 μ l	7.5 μ l	7.5 μ l	7.5 μ l
Total	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml

* ปริมาตรต่อการเตรียม 1 แผ่นเจล SDS-PAGE

Stacking gel	
dH ₂ O	1.625 ml
40% 37.5 Acry/Bis	0.25 ml
4X Stacking	0.625 ml
10% APS	12.5 μ l
TMED	2.5 μ l
Total	2.5 ml

* ปริมาตรต่อการเตรียม 1 แผ่นเจล SDS-PAGE

PVDF membrane

- PVDF membrane ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

TBS-T buffer

- Tris-HCl pH 7.5 1 โมลาร์
- NaCl 2.5 โมลาร์ และ
- Tween 20 ร้อยละ 0.075

ส่วนประกอบใน TMEM lysis buffer (Immunoprecipitation)

Nonidet-40 ร้อยละ 1 ใน TMEM lysis buffer (ล้าง Beads เปล่า)

- TMEN buffer
 - Tris-HCl pH 7.5 20 มิลลิโมลาร์
 - $MgCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์
 - NaCl 150 มิลลิโมลาร์
 - EGTA 100 มิลลิโมลาร์
- Nonidet-40 ร้อยละ 1
- Glycerol ร้อยละ 10
- Sodium fluoride (NaF) 5 มิลลิโมลาร์
- Sodium metavanadate ($NaVO_3$) 1 มิลลิโมลาร์
- Phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 มิลลิโมลาร์ และ
- Protease inhibitor cocktail (Roche)

Nonidet-40 ร้อยละ 0.25 ใน TMEM lysis buffer (ล้าง Beads ที่จับอยู่กับโปรตีน)

- ส่วนประกอบเช่นเดียวกันแต่ใช้ Nonidet-40 ความเข้มข้นร้อยละ 0.25



1. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพรีพีดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี MTT

Conc (μM)	24 h				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
5	0.8726	0.9547	1.0798	0.9674	0.9686	0.0852
10	0.9927	0.8228	0.9823	0.8992	0.9243	0.0795
20	0.8474	0.9558	0.8893	0.9493	0.9105	0.0516
50	0.8379	0.8154	0.7498	0.7937	0.7992	0.0375
100	0.6910	0.6278	0.7293	0.7129	0.6903	0.0445

Conc (μM)	48 h				ave	SD
0	0.9984	0.8684	1.1390	0.9839	0.9974	0.1109
5	1.1121	0.9312	0.9438	0.8292	0.9541	0.1172
10	0.8282	0.9832	0.9218	0.9338	0.9168	0.0647
20	0.9823	0.8284	0.9278	0.8920	0.9076	0.0646
50	0.7723	0.6839	0.7820	0.7125	0.7377	0.0472
100	0.6658	0.5519	0.6433	0.6104	0.6179	0.0495

Conc (μM)	72 h				ave	SD
0	0.9592	0.9482	1.0823	0.9927	0.9956	0.0608
5	0.9959	0.8712	0.9168	0.9527	0.9342	0.0530
10	0.9327	0.9594	0.9787	0.8528	0.9309	0.0554
20	0.8724	0.9113	0.8462	0.9484	0.8946	0.0447
50	0.6354	0.7520	0.7241	0.7137	0.7063	0.0500
100	0.4823	0.5782	0.5030	0.5109	0.5186	0.0415

2. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพรีพีดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst 33342

Conc (μM)	0	5	10	20	50	100
	0.3240	0.3130	0.4100	0.3130	22.8070	40.0000
	0.5020	0.4560	0.4430	0.4520	13.6840	39.2860
	0.3330	0.6170	0.5560	0.3370	11.4290	40.2060
	0.7110	0.5540	0.4050	0.4040	13.2080	33.6730
ave	0.4675	0.4850	0.4535	0.3765	15.2820	38.2913
SD	0.1818	0.1324	0.0704	0.0634	5.1097	3.1040

3. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีดีนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี

MTT

24 h	0 (μM)	5 (μM)	10 (μM)	20 (μM)
	1.0000	0.8430	0.8412	0.8451
	1.0000	1.0130	0.8802	0.9129
	1.0000	1.0390	1.0289	1.0038
	1.0000	0.9682	0.9262	0.9365
ave	1.0000	0.9658	0.9191	0.9246
SD	0.0000	0.0869	0.0810	0.0655

48 h	0 (μM)	5 (μM)	10 (μM)	20 (μM)
	1.0000	0.9601	0.9780	0.9800
	1.0000	0.8995	0.8930	0.9790
	1.0000	1.0933	1.0767	1.0319
	1.0000	0.9320	0.9694	0.9836
ave	1.0000	0.9712	0.9793	0.9936
SD	0.0000	0.0851	0.0754	0.0256

72 h	0 (μM)	5 (μM)	10 (μM)	20 (μM)
	1.0000	1.0400	0.9890	1.0128
	1.0000	0.9420	1.0220	1.0280
	1.0000	1.2610	1.1830	1.0170
	1.0000	1.0520	1.0378	1.0327
ave	1.0000	1.0738	1.0580	1.0226
SD	0.0000	0.1342	0.0858	0.0093

4. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี

Wound healing

24h	Time (h)	Conc 0 (μM)				ave	SD
	24	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
	48	1.5871	1.3240	1.4200	1.4987	1.4575	0.1121
	72	1.8774	2.3926	1.5920	1.7760	1.9095	0.3430

24h	Time (h)	Conc 5 (μM)				ave	SD
	24	0.8104	0.7399	1.2032	0.9413	0.9237	0.2042
	48	1.1330	1.3873	1.2568	1.2924	1.2674	0.1052
	72	1.7837	2.2118	1.4093	1.9345	1.8348	0.3345

24h	Time (h)	Conc 10 (μM)				ave	SD
	24	0.5065	0.6781	0.9686	0.7539	0.7268	0.1916
	48	0.9472	1.3252	0.8152	1.5253	1.1533	0.3290
	72	1.8582	1.7432	1.6270	1.6197	1.7120	0.1127

24h	Time (h)	Conc 20 (μM)				ave	SD
	24	0.4410	0.3562	0.5673	0.4972	0.4654	0.0893
	48	1.1692	0.8634	1.1883	0.9878	1.0522	0.1549
	72	1.6518	1.1986	1.4838	1.3654	1.4249	0.1912

48h	Time (h)	Conc 0 (μM)				ave	SD
	24	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
	48	2.0847	2.1725	2.1020	1.9847	2.0860	0.0775
	72	2.4985	2.5225	2.8200	2.5584	2.5999	0.1488

48h	Time (h)	Conc 5 (μM)				ave	SD
	24	0.7200	1.2712	0.8982	0.9872	0.9692	0.2300
	48	1.7855	2.0870	1.5276	1.6760	1.7690	0.2369
	72	2.2078	2.3499	1.8386	2.5953	2.2479	0.3164

48h	Time (h)	Conc 10 (μM)				ave	SD
	24	0.8381	0.2252	0.5787	0.4784	0.5301	0.2536
	48	1.7638	1.9979	1.3562	1.6932	1.7028	0.2652
	72	2.3308	1.8601	2.2491	1.9956	2.1089	0.2188

48h	Time (h)	Conc 20 (μM)				ave	SD
	24	0.5138	0.3268	0.8500	0.7223	0.6032	0.2306
	48	1.1343	0.9182	1.3200	1.2327	1.1513	0.1730
	72	1.5809	1.6890	1.4150	1.5492	1.5585	0.1129

72h	Time (h)	Conc 0 (μM)				ave	SD
	24	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
	48	1.6009	1.6628	1.8832	1.7682	1.7288	0.1240
	72	1.8110	2.2118	2.4037	2.4270	2.2134	0.2851

72h	Time (h)	Conc 5 (μM)				ave	SD
	24	0.7538	0.6003	0.4020	0.6979	0.6135	0.1546
	48	1.0783	1.5300	1.2424	1.3982	1.3122	0.1953
	72	1.7830	1.8843	1.5224	1.6841	1.7185	0.1542

72h	Time (h)	Conc 10 (μM)				ave	SD
	24	0.7112	0.4880	0.2395	0.5799	0.5046	0.1991
	48	1.3108	1.1581	1.0411	1.1924	1.1756	0.1110
	72	1.7627	1.5550	1.4033	1.6341	1.5888	0.1504

72h	Time (h)	Conc 20 (μM)				ave	SD
	24	0.7016	0.4216	0.1820	0.3879	0.4233	0.2137
	48	1.2976	0.9361	0.5109	0.7499	0.8736	0.3319
	72	1.5430	1.4930	1.1971	1.3114	1.3861	0.1605

5. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีนิตต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิดH460 ด้วยวิธี

Transwell migration

Conc (μM)	0	5	10	20
	1.0000	0.2952	0.2500	0.0383
	1.0000	0.3263	0.1755	0.0243
	1.0000	0.5642	0.1698	0.0318
	1.0000	0.6319	0.0882	0.0170
	1.0000	0.5690	0.0890	0.0337
ave	1.0000	0.4773	0.1545	0.0290
SD	0.0000	0.1548	0.0680	0.0084

6. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีนิตต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี *In**vitro* tumor spheroid-based migration

Conc (μM)	72 h				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
20	0.5853	0.5980	0.6135	0.6889	0.6214	0.0464

7. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีนิตต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะไร้การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

Conc (μM)	0	5	10	20
ave	386.3819	328.4134	321.6616	290.3780
SD	160.6508	113.8189	118.9778	102.9868
NO	194	123	78	49

8. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีนิตต่อการเรียงตัวของ Actin stress fiber และการสร้าง Focal adhesion ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

Conc (μM)	SFs				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
10	0.4500	0.4724	0.5780	0.5260	0.5066	0.0573
20	0.2680	0.1945	0.2281	0.2422	0.2332	0.0306

Conc (μM)	FAs				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
10	0.3900	0.4650	0.4300	0.4198	0.4262	0.0309
20	0.0670	0.1430	0.1380	0.1325	0.1201	0.0357

9. ผลการทดสอบผลของไซพริพีดีนต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อ
บุผิวในเซลล์มะเร็งรังปอดชนิด H460 ด้วยวิธี Western blot

Conc (μ M)	Slug				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
5	0.8000	0.7800	0.7300	0.6900	0.7500	0.0497
10	0.4513	0.3630	0.2490	0.3420	0.3513	0.0830
20	0.1772	0.1284	0.1611	0.1465	0.1533	0.0208

Conc (μ M)	Snail				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
5	1.6810	1.0720	1.2320	1.3482	1.3333	0.2580
10	1.1424	0.9213	1.2322	1.1531	1.1122	0.1334
20	0.9602	1.1232	1.1342	1.2750	1.1232	0.1288

Conc (μ M)	Vimentin				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
5	1.1210	0.7602	0.9223	0.9672	0.9427	0.1485
10	0.7870	0.9320	0.8546	0.8315	0.8513	0.0607
20	0.3050	0.3659	0.4629	0.4136	0.3869	0.0674

Conc (μ M)	N-cadherin				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
5	0.4330	0.3630	0.2692	0.3438	0.3522	0.0673
10	0.3541	0.2012	0.0382	0.2481	0.2104	0.1314
20	0.0546	0.0412	0.1602	0.0753	0.0828	0.0535

10. ผลการทดสอบผลของสารไซพริพีดีนต่อปริมาณ mRNA ของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และ
เซลล์เยื่อบุผิวในเซลล์มะเร็งรังปอดชนิด H460 ด้วยวิธี qRT-PCR

	Ctrl				ave	SD
Slug	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000

	Cypripedin				ave	SD
Slug	0.9879	0.9570	1.0287	0.9742	0.9869	0.0306

11. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีพิดินต่อค่าครึ่งชีวิตของ Slug และกระบวนการโปรตีนโอไลซิสมานยูบิควิติน (Ubiquitin-mediated proteolysis) ในเซลล์มะเร็งรังโปดชนิด H460 ด้วยวิธี Western blot

Time (h)	CHX				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
1	0.7983	1.0082	0.9382	0.8690	0.9034	0.0902
2	0.4123	0.5537	0.5988	0.4792	0.5110	0.0822
3	0.4053	0.5194	0.4898	0.3982	0.4532	0.0607
4	0.1797	0.2157	0.2647	0.2425	0.2256	0.0366

Time (h)	Cypripedin+CHX				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
1	0.1787	0.2421	0.2904	0.2212	0.2331	0.0464
2	0.3072	0.2776	0.3532	0.2744	0.3031	0.0365
3	0.1101	0.1823	0.1818	0.1382	0.1531	0.0354
4	0.0844	0.1382	0.1159	0.0745	0.1033	0.0292

Time (h)	Cypripedin				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
1	0.8323	0.9482	1.1725	0.9721	0.9813	0.1413
2	0.5431	0.5502	0.6146	0.7041	0.6030	0.0747
3	0.5718	0.6437	0.6913	0.6123	0.6298	0.0505
4	0.1673	0.2196	0.2268	0.1983	0.2030	0.0267

Time (h)	Cypripedin+MG132				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
1	0.7626	1.0245	1.1129	1.0322	0.9831	0.1523
2	0.8301	0.9145	0.9682	0.8790	0.8980	0.0582
3	0.8123	0.8982	0.7684	0.9123	0.8478	0.0690
4	0.7467	0.8532	0.8156	0.7971	0.8031	0.0443

Time (h)	DMSO				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
1	0.8719	0.9115	0.9172	0.9126	0.9033	0.0211
2	1.1231	0.9885	0.9275	0.9675	1.0017	0.0848
3	1.0624	0.9883	0.9328	1.0026	0.9965	0.0532
4	0.7660	0.9482	0.8245	0.8728	0.8529	0.0771

12. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อวิถี ERK ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี Western blot

Conc (μM)	0				ave	SD
p-ERK/ERK	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000

Conc (μM)	5				ave	SD
p-ERK/ERK	0.9831	1.0162	0.9635	1.1121	1.0187	0.0659

Conc (μM)	10				ave	SD
p-ERK/ERK	0.9781	0.9294	1.0362	0.9947	0.9846	0.0442

Conc (μM)	20				ave	SD
p-ERK/ERK	0.9523	1.0990	0.8651	0.9842	0.9752	0.0967

13. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟิดินต่อวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี Western blot

Conc (μM)	0				ave	SD
p-AKT/AKT	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
p-GSK3 β /GSK3 β	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000

Conc (μM)	5				ave	SD
p-AKT/AKT	0.4614	0.5937	0.7410	0.6207	0.6042	0.1147
p-GSK3 β /GSK3 β	0.4829	0.5113	0.6014	0.5624	0.5395	0.0528

Conc (μM)	10				ave	SD
p-AKT/AKT	0.4910	0.4180	0.3157	0.3899	0.4037	0.0725
p-GSK3 β /GSK3 β	0.4178	0.5780	0.4583	0.3992	0.4633	0.0803

Conc (μM)	20				ave	SD
p-AKT/AKT	0.2049	0.1927	0.1740	0.2423	0.2035	0.0289
p-GSK3 β /GSK3 β	0.1710	0.2545	0.3023	0.2001	0.2320	0.0583

14. ผลการทดสอบผลของสาร LY294002 ต่อวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี

Western blot

Conc (μM)	0				ave	SD
p-Akt/Akt	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
p-GSK-3 β /GSK-3 β	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000

Conc (μM)	2.5				ave	SD
p-Akt/Akt	0.9021	0.8724	0.9395	1.1713	0.9713	0.1361
p-GSK-3 β /GSK-3 β	1.0612	0.9520	0.8424	0.9132	0.9422	0.0914

Conc (μM)	5				ave	SD
p-Akt/Akt	0.5799	0.6690	0.4693	0.5190	0.5593	0.0860
p-GSK-3 β /GSK-3 β	0.7810	0.9154	0.6822	0.8526	0.8078	0.1001

Conc (μM)	10				ave	SD
p-Akt/Akt	0.3280	0.2080	0.3930	0.2782	0.3018	0.0782
p-GSK-3 β /GSK-3 β	0.3950	0.3280	0.4017	0.3234	0.3620	0.0421

15. ผลการทดสอบผลของสาร LY294002 ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี

Wound healing

Time (h)	0 (μM)				ave	SD
12	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
24	1.2480	1.1163	1.0761	1.1893	1.1574	0.0764

Time (h)	2.5 (μM)				ave	SD
12	0.8040	0.9870	1.2040	0.8637	0.9647	0.1768
24	1.2322	0.8616	1.1140	1.2913	1.1248	0.1903

Time (h)	5 (μM)				ave	SD
12	0.6740	0.9620	0.8730	0.8000	0.8273	0.1218
24	0.9064	1.0140	0.8524	1.0802	0.9633	0.1029

Time (h)	10 (μM)				ave	SD
12	0.5820	0.6940	0.7612	0.6121	0.6623	0.0811
24	0.8286	0.9212	0.8027	0.7939	0.8366	0.0583

16. ผลการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 โดยทำการ Transfection ด้วย Plasmid ที่มียีน Akt

	p-Akt				ave	SD
H460/Ctrl	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
H460/Akt	2.1380	1.9867	2.5360	2.6200	2.3202	0.3060

	Akt				ave	SD
H460/Ctrl	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
H460/Akt	3.1350	2.6850	2.9823	2.4870	2.8223	0.2914

17. ผลการทดสอบผลของเซลล์ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกของ Akt ต่อการเคลื่อนที่ของ เซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี Wound healing

H460/Ctrl					ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
10	0.4336	0.4618	0.4420	0.5080	0.4614	0.0333
20	0.3121	0.3427	0.2819	0.3220	0.3147	0.0253

H460/Akt					ave	SD
0	1.2830	1.6548	1.3580	1.9186	1.5536	0.2915
10	1.4170	1.9569	1.1267	1.3022	1.4507	0.3580
20	1.1547	1.4320	1.0843	1.2543	1.2313	0.1509

18. ผลการทดสอบผลของเซลล์ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกของ Akt ต่อวิถี Akt ด้วยวิธี Western blot

p-Akt/Akt	H460/Ctrl				ave	SD
0	1.0104	0.9923	1.0326	0.9839	1.0048	0.0216
20	1.8789	1.8065	1.9126	1.8578	1.8639	0.0444

p-Akt/Akt	H460/Akt				ave	SD
0	1.0114	1.0023	0.9983	0.9876	0.9999	0.0099
20	0.7324	0.8235	0.8468	0.8912	0.8235	0.0669

p-GSK-3 β /GSK-3 β	H460/Ctrl				ave	SD
0	1.0235	0.9899	0.9983	1.0031	1.0037	0.0143
20	0.2436	0.3012	0.2799	0.2835	0.2770	0.0242

p-GSK-3 β /GSK-3 β	H460/Akt				ave	SD
0	0.9822	1.0311	0.9934	1.0432	1.0125	0.0293
20	0.7513	0.6719	0.6306	0.7913	0.7113	0.0732

Slug	H460/Ctrl				ave	SD
0	0.9978	1.0321	1.0152	1.0210	1.0165	0.0143
20	0.0968	0.1014	0.0824	0.1378	0.1046	0.0236

Slug	H460/Akt				ave	SD
0	0.9877	1.0263	1.0034	0.9789	0.9991	0.0208
20	0.7593	0.7983	0.6799	0.8623	0.7749	0.0763

19. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไซพริฟิดินในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 ด้วยวิธี MTT

Conc (μ M)	24 h				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
10	1.0338	0.9837	1.1373	0.9074	1.0155	0.0964
20	1.0735	1.0890	0.9980	1.1229	1.0708	0.0528
50	1.0825	0.9978	1.0231	1.1763	1.0699	0.0793
100	1.0917	0.9825	0.9412	1.0217	1.0093	0.0640
200	1.0728	0.9480	0.9548	0.9934	0.9922	0.0573

Conc (μ M)	48 h				ave	SD
0	0.9648	1.1073	0.9782	0.9437	0.9985	0.0739
10	0.9627	0.8423	0.9335	1.0748	0.9533	0.0958
20	0.9226	0.9115	0.8142	1.0233	0.9179	0.0855
50	0.9136	0.9192	1.0842	0.8623	0.9448	0.0964
100	0.8097	0.8984	0.7984	0.9782	0.8712	0.0842
200	0.5929	0.6569	0.6992	0.6874	0.6591	0.0476

Conc (μ M)	72 h				ave	SD
0	1.0213	0.8824	1.0624	1.0177	0.9959	0.0784
10	0.9696	0.9408	0.9381	0.8893	0.9345	0.0333
20	0.8142	0.8567	0.9267	0.9713	0.8922	0.0702
50	0.8524	0.8400	0.9294	0.9306	0.8881	0.0486
100	0.5138	0.4724	0.6039	0.5621	0.5380	0.0572
200	0.3627	0.2075	0.2989	0.3013	0.2926	0.0640

20. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีดินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 ด้วยวิธี

MTT

Time (h)	0 (μM)				ave	SD
24	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
48	1.3121	1.2521	1.3390	1.3917	1.3237	0.0581
72	1.6380	1.4620	1.5570	1.5483	1.5513	0.0720

Time (h)	20 (μM)				ave	SD
24	0.7487	0.9970	1.2783	0.8799	0.98	0.23
48	1.4780	0.9980	1.3397	0.9743	1.20	0.25
72	1.6892	1.4930	1.5630	1.5314	1.57	0.08

Time (h)	50 (μM)				ave	SD
24	0.9168	1.1150	1.0020	1.0935	1.03	0.09
48	1.3280	1.2701	1.3530	1.1785	1.28	0.08
72	1.5290	1.7812	1.6598	1.6159	1.65	0.10

21. ผลการทดสอบผลของสารไซพรีฟีดินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ด้วยวิธี

Wound healing

Time (h)	0 (μM)				ave	SD
24	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
48	1.6798	2.0120	1.8500	1.7832	1.8313	0.1394
72	2.2486	2.3930	2.0912	2.4273	2.2900	0.1535

Time (h)	20 (μM)				ave	SD
24	0.6070	1.3341	0.8110	0.9558	0.9270	0.3068
48	1.4250	1.8300	1.5500	1.6454	1.6126	0.1707
72	1.6530	1.9240	1.8371	1.9163	1.8326	0.1260

Time (h)	50 (μM)				ave	SD
24	0.4130	0.7600	0.5480	0.6427	0.5909	0.1469
48	1.3900	0.9280	1.1100	1.1784	1.1516	0.1909
72	1.2700	1.5630	1.4900	1.4183	1.4353	0.1250

22. ผลการทดสอบผลของไซเพริฟีดินต่อการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์มีเซนไคม์และเซลล์เยื่อบุผิวในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 ด้วยวิธี Western blot

Conc (μM)	Slug				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
20	0.4469	0.5869	0.6748	0.5398	0.5621	0.0950
50	0.4072	0.3260	0.2611	0.3580	0.3381	0.0612

Conc (μM)	Snail				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
20	1.2919	1.0246	1.1934	0.9742	1.1210	0.1475
50	0.8030	0.9110	1.1260	0.9734	0.9534	0.1349

Conc (μM)	Vimentin				ave	SD
0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
20	0.9661	0.7430	0.6057	0.8533	0.7920	0.1540
50	0.3426	0.4176	0.4699	0.4793	0.4273	0.0627

23. ผลการทดสอบผลของสารไซเพริฟีดินต่อวิถี Akt ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H23 ด้วยวิธี Western blot

	0 (μM)				ave	SD
p-AKT/AKT	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
p-GSK3 β /GSK3 β	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000

	20 (μM)				ave	SD
p-AKT/AKT	0.4020	0.3490	0.5910	0.4640	0.4515	0.1042
p-GSK3 β /GSK3 β	0.5150	0.7450	0.8710	0.6400	0.6928	0.1515

	50 (μM)				ave	SD
p-AKT/AKT	0.1810	0.0620	0.1440	0.1020	0.1223	0.0515
p-GSK3 β /GSK3 β	0.6790	0.3590	0.2650	0.3980	0.4253	0.1781

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุรัสวดี ตริสุวรรณ เกิดวันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี เกษศาสตรบัณฑิต จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปีการศึกษา 2555 จากนั้นเข้าปฏิบัติงานเป็นพนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งเกษตรปฏิบัติการ ที่คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY