รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สารฟลูโคแซนทีนเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-ฟลูออโรยูราซิล ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ผ่านทางการลดระดับเอนไซม์แมทริกซ์เมทาโลโปรติเอส

Fucoxanthin enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells via decreasing the levels of matrix metalloproteinase enzymes

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย

อ.สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ

สัญญาเลขที่ 169/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สารฟลูโคแซนทีนเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-ฟลูออโรยูราซิลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ผ่านทางการลดระดับเอนไซม์แมทริกซ์เมทาโลโปรติเอส

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย

ส่วนงาน

อ.สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน

สาขาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยเรื่อง สารฟลูโคแซนทีนเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-ฟลูออโรยูราซิลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ผ่านทางการลดระดับเอนไซม์แมทริกซ์เมทาโลโปรติเอส (Fucoxanthin enhances the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells via decreasing the levels of matrix metalloproteinase enzymes) งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 169/2561 และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุน สถานที่ทำวิจัยและเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.).....อาจารย์สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน.....ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) สารฟลูโคแซนทีนเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-ฟลูออโรยูราซิลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ผ่านทางการลดระดับเอนไซม์แมทริกซ์เมทาโลโปรติเอส

(ภาษาอังกฤษ) Fucoxanthin enhances the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells via decreasing the levels of matrix metalloproteinase enzymes

รหัสโครงการ .....-..... / สัญญาเลขที่.....169/2561.....ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น..... 372,000.....บาท (.....สามแสนเจ็ดหมื่นสองพันบาทถ้วน.....)

ระยะเวลาการดำเนินงาน.....1..... ปี (ระหว่างวัน เดือน ปี)

- บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นชนิดของมะเร็งที่พบได้ทั่วไปในโลก รวมถึงประเทศไทย จัดเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข มะเร็งชนิดนี้เริ่มต้นจากเซลล์ที่บุอยู่ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย โดยยา 5-ฟลูออโรยูราซิลเป็นยาเคมีบำบัดตัวแรกที่นำมาใช้สำหรับการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และถูกนำไปใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดอื่นๆ รวมถึงยาที่มีความจำเพาะสำหรับการรักษามะเร็ง และวิธีอื่นๆที่ใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตามอัตราการตอบสนองของยานี้ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะสุดท้ายประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์และนำไปสู่การรักษาด้วยยานี้ที่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องมาจากการดื้อต่อยาเคมีบำบัด และอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ลดลงภายหลังการรักษา ดังนั้นการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่สำหรับเพิ่มอัตราการตอบสนองหรือลดการดื้อต่อยา 5-ฟลูออโรยูราซิล จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากสำหรับการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก สารฟลูโคแซนทีน จัดเป็นสารในกลุ่ม carotenoids ที่สามารถพบได้ในสาหร่ายทั่วไปในท้องทะเล ก่อนหน้านี้มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งหลายชนิด รวมถึงการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญชนิดนี้ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพิ่มเติมของสารฟลูโคแซนทีนในการเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยาเคมีบำบัด ซึ่งใช้เป็นยามาตรฐานสำหรับการรักษามะเร็ง ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญชนิดนี้ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค MTT cell viability assay ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบสารฟลูโคแซนทีนกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ผลการศึกษาพบว่าสารฟลูโคแซนทีนสามารถยับยั้งการรอดชีวิตและการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการทดสอบ จึงได้ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของสารฟลูโคแซนทีนร่วมกับยาต้านมะเร็ง 5-ฟลูออโรยูราซิล เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ที่ขนาดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเซลล์มะเร็งมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงอย่างชัดเจน และพบอัตราการรอดชีวิตที่น้อยมาก เมื่อเพิ่มขนาดและความเข้มข้นของสารฟลูโคแซนทีน จากนั้นจึงตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งกับ matrigel และความสามารถในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งผ่านชั้น basement membrane ที่ได้จำลองโดยใช้ matrigel พบว่า เมื่อทดสอบร่วมกันโดยเพิ่มขนาดของยา 5-ฟลูออโรยูราซิล พบว่าสามารถยับยั้งความสามารถ

ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และลุกลามได้ จึงได้ตรวจสอบผลของสารทั้ง 2 ชนิด ต่อการแสดงออกในระดับยีนและโปรตีน MMP-9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการลุกลามของเซลล์มะเร็ง พบว่าเมื่อทดสอบสารร่วมกัน มีผลต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนของเซลล์มะเร็งภายหลังการทดสอบ โดยมีผลลดการแสดงออกทั้งระดับยีนและโปรตีน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในระดับโมเลกุล ที่สามารถนำมาใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งดังกล่าว จากผลการทดสอบทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารสำคัญฟลูโคแซนทีนและยา 5-ฟลูออโรยูราซิล ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป ถึงการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลและการทดสอบความปลอดภัย รวมถึงขนาดและความปลอดภัยสำหรับใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป

- Output / Outcome

- Manmuan S, Manmuan P. (2018) Fucoxanthin inhibit cell proliferation and affecting invasion ability in SW-620 colorectal cancer cells. The 5th Joint Symposium of Thammasat University, BK21 PLUS of CUK and National Defense Medical Center. November 9th-10th, 2018 Thammasat University, Rangsit Center, THAILAND International Conference Hall, 2nd floor, Piyachat Building II

- Manmuan S, Manmuan P. (2019) Fucoxanthin inhibit cell adhesion and decreasing MMP-9 activity in SW-620 colorectal cancer cells. The 7th Annual meeting of the Society for Stem Cell Research “ Stem Cell and Regenerative Medicine” 2019. Siriraj Medical Research Center (SiMR) Building, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

- ข้อเสนอแนะ

-

บทคัดย่อ (Abstract) ภาษาไทย และภาษาอังกฤษ

ที่มาและความสำคัญ : ปัญหาการดื้อต่อยาจัดเป็นปัญหาที่สำคัญ ซึ่งมีผลลดประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด และทำให้เกิดปัญหาหรือรักษาไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งต้องแก้ไขอย่างเร่งด่วนในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก สาร fucoxanthin เป็นสารธรรมชาติ จัดเป็นสารในกลุ่ม carotenoid มีสีส้ม และสามารถพบได้เป็นอย่างมากในสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งจัดได้ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด จากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่า fucoxanthin มีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีมากและมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆมากมาย จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยมากขึ้น เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการรักษามะเร็ง

วัตถุประสงค์ของการศึกษา : เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งและแสดงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร fucoxanthin ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการลุกลาม

วิธีการศึกษา : เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา คือ SW-620 cells ถูกบ่มด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และบ่มเซลล์ร่วมกับยา 5-FU เพื่อประเมินผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งมะเร็ง การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค MTT colorimetric assay ฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามและการยึดเกาะถูกวัดในสภาวะภายหลังบ่มเซลล์ด้วยสาร fucoxanthin ร่วมกับยา 5-FU ที่ความเข้มข้นต่างๆ และประเมินระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน MMP-9 ภายหลังการทดสอบเซลล์ด้วยเทคนิค RT-PCR และ ELISA assay

ผลการศึกษา : ผลการศึกษาพบว่าสาร fucoxanthin สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งชนิด SW-620 ได้เป็นอย่างมาก ผ่านทางการยับยั้งการเจริญเติบโตและลดความสามารถในการลุกลาม ซึ่งผ่านทางการลดการแสดงออกของยีน MMP-9 และระดับโปรตีนที่พบในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สาร fucoxanthin สามารถเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งมากขึ้นของยา 5-FU โดยเปลี่ยนแปลงลักษณะจำเพาะซึ่งเป็นจุดเด่นของเซลล์มะเร็ง

ข้อสรุป : จากผลการทดลองนี้ เป็นการทดสอบเพื่อเพิ่มความสามารถของสาร fucoxanthin ในการฆ่าเซลล์มะเร็งและความเป็นไปได้ที่สาร fucoxanthin ที่เป็นสารธรรมชาติที่ได้จากสาหร่ายที่พบในทะเล จากผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษายาที่ได้จากทะเลหรือธรรมชาติในการออกแบบการทดลองและการศึกษาต่อยอดในทางคลินิก

คำสำคัญ : ฟลูโคแซนทีน, การลุกลามของมะเร็ง, การแพร่กระจาย, การยึดเกาะของเซลล์, มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

บทคัดย่อ (Abstract) ภาษาอังกฤษ

Background : Drug resistance is a major inconvenient lowering the traditional chemotherapeutic efficacy and highly undesirable therapeutic problem which crucially editing faster in colorectal cancer. Fucoxanthin is a naturally orange-carotenoid, predominantly found in edible brown algae and justify considered as nutritional ingredient possess with powerfully new strategy to enhance concurrent drug chemotherapy. Obviously studied exhibited that fucoxanthin is very good well documented as potential anti-cancer activity, remarkable numerous biological activities. Accordingly, it has prominently gain research to enhancing the understand in molecular mechanism details associating cancer therapy.

Objectives : This study was undertaken to assess the anti-cancer activity and explored the molecular mechanism of fucoxanthin on the inhibition of cell proliferation and cell invasion.

Methods : SW-620 cells were cultivated with fucoxanthin with for 24, 48, 72, 96 hr and co-treatment with 5-FU to evaluate synergistic potential. The cell viability of cancerous cells were determined by MTT colorimetric assay. The inhibitory effect of cell invasion and adhesion was measured in the presence of fucoxanthin with 5-FU in various concentrations. To determine MMP-9 gene and protein expression after treated cells by RT-PCR and ELISA assay.

Results : The results illustrated that fucoxanthin profoundly inhibited cell proliferation of SW-620 cells accompanied by growth arrest and diminished invasive ability, which mediated at one least part by the down-regulation of MMP-9 mRNA and protein expression. Especially, fucoxanthin extremely attenuated the anti-proliferative effect of established 5-FU by modulating the habitually hallmark of cancerous cells.

Conclusions : This results are raising up the capacity of fucoxanthin to eradicate cancer cells and the possibility that fucoxanthin could become a promising marine natural active constituents from seaweeds. Critical outcome of data in our studies will be serving as preliminary results for further studies marine drug in experimental model and well-controlled clinical trials.

Keyword : Fucoxanthin, Cancer invasion, Metastasis, Cell adhesion, Colorectal cancer

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	4
บทคัดย่อ	6
Abstract	7
บทที่ 1 บทนำ	13
- 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	
- 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	
- 1.3 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	
- 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	17
- 2.1 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	
- 2.2 การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	
- 2.3 Fucoxanthin	
- 2.4 กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis)	
- 2.5 เอนไซม์ matrix metalloproteinase	
บทที่ 3 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	28
- 3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620	
- 3.2 การศึกษาผลของ fucoxanthin ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT colorimetric assay	
- 3.3 การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ fucoxanthin และ 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT colorimetric assay	
3.4 การศึกษาผลของ fucoxanthin ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค cell invasion assay	

3.5 การศึกษาผลของ fucoxanthin ในการยับยั้งการยึดเกาะในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค cell adhesion assay

3.6 การศึกษาผลของ fucoxanthin ต่อการแสดงออกของยีน MMP-9 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค RT-PCR

3.7 การศึกษาผลของ fucoxanthin ในการลดระดับของเอนไซม์ matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Human MMP-9 ELISA assay

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บทที่ 4 ผลการวิจัย 33

- 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ภายหลังการทดสอบ
- 4.2 ผลการทดสอบเมื่อให้สาร fucoxanthin ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay
- 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells
- 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักผ่านชั้น matrigel ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง
- 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักผ่านชั้น matrigel ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 49

ผลการวิจัยที่ได้ 52

ผลผลิต 54

รายงานสรุปการเงิน 55

บรรณานุกรม 56

ภาคผนวก 61

ประวัตินักวิจัยและหน่วยงานสังกัด 62

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดง FDA-Approved Agents and Indications in Metastatic Colorectal Cancer as of December 2013 20

สารบัญภาพ (List of illustrations)

รูปภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งและส่วนของลำไส้ใหญ่ 17

ภาพที่ 2 แสดงระยะของมะเร็งลำไส้ใหญ่ 18

ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของ Fucoxanthin และสาร metabolites ของ Fucoxanthin : Fucoxanthinol, Amarouciaxanthin A, Halocynthiaxanthin 22

ภาพที่ 4 แสดงกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อไปเจริญเติบโตยังตำแหน่งอื่นหรือบริเวณอื่น 26

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

5-FU	5-fluorouracil
dTMP	deoxythymidine monophosphate
ECM	Extracellular matrix
MMPs	matrix metalloproteinases
TIMPs	tissue inhibitors of MMPs
TS	thymidylate synthase

บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นชนิดของมะเร็งที่ถูกวินิจฉัยพบได้บ่อยเป็นลำดับที่ 3 และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตทั้งในผู้ชายและผู้หญิงในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการประมาณของ American cancer society คาดการณ์ว่าประชาชน 136,830 จะถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งชนิดนี้และจะมีประชาชนอีก 50,310 คนที่เสียชีวิตจากโรคนี้ในปี 2014 (1) โดยมะเร็งชนิดนี้จะพบได้มากในผู้ที่อายุมากกว่า 50 ปี และผู้ป่วยที่รับประทานอาหารที่มีไขมันสูง (high-fat diet), แคลอรี่สูงและอาหารที่มีกากใยน้อย (low fiber diet) ซึ่งปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งชนิดนี้ ประกอบด้วย สิ่งแวดล้อม, พฤติกรรมการบริโภค, การออกกำลังกายน้อย, พฤติกรรมการสูบบุหรี่, การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นมะเร็งทั้งในบุคคลและครอบครัว เช่น ประวัติการเป็นมะเร็งรังไข่, มดลูก, เต้านมและผู้ป่วยที่เคยมีประวัติการเป็นโรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) มาก่อน (2) โดยลักษณะอาการของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่สามารถพบได้คือ พบเลือดในอุจจาระ, อุจจาระมีสีดำคล้ำ, ลักษณะของก้อนอุจจาระเปลี่ยนแปลงไป, มีอาการปวดหรือไม่สบายท้องบริเวณท้องส่วนล่าง, มีอาการท้องผูกหรือท้องเสีย, ความอยากอาหารลดลง, น้ำหนักตัวลดลง หรือในบางกรณี อาจเกิดภาวะสูญเสียเลือดจากมะเร็งนำไปสู่การเกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) หรือจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในปัจจุบัน ประกอบด้วยการผ่าตัดส่วนของลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่ประกอบด้วยก้อนมะเร็งออก จากนั้นจึงให้ยาเคมีบำบัดเพื่อลดการเจริญเติบโตและควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง, การให้ยาเคมีบำบัดจะใช้เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยระยะที่ 3 หรือจะใช้เป็นวิธีการรักษาหลักเพื่อลดการเกิดมะเร็งซ้ำ, การฉายรังสีจะใช้ร่วมด้วยหากเซลล์มะเร็งมีการเจริญและลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง (3)

5-fluorouracil เป็นยาเคมีบำบัดที่ยังคงใช้กันอย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ปี 1957 ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ และยังสามารถใช้ในการรักษามะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งที่ศีรษะและลำคอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันมีการนำยา 5-fluorouracil ไปใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มอัตราการตอบสนองและการรอดชีวิตในผู้ป่วย ซึ่งการใช้ยา 5-fluorouracil ร่วมกับยา irinotecan และ oxalipatin สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักประมาณ 40-50% ในขณะที่กลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของยานี้จะผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase (TS) ทำให้ยับยั้งการสร้าง deoxythymidine monophosphate (dTMP) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการ DNA replication และ DNA repair ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง DNA และ RNA (4) แต่อย่างไรก็ตามการดื้อต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งเป็นปัญหาหลักของการรักษามะเร็งในปัจจุบัน โดยกลไกการดื้อต่อยาต้านมะเร็งโดยทั่วไปประกอบด้วย การเพิ่มจำนวนและการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นเป้าหมายของยา, การเปลี่ยนแปลงการขนส่งยา

เข้าสู่เซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา, การเพิ่มกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) หรือการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีนที่เป็นสาเหตุของการดื้อยา ในขณะที่กลไกการดื้อต่อยา 5-fluorouracil นั้น ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงการขนส่งยาเข้าและออกจากเซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา, การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของเอนไซม์ thymidylate synthase, การทำงานที่เพิ่มขึ้นของ deoxyuridine triphosphate, การเกิด methylation ของ MLH1 gene, การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 proteins ซึ่งกลไกดังกล่าวเป็นสาเหตุซึ่งนำไปสู่การดื้อต่อยา 5-fluorouracil (5) ดังนั้น การพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยา 5-fluorouracil เพื่อลดปัญหาการดื้อต่อยา จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา

เนื่องจากพยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง, การลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดและน้ำเหลือง จนกระทั่งแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะอื่นๆภายในร่างกาย และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในอวัยวะนั้นๆ เนื่องจากในทุกๆเนื้อเยื่อนั้นจะประกอบด้วย ส่วนของ extracellular matrix (ECM) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีส่วนประกอบหลักเป็นไกลโคโปรตีน โดยมีบทบาทสำคัญในการควบคุมพฤติกรรมเซลล์และทำหน้าที่ควบคุมการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ และยังเป็นส่วนสำคัญสำหรับให้เซลล์ยึดเกาะและส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยเซลล์มะเร็งจะจับกับส่วนของ ECM และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ECM เพื่อใช้สำหรับการเคลื่อนที่จากบริเวณที่เกิดมะเร็ง (primary tumor) โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำลาย ECM จะต้องอาศัย proteolytic enzymes ที่มีชื่อว่า matrix metalloproteinases (MMPs) (6) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวการสำคัญในการทำลายส่วนของ ECM โดยปกติเอนไซม์ MMPs จะถูกสร้างมาจาก pro-inflammatory cells และ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) เช่น endothelial cells, fibroblasts, macrophages, osteoblasts, lymphocytes และ neutrophils โดยปกติ MMPs จะอยู่ในรูป zymogen ซึ่งต้องอาศัย proteolytic enzymes เช่น serine proteases, furin และ plasmin เพื่อเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูป active form ซึ่งในสภาวะปกติ proteolytic activity ของ MMPs จะถูกควบคุมโดย tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) แต่เมื่อเกิดพยาธิสภาพความสมดุลระหว่าง MMPs และ TIMPs จะถูกเปลี่ยนแปลง โดยการทำงานของเอนไซม์ MMPs จะสูงขึ้นและเป็นสาเหตุทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ (7,8) ซึ่งในเซลล์มะเร็งหลายชนิดจะพบการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs ที่สูงขึ้นและยังส่งเสริมกระบวนการต่างๆที่ซึ่งเป็น hallmarks สำคัญของการดำเนินของโรคมะเร็ง ประกอบด้วย กระบวนการ angiogenesis, invasion และ metastasis โดยเอนไซม์ MMPs จะส่งเสริมการทำลายเนื้อเยื่อในบริเวณที่เกิดมะเร็ง และทำให้เกิดการหลั่งของ growth factor และ cytokine ภายในส่วนของ ECM รวมถึงองค์ประกอบที่สำคัญอื่นๆของ ECM เช่น collagen, elastin, proteoglycan, vitronectin, laminin และ fibronectin ซึ่งการทำลายที่เกิดขึ้นจะส่งเสริมการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (9)

Fucoxanthin เป็นสาร carotenoid ที่ได้จากทะเล โดยสามารถพบได้ในสาหร่ายทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก เช่น สาหร่าย Undaria pinnatifida, Laminaria japonica, Phaeodactylum tricornutum และ Cylindrotheca closterium (10) โดยมีการศึกษาพบว่า fucoxanthin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ในการต้านการเกิดความอ้วน (anti-obecity), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ฤทธิ์ป้องกันโรคเบาหวาน (anti-diabetic) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-tumorigenic) จากการศึกษาของ Hosokawa และคณะเปรียบเทียบผลของ fucoxanthin และสาร carotenoids อื่นๆ เช่น β-carotene และ astaxanthin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด Caco-2, HT-29 และ DLD-1 พบว่า fucoxanthin สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสาร carotenoid อื่นๆ และพบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 มีความไวต่อ fucoxanthin มากที่สุด (11) และมีการศึกษาพบว่า fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10-20 μM สามารถยับยั้งการรอดชีวิตและเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 cells (12, 13) และจากการศึกษาในมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่า fucoxanthin กระตุ้น procaspase-3 และ PARP cleavages และเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 cells ผ่านทางการลดการแสดงออกของ anti-apoptotic BCL-2 และเพิ่ม pro-apoptotic Bax proteins (14)

ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการทดสอบผลการเสริมฤทธิ์ของ fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการรอดชีวิต, การยึดเกาะ, การลุกลาม อีกทั้งยังทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของผลการเสริมฤทธิ์ของ fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ผ่านทางการตรวจสอบระดับของเอนไซม์ matrix metalloproteinase ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลที่ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ fucoxanthin มากขึ้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ในการนำไปใช้พัฒนายาต้านมะเร็งเพื่อใช้ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางทะเลเพื่อใช้สำหรับการป้องกันและรักษาโรค

- เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางทะเล ในการนำมาใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งในปัจจุบันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา

วัตถุประสงค์เฉพาะของแผนงานวิจัย

- เพื่อศึกษาผลของ fucoxanthin ในการยับยั้งการรอดชีวิตในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- เพื่อศึกษาผลของ fucoxanthin ในการยับยั้งการยึดเกาะและการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ fucoxanthin ต่อการแสดงออกของ matrix metalloproteinase enzyme ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

- fucoxanthin จะสามารถยับยั้งการรอดชีวิต, การยึดเกาะและการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- fucoxanthin จะสามารถลดระดับของเอนไซม์ matrix metalloproteinase ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร fucoxanthin มากขึ้น อีกทั้งยังทำให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ของสาร fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์

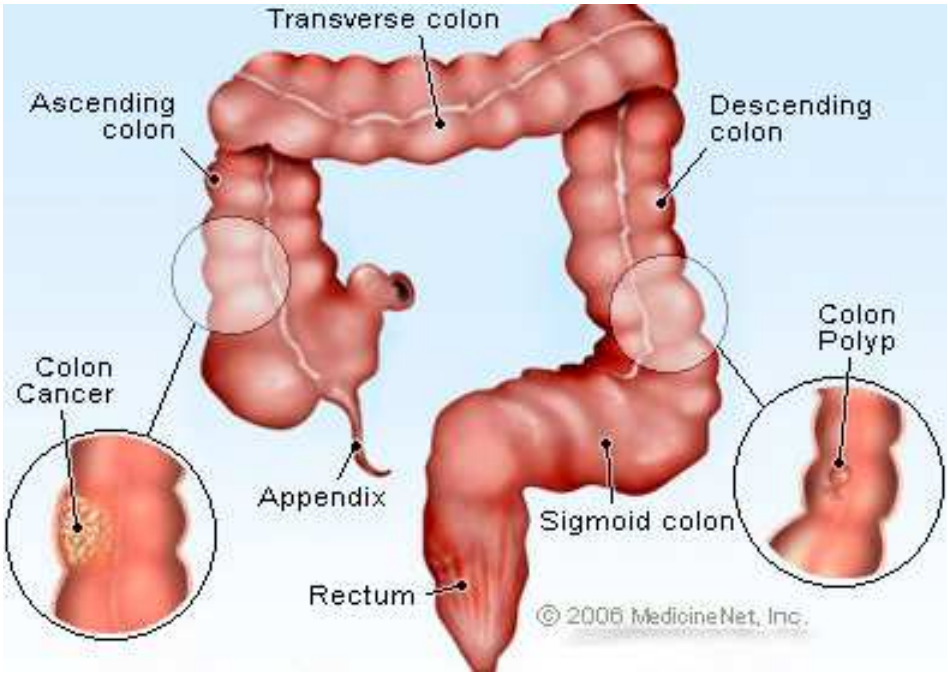
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม (Literature review)

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เริ่มเกิดขึ้นภายในลำไส้ส่วน colon และ rectum มีชื่อเรียกว่า colon cancer และ rectal cancer ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เริ่มเกิดมะเร็ง โดยมะเร็งเป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตแบบควบคุมไม่ได้และลุกลามไปยังบริเวณเนื้อเยื่อข้างเคียง รวมถึงแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆได้ ส่วนใหญ่มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจะเริ่มพัฒนาขึ้นจากเนื้อเยื่อที่เรียกว่า polyp ที่อยู่ที่ผนังด้านในของลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum ซึ่งเนื้อเยื่อ polyp ที่เกิดขึ้นจะมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้หากระยะเวลาผ่านไปหลายปีโดยการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ polyp ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. Adenomatous polyps (adenomas): เป็นชนิดของ polyps ที่บ่อยครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง เพราะจัดเป็นเนื้อเยื่อก่อนที่จะพัฒนาต่อเป็นมะเร็ง

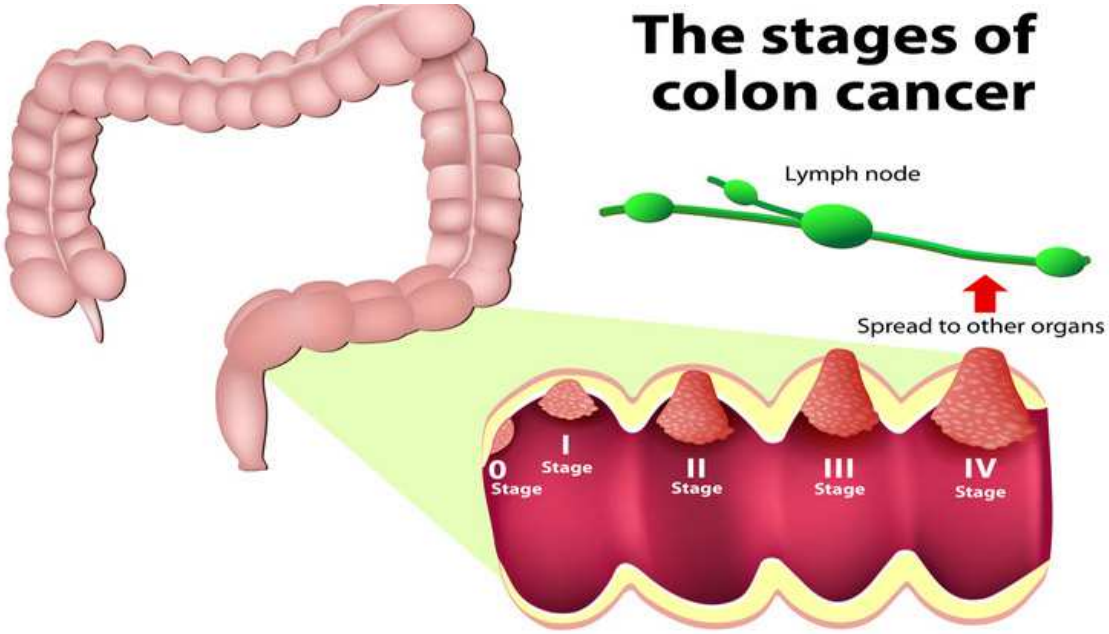
2. Hyperplastic polyps and inflammatory polyps: เป็นชนิดของเนื้อเยื่อที่พบได้ทั่วไป แต่โดยทั่วไปแล้วจะไม่พัฒนาต่อเป็นมะเร็ง



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งและส่วนของลำไส้ใหญ่

ที่มา : https://www.midwestcompassion.org/2014/10/09/prevention-colon-cancer-cannabis-extract/

เนื่องจากมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นปัญหาที่สำคัญทางสุขภาพที่พบได้บ่อยทั่วโลก สำหรับประเทศไทย จากการรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี 2554 พบว่ามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นชนิดของมะเร็งที่พบในประเทศไทยเป็นอันดับที่ 1 ในผู้ชาย และ อันดับที่ 3 ในผู้หญิง (15) ซึ่งปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งชนิดนี้ มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย อาทิเช่น ประวัติทางพันธุกรรม, ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมการบริโภค (2) การดำเนินของโรคจะเริ่มเกิดขึ้นจากการเกิดก้อนเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง (benign adenomatous polyp) จากนั้นจะมีการพัฒนาเป็นก้อนเนื้องอกชนิดร้ายแรง (advanced adenoma) และมีความสามารถในการลุกลาม (invasive) จากนั้นเซลล์มะเร็งจะลุกลามไปยังผนังของลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นระยะที่ I และ II ของมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งมะเร็งในระยะนี้สามารถทำการรักษาได้ แต่หากไม่ได้รับการรักษาเซลล์มะเร็งจะแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง (ระยะที่ III) จากนั้นก้อนมะเร็งจึงแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆของร่างกาย (ระยะที่ IV)



ภาพที่ 2 แสดงระยะของมะเร็งลำไส้ใหญ่

ที่มา : http://www.herbs-info.com/blog/10-warning-signs-of-colon-cancer-you-shouldnt-ignore/

การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

เนื่องจากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาอย่างมากเกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง นำไปสู่การเข้าใจกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งมากขึ้น จึงทำให้มีการพัฒนายาเพื่อนำมาใช้ในการรักษามะเร็งมากขึ้น การรักษามะเร็งในปัจจุบันมี 4 แนวทางหลัก ประกอบด้วย การผ่าตัด, การฉายรังสี, การให้ยาเคมีบำบัด และการรักษาโรคโดยการเพิ่มภูมิต้านทานของผู้ป่วย การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นวิธีที่

นิยมใช้ในการรักษา โดยมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะที่ I และ II สามารถทำการรักษาได้โดยวิธีการผ่าตัด (surgery) เอาก้อนมะเร็งออก ในขณะที่มะเร็งระยะที่ III สามารถทำการรักษาได้โดยวิธีการผ่าตัดร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด (adjuvant chemotherapy) ซึ่งยาเคมีบำบัดที่ให้นั้นจะมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย แต่ถ้าเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะที่ IV โดยปกติจะไม่มีวิธีการรักษา (16)

โดยในปัจจุบันได้มีการนำยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม (conventional chemotherapy) เช่น 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin, leucovorin และยาในกลุ่ม targeted therapy ได้แก่ bevacizumab, cetuximab, panitumumab และ capecitabine ซึ่งยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์จับกับ receptor ที่อยู่บริเวณผิวเซลล์หรือภายนอกเซลล์ โดยยาในกลุ่มดังกล่าวมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ายาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนหรือเจริญเติบโตได้ ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะส่วนอื่นๆของร่างกาย (17) โดยยากลุ่มดังกล่าวนิยมนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา แต่อย่างไรก็ตามยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิมยังคงนำมาใช้เป็นยาตัวแรก (first line treatment) ร่วมกับยากลุ่มอื่นๆหรือวิธีการรักษาอื่นๆ เช่น การฉายรังสี ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง

5-fluorouracil (5-FU) จัดเป็นยาตัวแรกที่นำมาใช้สำหรับการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และยังมีประโยชน์ในการนำมาใช้รักษามะเร็งเต้านมและมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น มะเร็งที่ศีรษะและคอ เนื่องจาก 5-fluorouracil มีผลข้างเคียงไม่รุนแรงมาก และสามารถนำไปใช้ร่วมกับยาอื่นๆในการรักษาผู้ป่วย อีกทั้งยังสามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายโดยการฉีดยาเข้าสู่เส้นเลือดดำ (intravenous) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยา 5-fluorouracil จะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase ที่ถูกควบคุมโดย cell cycle proteins และยายังมีความจำเพาะต่อเซลล์ในระยะ S phase นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ 5-fluorouracil ยังเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำกระบวนการ apoptosis จากการควบคุมยีนต่างๆที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เช่น Bax, Bcl-2 และ Bcl-xL ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการใช้ยา 5-fluorouracil ร่วมกับยาต้านมะเร็งตัวอื่นๆ และใช้ร่วมกับการฉายรังสีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดสูตร FOLFOX เป็นการรักษาด้วยยา 3 รายการ คือ 5-fluorouracil, leucovorin และ oxalipatin โดยการรักษาด้วยยาสูตร FOLFOX นั้นจะใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยยาจะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและลดขนาดของก้อนมะเร็ง

ตารางแสดง FDA-Approved Agents and Indications in Metastatic Colorectal Cancer as of December 2013

Table FDA-Approved Agents and Indications in Metastatic Colorectal Cancer as of December 2013

Class of Agent(s)		FDA Approval				
		Line of Therapy			Approved as Single Agent	Approved in Combination With Other Agents
		First-Line	Second-Line	Salvage Setting		
Cytotoxic chemotherapy	Fluorouracil	+	+	+	+	+
	Capecitabine	+			+	
	Irinotecan	+	+		+	+
	Oxaliplatin	+	+			+
VEGF inhibitor	Bevacizumab	+	+[a]			
	Aflibercept		+			+
EGFR antibody	Cetuximab	+	+	+	+	+
	Panitumumab			+	+	
Multikinase inhibitor	Regorafenib			+	+	

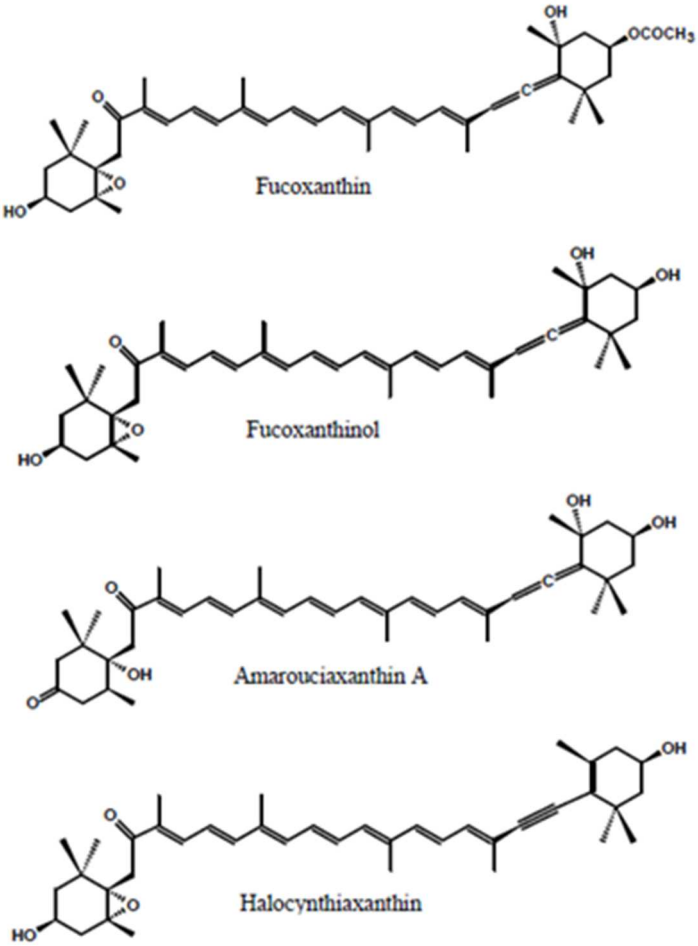
[a]Including patients who had received bevacizumab in first line of therapy.
EGFR = epidermal growth factor receptor; FDA = US Food and Drug Administration; VEGF = vascular endothelial growth factor.

ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพของยา 5-fluorouracil จะเพิ่มขึ้นจากการนำไปใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่นๆ แต่ปัญหาการดื้อต่อยา 5-fluorouracil ยังคงเกิดขึ้นและเป็นสาเหตุของการรักษาที่ไม่ประสบความสำเร็จ โดยปัญหาที่พบในทางคลินิกนั้นมีสาเหตุมาจากการดื้อต่อยา 5-fluorouracil และผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา เนื่องจากยามีผลต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเร็ว โดยอัตราการตอบสนองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักขั้นสุดท้ายต่อการรักษาด้วยยา 5-fluorouracil อยู่ที่ 10-15 % ในขณะที่การใช้ยา 5-fluorouracil ร่วมกับยารักษามะเร็งชนิดอื่นๆ สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองต่อยาได้ประมาณ 40-50 % ซึ่งการดื้อต่อยารักษามะเร็งเป็นผลมาจากหลายสาเหตุ ประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงการขนส่งยาเข้าและออกจากเซลล์, การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา, การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ thymidylate synthase, การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ deoxyuridine triphosphate ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ catabolism ของ 5-fluorouracil, การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2, Bcl-XL และ Mcl-1 และการแสดงออกของ proteins ในวัฏจักรของเซลล์ที่เปลี่ยนไป ที่นำไปสู่การดื้อต่อยา 5-fluorouracil (4) ดังนั้นการพัฒนายาเคมีบำบัดชนิดใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งการรักษามะเร็งแบบผสมผสาน (combination therapy) โดยการใช้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาต้านมะเร็งใหม่ เนื่องจากในปัจจุบันได้มีการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในการป้องกันและเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา อีกทั้งยังเป็นที่สนใจของนักวิจัยทางการแพทย์ สำหรับในประเทศไทยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลอาจยังไม่เป็นที่นิยมสำหรับการนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรค แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีความสนใจที่จะศึกษามากขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล เช่น พืชทาง

ทะเล, สิ่งมีชีวิตหรือแบคทีเรียทางทะเล ประกอบด้วย สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังนั้นการพัฒนายาใหม่จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พิษวิทยาและความปลอดภัยในการนำมาใช้ อีกทั้งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล ยังประกอบไปด้วยสารสำคัญต่างๆ เช่น flavonoids, phenolic compounds, carotenoid และสารพฤกษเคมีอื่นๆ ที่ซึ่งมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม และมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง มีการศึกษามากมายแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ได้จากธรรมชาติสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา โดยมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติน้อยมาก จากการศึกษาของ Se-Lim Kim และ คณะ รายงานถึง parthenolide เป็นสารสำคัญที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ สามารถเพิ่มฤทธิ์ของยา 5-fluorouracil ในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทางการกระตุ้น mitochondrial pathway โดยพบการแสดงออกของ anti-apoptotic proteins : Bcl-2 และ Bcl-xL ลดลง ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ pro-apoptotic protein : Bax เพิ่มสูงขึ้น และยังพบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase 3 และ caspase 9 เพิ่มสูงขึ้น สำหรับการศึกษาใน in vivo พบว่าการฉีด parthenolide ร่วมกับ 5-fluorouracil เข้าทาง intra-peritoneal ใน xenograft mice สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ (18)

Fucoxanthin

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าการรับประทานสาร carotenoid จากผักและผลไม้มีความสัมพันธ์กับการลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง (19) fucoxanthin จัดเป็นสาร carotenoids ที่พบได้บ่อย โดยพบมากกว่า 10% ของสารกลุ่ม carotenoids ทั้งหมดที่ถูกสร้างขึ้นในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งแวดล้อมทางทะเล (20) ซึ่ง fucoxanthin เป็นสารที่มีสีส้ม (orange-colored pigment) คล้ายกับสารจำพวก chlorophylls a, chlorophylls c และ β-carotene ซึ่งพบได้ในสาหร่ายสีน้ำตาล (brown seaweeds) และ diatoms (Bacillariophyta) (21,22) โดย fucoxanthin ถูกแยกออกมาจากสาหร่ายสีน้ำตาลครั้งแรกโดย Willstatter and Page ในปี 1914 (23) โดยกระบวนการดูดซึมและการเปลี่ยนแปลงของ fucoxanthin จะมีผลต่อค่า bioavailability ของสาร มีการศึกษาใน in vivo โดยทำการทดลองในหนู mice พบว่า fucoxanthin จะถูก hydrolyzed อย่างรวดเร็วไปเป็น fucoxanthinol ในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ ภายใน 2 ชั่วโมงหลังการรับประทาน และบางส่วนจะยังคงอยู่ในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในพลาสมาและในตับ จากนั้น fucoxanthinol จะถูกเปลี่ยนเป็น amarouciaxanthin A ซึ่งสามารถพบได้ใน liver microsomes microsomes ของหนู mice (24) สำหรับข้อมูลด้านความปลอดภัยของ fucoxanthin พบว่า เมื่อให้ fucoxanthin (95% purity) ทางปากในหนู rats เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า fucoxanthin ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนู rats (25) นอกจากนี้ fucoxanthinol ซึ่งเป็นสาร metabolites ก็ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่มีความสำคัญ (26)



ภาพที่ 3 แสดง ลักษณะโครงสร้างของ Fucoxanthin และสาร metabolites ของ Fucoxanthin : Fucoxanthinol, Amarouciaxanthin A, Halocynthiaxanthin

จากการศึกษามากมายแสดงให้เห็นว่า fucoxanthin น่าจะมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปพัฒนาเป็นยา เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรค เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพของ fucoxanthin นั้น ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer), ฤทธิ์ป้องกันโรคอ้วน (anti-obecity), ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (anti-diabetic), ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (anti-malarial), ฤทธิ์ป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดสมอง (cardiovascular and cerebrovascular protective effect) และฤทธิ์ป้องกันตับจากสารพิษ (hepatoprotective effect) (27) จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า fucoxanthin สามารถลดการรอดชีวิตของ human colon cancer cell lines ชนิด Caco-2, HT-29 และ DLD-1 cells โดยพบว่า Caco-2 มีความไวต่อ fucoxanthin มากกว่า DLD-2 และ HT-29 ตามลำดับ และยังพบว่า fucoxanthin เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ตามความเข้มข้นของ fucoxanthin ที่สูงขึ้นและเวลาที่มากขึ้น (dose- and time-dependent manner) ในขณะที่ astaxanthin และ β-carotene ซึ่งเป็นสาร carotenoid เช่นเดียวกับ fucoxanthin แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใน Caco-2 cells (28) จากการศึกษาต่อมาของ Kotake-Nara และคณะ ที่ได้ทำการประเมินผลของ

fucoxanthin และ neoxanthin ต่อการรอดชีวิตของ human colorectal carcinoma Caco-2, human colorectal adenocarcinoma HCT116, mouse melanoma B16, human normal embryonic lung fibroblast MRC-5 และ human male umbilical cord fibroblast HUC-Fm พบว่า fucoxanthin และ neoxanthin ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ที่ใช้ศึกษาเหมือนๆกัน โดยสารทั้งสองชนิด มีประสิทธิภาพในการลดการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HCT116 มากกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆและเซลล์ปกติ (normal cell) (29) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Das และคณะแสดงให้เห็นว่า fucoxanthin ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ human colon cancer cell lines ชนิด WiDr และ HCT116 cells โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งการดำเนินของวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G0/G1 ผ่านทางการเพิ่มการแสดงออกของ cyclin-dependent kinase inhibitory protein p21WAF1/Cip1 และ retinoblastoma protein (pRB) (30) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ fucoxanthin และ fucoxanthinol ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ DLD-1, HCT116, SW620, Caco-2, colo205, WiDr และศึกษาความไวของชิ้นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อ fucoxanthin และ fucoxanthinol โดยใช้เทคนิค collagen-gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) ผลการศึกษาพบว่า fucoxanthin และ fucoxanthinol สามารถลดค่า T/C (%) values ทั้งใน colon cancer cell lines และ colorectal cancer specimens ซึ่งเป็นไปได้ว่าการใช้ยาต้านมะเร็งร่วมกับ fucoxanthin และ fucoxanthinol อาจจะมีส่วนช่วยเพิ่มการตอบสนองของผู้ป่วยต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ fucoxanthin และ fucoxanthinol มากขึ้น เพื่อจะใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป (31) การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในปัจจุบัน หลายครั้งที่การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องมาจากการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา ดังนั้นการค้นหาสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา เป็นที่ทราบกันว่าสาหร่ายสีน้ำตาล ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารแคโรทีนอยด์ fucoxanthin ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีการศึกษาก่อนหน้าที่ได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin เพียงสารเดียวและทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HCT116 และ HT-29 เปรียบเทียบกับการตอบสนองในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ปกติชนิด CCD-18Co โดยศึกษาผลต่อการรอดชีวิต, การเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลาย DNA และการตายของเซลล์ โดยทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay, comet assay, nuclear condensation assay และ western blot ยา 5-fluorouracil สามารถลดการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด HCT116 และ HT29 ตามความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้มีพิษใน CCD-18Co ยา 5-fluorouracil ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลาย DNA ใน HCT116 ด้วยการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ แต่ไม่พบว่าทำให้เกิดการทำลาย DNA และการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 สาร fucoxanthin เพียงสารเดียวยังลดการรอดชีวิตในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด แต่ไม่พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด CCD-

18Co ยกเว้นสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μM ที่ลดการรอดชีวิตของเซลล์โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลาย DNA เมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 10 μM ในเซลล์มะเร็งชนิด HCT116 และ HT-29 สามารถเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของยา 5-fluorouracil และไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ใน CCD-18Co ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร fucoxanthin เพียงสารเดียวสามารถลดการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ และเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil สามารถเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารนี้อาจจะเป็นสารใหม่ที่นำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็งต่อไป (32) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในมะเร็งปอด พบว่าสาร fucoxanthin มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมถึง non-small cell lung cancer แต่กลไกของสาร fucoxanthin ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงกลไกระดับ molecular และศึกษาใน in vivo โดยใช้เทคนิค Flow cytometry, real-time PCR, western blotting และ immunohistochemistry ผลการศึกษาพบว่าสาร fucoxanthin สามารถยับยั้งวัฏจักรของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ p53, p21, Fas, PUMA, Bcl-2 และ caspase-3/8 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาร fucoxanthin เพื่อนำมาใช้ในการรักษามะเร็งชนิด non-small cell lung cancer (33) สาร fucoxanthin เป็นสารที่พบมากในสาหร่ายและมีประสิทธิภาพในการพัฒนามาเป็นยารักษามะเร็ง เนื่องจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสาร fucoxanthin ต่อการเกิด apoptosis, การเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์เนื้องอกไกลโอมา ผลการศึกษาพบว่าสาร fucoxanthin มีความเป็นพิษต่อ human glioma cancer cell ชนิด U86 และ U251 แต่ไม่มีผลต่อเซลล์สมองปกติ และสาร fucoxanthin ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากการย้อม chromatin ที่เข้มขึ้น โดยใช้เทคนิค Hoechest 33342 และสามารถลด mitochondrial membrane potential จากการย้อมด้วยวิธี DIOC6(3) staining และเห็นการเกิด apoptosis มากขึ้น เมื่อย้อมด้วย annexin V-FITC/SYTOX Green double staining ใน U87 และ U251 cell และยังศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค Transmission electron microscopy และ western blotting เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ใน U87 cell และใช้เทคนิค scratch wound healing assay และการแสดงออกของ matrix metalloproteinases (MMPs) และ trans-well assay เพื่อใช้ตรวจสอบการเคลื่อนที่และการลุกลาม โดยพบการแสดงออกของ Akt/mTOR และ p38 pathways จากการทดสอบเซลล์ U87 และ U251 ด้วยสาร fucoxanthin นอกจากนี้ fucoxanthin ยังลดน้ำหนักและปริมาตรของ glioma mass ของ U87 cell ในหนู nude mice จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของ fucoxanthin ในการเพิ่ม apoptosis และลดการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งได้ ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า fucoxanthin เพิ่มการตายของเซลล์แบบ apoptosis และสามารถลดการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่และการลุกลามผ่านทางการลด Akt/mTOR และ p38 ใน human glioblastoma cell (34) สาร Fucoxanthin เป็นสารแคโรทีนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติ แต่ยังไม่เคยมี

การศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสารนี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งใน human gastric adenocarcinoma SGC-7901 หรือ BGC-823 การศึกษานี้พบว่าสาร fucoxanthin สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ผ่านทาง JAK/STAT signal pathway ในเซลล์ชนิดนี้ โดยพบว่า fucoxanthin สามารถเพิ่มจำนวนของ apoptotic cells อย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้เทคนิค propidium iodide (PI) dye staining และ flow cytometry สาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 50 หรือ 75 μM เหนี่ยวนำให้วัฏจักรของเซลล์ SGC-7901 หยุดอยู่ในระยะ S phase และ BGC-823 หยุดอยู่ในระยะ G2/M ผลการทดลองจากการทำ RT-PCR และ western blot analysis พบว่า fucoxanthin ลดการแสดงออกของ Mcl-1, STAT3 และ p-STAT3 ตามความเข้มข้นของ fucoxanthin ที่เพิ่มขึ้น การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นถึงผลของ fucoxanthin ต่อ SGC-7901 และ BGC-823 cells โดย fucoxanthin สามารถเหนี่ยวนำให้วัฏจักรของเซลล์หยุดและเกิด apoptosis ซึ่งเป็นผลมาจากการลดการแสดงออกของ Mcl-1, STAT3 and p-STAT3 งานนี้จึงทำให้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกของสาร fucoxanthin ต่อ human gastric adenocarcinoma และแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของยาที่เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติทางทะเล (35)

กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis)

กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน มีจุดเริ่มต้นจากเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถเคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่เกิดมะเร็ง หรือ primary tumor และเกิดการจับหรือยึดเกาะในบริเวณอื่นๆของร่างกาย ภายหลังการเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น ทำให้ผู้ป่วยสามารถเกิดมะเร็งในบริเวณอื่นอวัยวะอื่นหรือตำแหน่งที่อยู่ห่างไกลออกไป ซึ่งเรียกว่า secondary site of tumor โดยกระบวนการ metastasis สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ ได้แก่

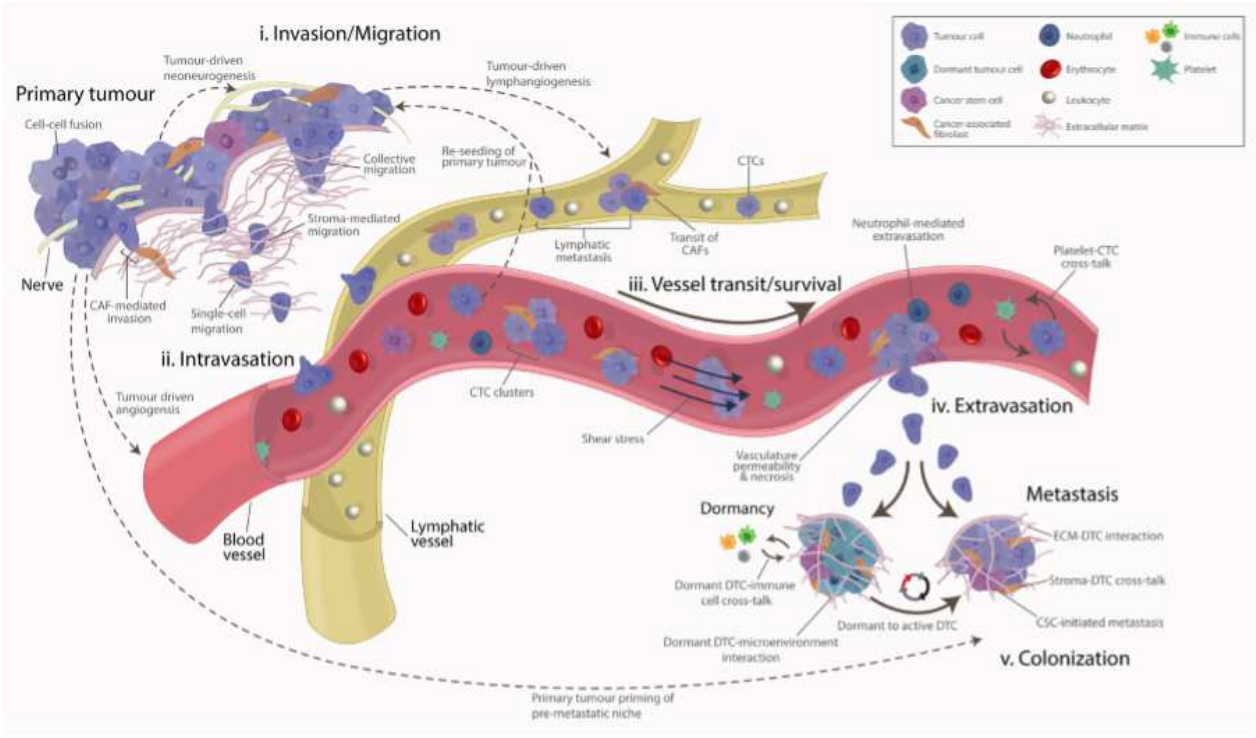
(i) การเคลื่อนที่และการลุกลามไปยังตำแหน่งที่ใกล้กับจุดเริ่มต้นก่อกำเนิดมะเร็ง (invasion/migration at/near the primary tumour)

(ii) เคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือด เพื่อไปที่ระบบหลอดเลือดและน้ำเหลืองในร่างกาย (intravasation into the local blood and lymphatic vessels)

(iii) การรอดชีวิตและการคงอยู่ของเซลล์มะเร็งในระบบไหลเวียนน้ำเหลือง (survival and transit of cancer cells in the circulation/ lymphatics)

(iv) การอยู่และการเคลื่อนที่ออกจากหลอดเลือด เพื่อไปยังตำแหน่งอื่น หรือบริเวณที่สองที่สามารถเกิดมะเร็งได้ (arrest and extravasation at secondary sites)

(v) การอยู่รอดในตำแหน่งที่เคลื่อนที่เข้าไปอาศัย (overt colonisation of secondary sites)



ภาพที่ 4 แสดงกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อไปเจริญเติบโตยังตำแหน่งอื่นหรือบริเวณอื่นในร่างกาย (36)

กระบวนการในระดับเซลล์ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการกระตุ้นกระบวนการ metastasis คือ การกระตุ้นกลไกในระดับเซลล์เพื่อส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่ยึดเกาะ โดยเป็นกระบวนการกระตุ้นการเคลื่อนที่ การยึดเกาะและการทำลายส่วนของ extracellular matrix (ECM) และทำให้เซลล์มี cell–cell adhesions น้อยลง เพื่อส่งเสริมการหลุดออกจากบริเวณ epithelial โดยกระบวนการลุกลามของเซลล์มะเร็งเริ่มเกิดขึ้นและคงตัวโดย signalling pathways (ได้แก่ coordinated activity ของ RhoGTPases RhoA, Rac1, และ Cdc42) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุม cytoskeletal dynamics ในเซลล์มะเร็ง และมีผลเปลี่ยนแปลง cell–ECM and cell–cell junctions เพื่อยินยอมให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อโดยรอบ (surrounding tissue) โดยกระบวนการนี้มีการเปลี่ยนแปลงสูงมากเป็นผลมาจาก intrinsic และ extrinsic factors นอกจากนี้ยังมีกระบวนการ epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) โดยมี SNAIL, TWIST, ZEB, และ transcription factor families อื่นๆ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ โดยมีบทบาทสำคัญในแง่ของ stem like และ motile/migratory phenotype ผ่านทางการสัมพันธ์ (interaction) กับ signalling pathways เช่น Hippo pathway (36)

เอนไซม์ matrix metalloproteinase

เอนไซม์ matrix metalloproteinase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม zinc-dependent endopeptidases มีความสามารถในการทำลายส่วนประกอบของ extracellular matrix (ECM) ซึ่งส่วนของ extracellular

matrix เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญในการช่วยควบคุมการส่งสัญญาณทั้งในเซลล์และนอกเซลล์, การยึดเกาะและการลุกลามของเซลล์ โดยเซลล์มะเร็งจะเคลื่อนที่และจับกับส่วนของ extracellular matrix และเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (remodeling) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อเซลล์มะเร็งในการเคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่เกิดก้อนมะเร็ง (primary tumor) โดยลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ชนิดนี้จะประกอบด้วยส่วนของ pro-peptide, catalytic domain, hemopexin-like C terminal domain และ hinge region ซึ่งเชื่อมโยงกับตำแหน่ง catalytic site ด้วย hemopexin domain ซึ่งเอนไซม์นี้เมื่อถูกหลั่งออกมาจะอยู่ในรูป zymogens ที่ไม่สามารถทำงานได้และต้องอาศัยกระบวนการตัดย่อย (proteolytic) โดยมีการดึงหมู่ cysteine residue ซึ่งจับกับ zinc ion ออกจากบริเวณ active site ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์นี้ (37, 38) Matrix metalloproteinase (MMP) -2 และ 9 หรือเอนไซม์ gelatinase มีความสามารถในการทำลายองค์ประกอบของ extracellular matrix ได้แก่ collagen type IV และ gelatin มีการศึกษาในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่เพิ่มสูงขึ้นกับอาการของผู้ป่วยที่แย่ลง โดยพบระดับของเอนไซม์ MMP-2 ที่สูงขึ้นในพลาสมาจะพบได้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (39) มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าระดับของ MMP ที่สูงขึ้นในซีรั่มเปรียบเสมือนเป็น marker สำคัญของการลุกลามของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยพบระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในซีรั่มของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ (40) นอกจากนี้พบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ MMP-9 ในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งรังไข่, มะเร็งตับอ่อน, มะเร็งปอด, มะเร็งที่สมองและมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (41) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ MMP จะมีความสำคัญอย่างมากในการลดการเคลื่อนที่และลุกลามของเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620

- เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ใน flask T25 ใน RPMI-1640 medium ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator โดยเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดสอบต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 95% จากการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี 0.4% trypan blue

2.การศึกษาผลของ fucoxanthin ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT colorimetric assay

2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ใน 96-well plate ที่ density 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator

2.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10, 15, 20, 25, และ 30 μM โดยมี 0.1 % DMSO เป็น negative control

2.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

2.4 เติมสารละลาย MTT reagent ปริมาตร 10 μl ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มเซลล์ต่อภายให้อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

2.6 คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้สูตร

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

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย 0.1% DMSO ใน RPMI-1640 media

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. การศึกษาผลเสริมฤทธิ์ของ fucoxanthin และ 5-fluorouracil ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT colorimetric assay

3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ใน 96-well plate ที่ density 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ใน incubator

3.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10 μM fucoxanthin ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.5, 2.5 μM โดยมี 0.1 % DMSO เป็น negative control

3.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

3.4 เติมสารละลาย MTT reagent ปริมาตร 10 μl ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มเซลล์ต่อภายให้อุณหภูมิ 37˚C, 5% CO_2, 95% humidity ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 nm

3.6 คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้สูตร

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

OD control = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย 0.1% DMSO ใน RPMI media

OD sample = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย fucoxanthin + 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.การศึกษาผลของ fucoxanthin ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค cell invasion assay

4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6-well plate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 ปิเปต media ทิ้ง และเติม fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ fucoxanthin + 5-fluorouracil โดยมี 0.1% DMSO เป็น negative control

4.3 บ่มเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 ทำการ coat invasion chamber ด้วย matrigel เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง

4.5 Trypsinize เซลล์และปิเปตเซลล์ปริมาตร 500 μl ที่จำนวน 500 เซลล์ ลงบน upper chamber ที่วางบน 24-well plate ในขณะที่ด้านล่างของ chamber จะประกอบด้วย RPMI-1640 media ที่มี 10 % FBS ปริมาตร 500 μl

4.6 บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.7 นำเซลล์ที่อยู่ด้านบนของ chamber ออกโดยใช้ cotton swab

4.8 Fix cell ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel ด้วย ice-cold methanol

4.9 ย้อมเซลล์ด้วยสี crystal violet

4.10 นับเซลล์ 25 random fields โดยใช้กล้อง invert microscope

4.11 คำนวณ % proportional invasiveness

5. การศึกษาผลของ fucoxanthin ในการยับยั้งการยึดเกาะในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค cell adhesion assay

5.1 ทำการ coat 96-well plate ด้วย matrigel เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C โดย well ที่ไม่ได้ coat จะใช้เป็น negative control

5.2 เซลล์มะเร็งถูกทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10 μM และที่ความเข้มข้น 10 μM ในสภาวะที่มียา 5-FU ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.5, 2.5 μM

5.3 Seed เซลล์ลงบน 96-well plate ที่ coat ด้วย matrigel เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C

5.4 ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS)

5.5 เซลล์ที่ยึดเกาะกับ matrigel ถูก fix ด้วย cold absolute methanol และย้อมเซลล์ด้วยสี crystal violet เป็นระยะเวลา 5 นาที

5.6 จากนั้นจึงถ่ายรูปเซลล์ที่ยึดเกาะกับ plate และทำการคำนวณ percent cell adhesion

6. การศึกษาผลของ fucoxanthin ต่อการแสดงออกของยีน MMP-9 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค RT-PCR

6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ใน 24-well plate ที่ความหนาแน่น 100,000 เซลล์/well เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 ทดสอบเซลล์ด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10 μM และในสภาวะที่มียา 5-FU ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.5, 2.5 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

6.3 ทำการสกัด total RNA โดยใช้ trizol reagent

6.4 ทำการเปลี่ยน total RNA ไปเป็น cDNA โดยใช้ imProm-II™ reverse transcription system

6.5 cDNA ที่ได้จะถูกใช้เป็น template สำหรับการเพิ่มปริมาณ mRNA โดยการใช้ specific primer MMP-9 : 5’-ACA-CCT-CTG-CCC-TCA-CCA-T-3’ and 5’-TCG-ACT-CTCCAC-GCA-TCT-CT-3’ ; GAPDH : 5’-GAG-AAG-GCT-GGG-GCT-CAT-TT-3’ and 5’-AGT-GATGGC-ATG-GAC-TGT-GG-3’

6.6 นำ PCR products ที่ได้ไปรันบน 1.5% agarose gel electrophoresis

6.7 ทำการย้อมเจลทั้งหมดโดยใช้ ethidium bromide และวัด densities ของ band โดยใช้เครื่อง gel documentation และ image lab™ software

7. การศึกษาผลของ fucoxanthin ในการลดระดับของเอนไซม์ metalloproteinase 9 (MMP-9) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Human MMP-9 ELISA assay

7.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งใน 6-well plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

7.2 ปิเปต media ทิ้ง และ treat เซลล์ด้วย fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ fucoxanthin + 5-fluorouracil เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

7.3 ปิเปตส่วนของ supernatant เก็บใน microcentrifuge tube เพื่อใช้เป็น sample ในการทำ ELISA assay

7.4 เติมสารที่ใช้เป็น standard และ samples ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plates และ incubate ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 90 นาที

7.5 ปิเปต sample ทิ้งและล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer

7.6 เติม Biotin-conjugate solution ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละ well และปิด plate ด้วย adhesive strip

7.7 incubate ที่อุณหภูมิ 37º C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.8 ปิเปต sample ทิ้งและล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer

7.9 เติม streptavidin-HRP ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละ well

7.10 ปิด plate ด้วย adhesive strip และ incubate ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที

7.11 ปิเปต sample ทิ้งและล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer

7.12 เติม substrate solution ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละ well

7.13 incubate ที่อุณหภูมิ 37º C เป็นเวลา 10-20 นาที

7.14 เติม stop solution ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละ well

7.15 วัดค่า OD โดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

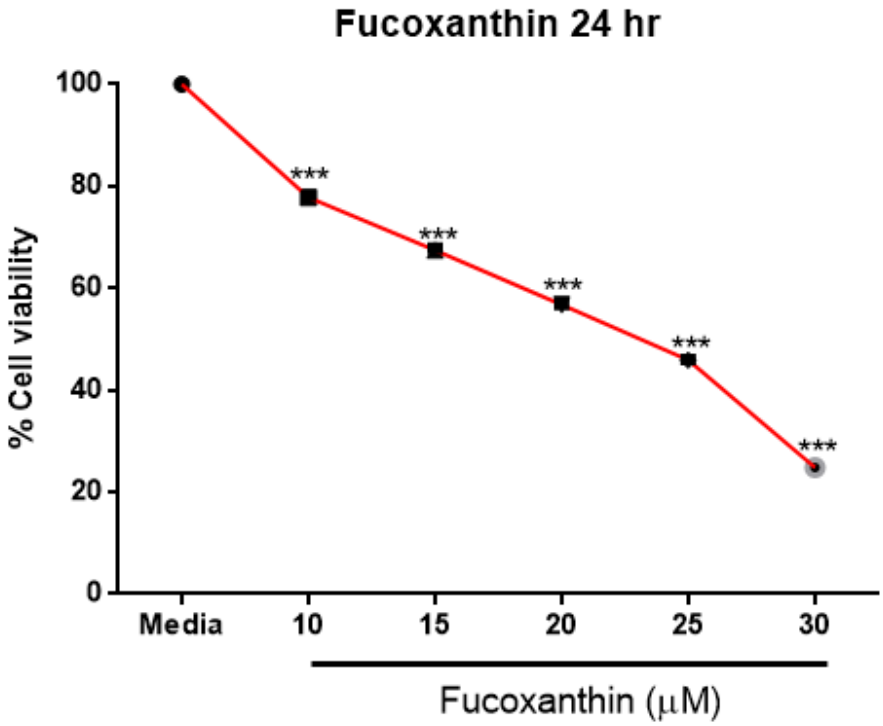
ข้อมูลจะแสดงผลในค่า means ± SEM และทำการวิเคราะห์ผลโดย one-way ANOVA with Tukey's Honestly significant Difference (HSD) post hoc test ค่า *p*-value ที่น้อยกว่า 0.05 จะพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สร้างกราฟผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Graphpad prism software Ver.7.0

บทที่ 4 ผลการวิจัย (Results)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ภายหลังการทดสอบ

ผลการทดสอบจากการทดสอบด้วยวิธี MTT cell viability assay ภายหลังการทดสอบเซลล์มะเร็งด้วย fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 15, 20, 25, 30 µM เป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าสาร fucoxanthin มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตามความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาที่นานขึ้น เซลล์มะเร็งมีความไวต่อสารทดสอบมาก และมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง โดยสาร fucaxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 µM ทำให้เซลล์มะเร็งมีการรอดชีวิตประมาณ 77.82 ± 0.381, 67.48 ± 0.333, 56.79 ± 0.038, 45.89 ± 0.125 และ 24.82 ± 0.039 % ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งมีความไวต่อสารทดสอบ fucoxanthin ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

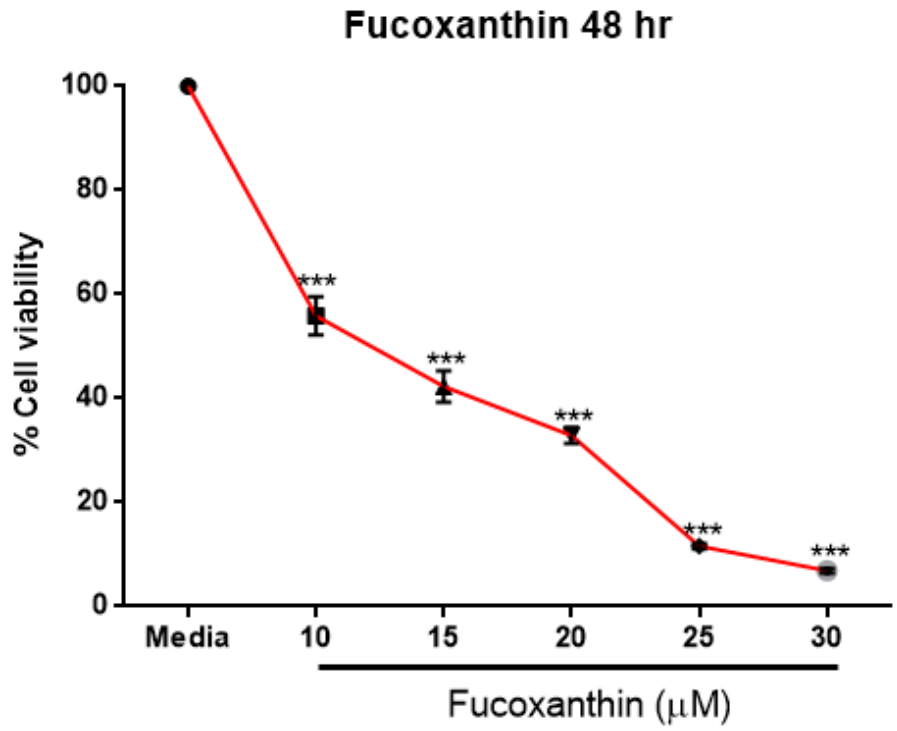
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ที่เวลา 24 ชั่วโมง



Fucoxanthin SW-620 cells	Time 24 hrs			
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 μM	78.12166489	78.27004219	77.05943691	77.82 ± 0.381
Fucoxanthin 15 μM	68.08964781	67.40506329	66.9447341	67.48 ± 0.333
Fucoxanthin 20 μM	56.77694771	56.85654008	56.725756	56.79 ± 0.038
Fucoxanthin 25 μM	46.10458911	45.88607595	45.6725756	45.89 ± 0.125
Fucoxanthin 30 μM	24.75987193	24.89451477	24.81751825	24.82 ± 0.039

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยภายหลังการทดสอบด้วยสารสำคัญ fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์มะเร็งที่รอดชีวิตมีค่าเท่ากับ 55.87 ± 3.723, 42.31 ± 3.019, 32.89 ± 1.523, 11.59 ± 0.519 และ 6.866 ± 0.436 % แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะเวลาที่นานขึ้น เซลล์มะเร็งมีความไวต่อสารทดสอบมากกว่าเมื่อเทียบกับที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบ แสดงว่าระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นน่าจะมีผลกับการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

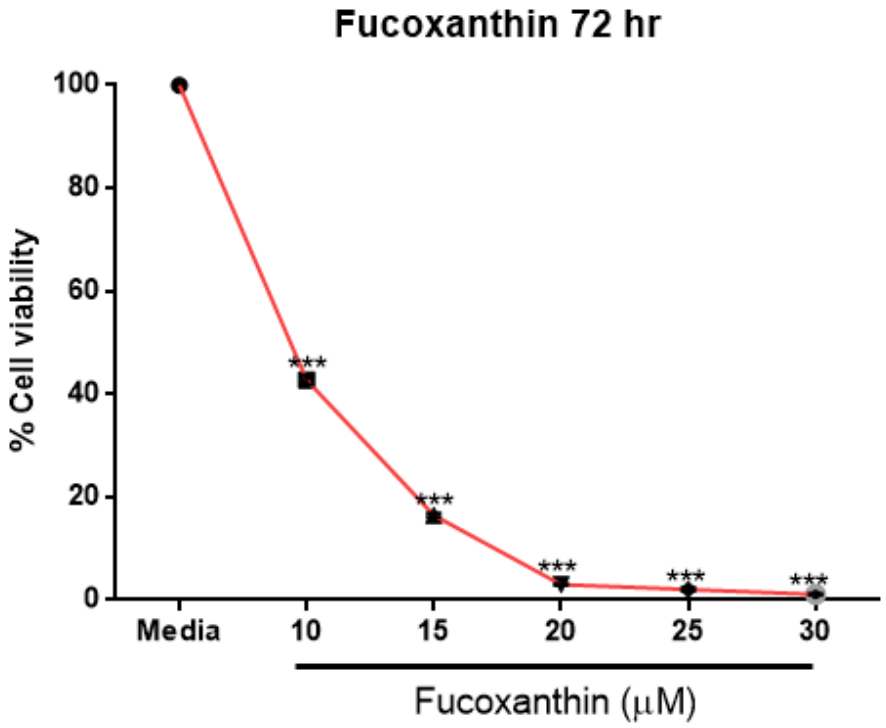


Fucoxanthin	Time 48 hrs			
SW-620 cells				
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 μM	51.46103896	52.88624788	63.27568667	55.87 ± 3.723
Fucoxanthin 15 μM	38.7987013	39.81324278	48.3214649	42.31 ± 3.019
Fucoxanthin 20 μM	30.68181818	32.17317487	35.80874873	32.89 ± 1.523
Fucoxanthin 25 μM	10.71428571	11.54499151	12.51271617	11.59 ± 0.519
Fucoxanthin 30 μM	6.331168831	6.536502547	7.731434385	6.866 ± 0.436

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ที่เวลา 72 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 μM เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 มีความไวต่อสารทดสอบ fucoxanthin ที่มากขึ้น โดยเซลล์มะเร็งมีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 42.75 ± 0.921, 16.46 ± 0.409. 3.016 ± 0.135, 2.089 ± 0.317 และ

1.131 ± 0.069 % แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังการทดสอบในระยะเวลาที่นานขึ้น

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

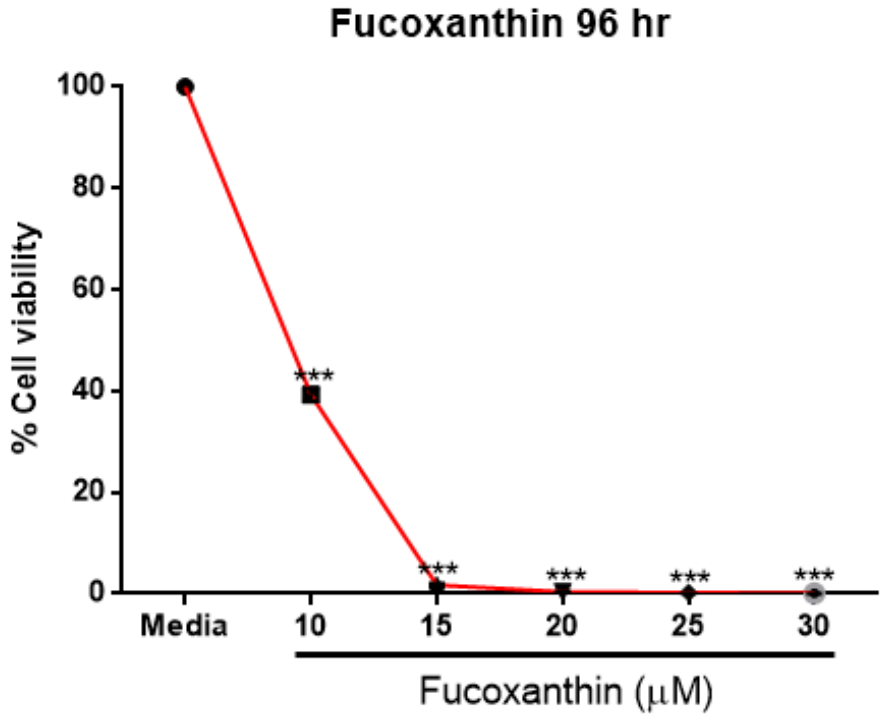


Fucoxanthin	Time 72 hrs			
SW-620 cells				
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 μM	44.12665986	43.12015504	41.00185529	42.75 ± 0.921
Fucoxanthin 15 μM	16.64964249	17.05426357	15.67717996	16.46 ± 0.409
Fucoxanthin 20 μM	3.268641471	2.810077519	2.968460111	3.016 ± 0.135
Fucoxanthin 25 μM	2.553626149	2.228682171	1.484230056	2.089 ± 0.317
Fucoxanthin 30 μM	1.02145046	1.259689922	1.113172542	1.131 ± 0.069

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 มีความไวต่อสารทดสอบที่มากขึ้น เมื่อระยะเวลาที่นานขึ้น เมื่อเทียบกับที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบ ด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20,

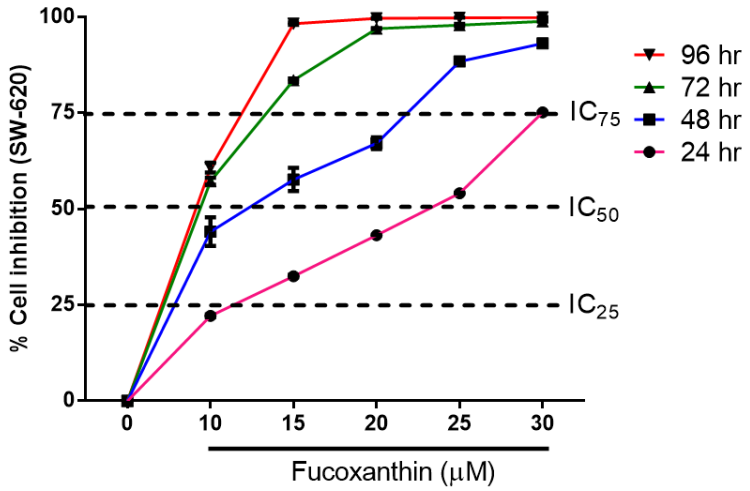
25, 30 µM พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 39.23 ± 1.277, 1.738 ± 0.304, 0.3351 ± 0.129, 0.2046 ± 0.039, 0.089 ± 0.034 % ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยมากหรือเซลล์มะเร็งมีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ที่เวลา 96 ชั่วโมง



Fucoxanthin	Time 96 hrs			
SW-620 cells				
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 µM	41.77350427	38.17097416	37.74703557	39.23 ± 1.277
Fucoxanthin 15 µM	2.243589744	1.192842942	1.778656126	1.738 ± 0.304
Fucoxanthin 20 µM	0.213675214	0.198807157	0.592885375	0.3351 ± 0.129
Fucoxanthin 25 µM	0.128205128	0.228628231	0.256916996	0.2046 ± 0.039
Fucoxanthin 30 µM	0.021367521	0.129224652	0.118577075	0.089 ± 0.034

กราฟแสดงค่า IC_{25}, IC_{50} และ IC_{75} ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

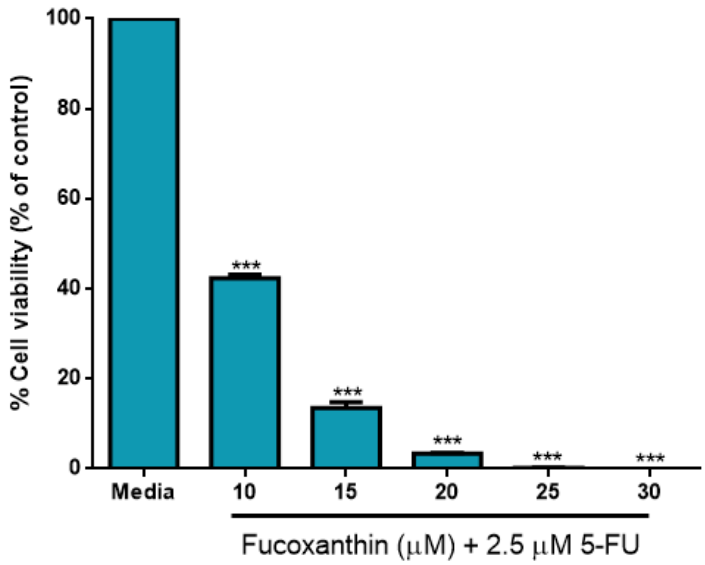


Cell lines (SW-620)	Inhibitory Concentration of fucoxanthin at 25, 50, 75 %		
Times	IC_{25} (µM)	IC_{50} (µM)	IC_{75} (µM)
24	11.29 ± 0.063	21.74 ± 0.0488	32.19 ± 0.035
48	5.891 ± 0.579	13.95 ± 0.510	22.00 ± 0.445
72	2.380 ± 0.111	9.911 ± 0.096	17.44 ± 0.081
96	1.106 ± 0.149	8.674 ± 0.111	16.24 ± 0.072

*** Each values were represented as mean ± SEM from three independent experiments (n=3)

ผลการทดสอบเมื่อให้สาร fucoxanthin ร่วมกับยา 5-fluorouracil ต่อการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay

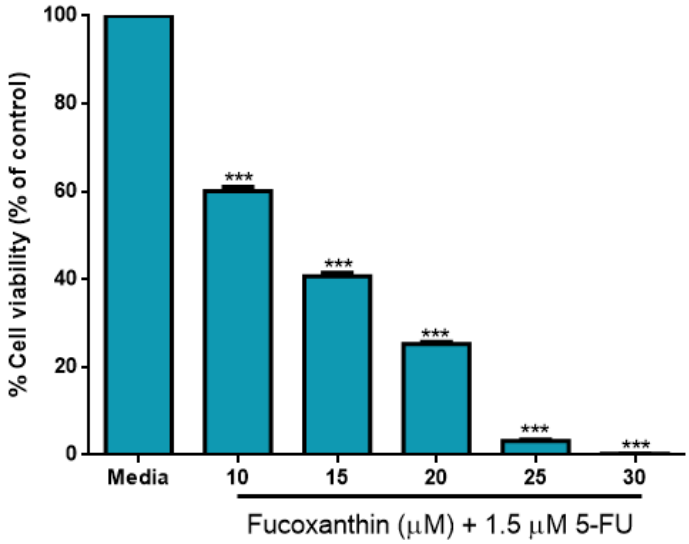
ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสาร Fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-FU ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 µM ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 2.5 µM พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 42.35 ± 0.790, 13.56 ± 1.249, 3.348 ± 0.166, 0.2089 ± 0.041 และ 0.029 ± 0.014 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้พบว่าการทดสอบด้วยสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin หรือ ยา 5-fluorouracil เพียงชนิดเดียว ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิด น่าจะเสริมฤทธิ์กันด้วยกลไกที่ต่างวิถีในการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยประสิทธิภาพของสารทั้ง 2 ชนิดเห็นผลได้อย่างชัดเจนภายหลังการทดสอบ



Fucoxanthin	Time 36 hrs			
SW-620 cells				
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 µM + 2.5 µM 5-FU	43.79844961	42.16757741	41.08003857	42.35 ± 0.790
Fucoxanthin 15 µM + 2.5 µM 5-FU	15.79457364	11.47540984	13.40405014	13.56 ± 1.249

Fucoxanthin 20 µM + 2.5 µM 5-FU	3.100775194	3.278688525	3.664416586	3.348 ± 0.166
Fucoxanthin 25 µM + 2.5 µM 5-FU	0.127906977	0.239526412	0.259402122	0.2089 ± 0.041
Fucoxanthin 30 µM + 2.5 µM 5-FU	0.009689922	0.018214936	0.057859209	0.029 ± 0.014

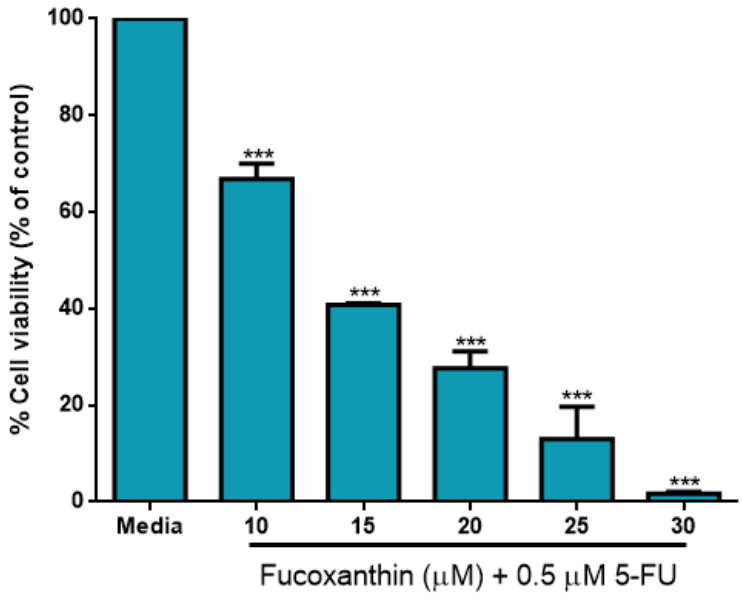
ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสาร Fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-FU ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 µM ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 1.5 µM พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 60.10 ± 0.951, 40.67 ± 0.807, 25.28 ± 0.480, 3.186 ± 0.361 และ 0.233 ± 0.066 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้พบว่าการทดสอบด้วยสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin หรือ ยา 5-fluorouracil เพียงชนิดเดียว ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิด น่าจะเสริมฤทธิ์กันด้วยกลไกที่ต่างวิถีในการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยประสิทธิภาพของสารทั้ง 2 ชนิดเห็นผลได้อย่างชัดเจนภายหลังการทดสอบ



Fucoxanthin	Time 36 hrs			
SW-620 cells				
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0

Fucoxanthin 10 µM + 1.5 µM 5-FU	61.14341085	58.19672131	60.94503375	60.10 ± 0.951
Fucoxanthin 15 µM + 1.5 µM 5-FU	41.27906977	39.07103825	41.65863067	40.67 ± 0.807
Fucoxanthin 20 µM + 1.5 µM 5-FU	26.06589147	24.40801457	25.36162006	25.28 ± 0.480
Fucoxanthin 25 µM + 1.5 µM 5-FU	2.519379845	3.278688525	3.760848602	3.186 ± 0.361
Fucoxanthin 30 µM + 1.5 µM 5-FU	0.11627907	0.236794171	0.347155256	0.233 ± 0.066

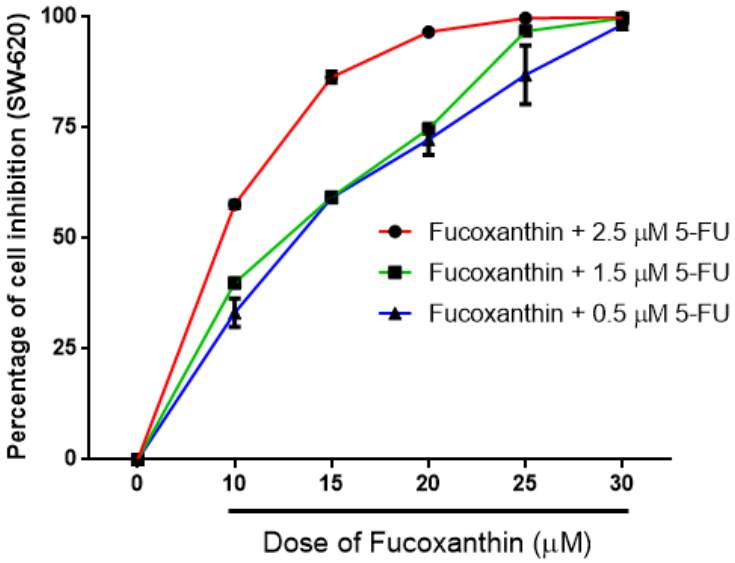
ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสาร Fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-FU ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 µM ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 0.5 µM พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 66.79 ± 3.244, 40.77 ± 0.346, 27.68 ± 3.457, 13.03 ± 6.610 และ 1.701 ± 0.385 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้พบว่าการทดสอบด้วยสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin หรือ ยา 5-fluorouracil เพียงชนิดเดียว ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิด น่าจะเสริมฤทธิ์กันด้วยกลไกที่ต่างวิถีในการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยประสิทธิภาพของสารทั้ง 2 ชนิดเห็นผลได้อย่างชัดเจนภายหลังการทดสอบ



Fucoxanthin	Time 36 hrs

SW-620 cells				
MTT assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 µM + 0.5 µM 5-FU	60.655740	60.655740	60.655740	66.79 ± 3.244
Fucoxanthin 15 µM + 0.5 µM 5-FU	41.080040	41.080040	41.080040	40.77 ± 0.346
Fucoxanthin 20 µM + 0.5 µM 5-FU	23.240120	23.240120	23.240120	27.68 ± 3.457
Fucoxanthin 25 µM + 0.5 µM 5-FU	2.217936	2.217936	2.217936	13.03 ± 6.610
Fucoxanthin 30 µM + 0.5 µM 5-FU	1.157184	1.157184	1.157184	1.701 ± 0.385

กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆของสาร fucoxanthin และ 5-fluorouracil



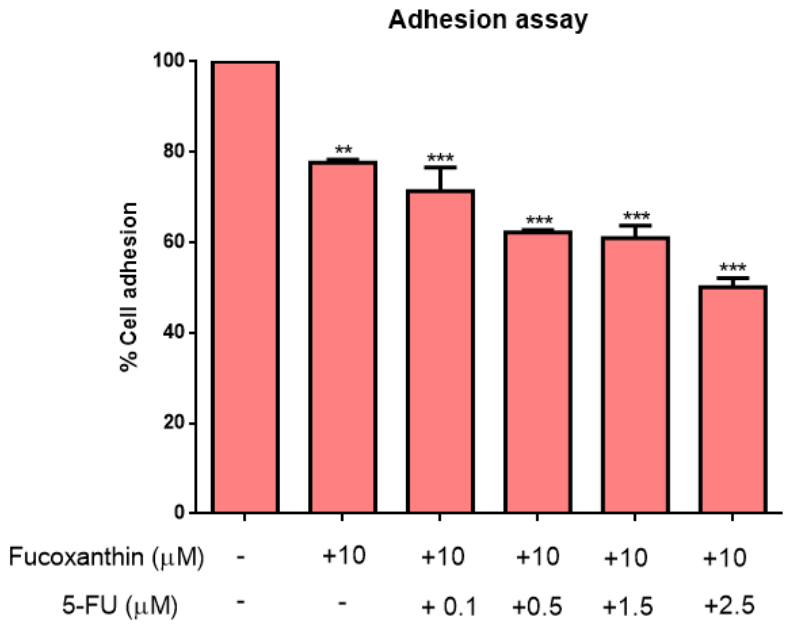
Cell lines (SW-620)	**Inhibitory Concentration of Fucoxanthin + 5-FU at 25, 50, 75 %**		
Times 36 hr	IC_{25} (µM)	IC_{50} (µM)	IC_{75} (µM)

Fucoxanthin + 2.5 µM 5-FU	2.288 ± 0.124	9.735 ± 0.101	17.18 ± 0.082
Fucoxanthin + 1.5 µM 5-FU	6.057 ± 0.138	13.27 ± 0.115	20.49 ± 0.093
Fucoxanthin + 0.5 µM 5-FU	6.741 ± 0.355	14.21 ± 0.540	21.68 ± 0.745

*** Each values were represented as mean ± SEM from three independent experiments (n=3)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells เมื่อทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10 µM เพียงชนิดเดียว และทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.5, 1.5 และ 2.5 µM พบว่าความสามารถของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin เพียงชนิดเดียว โดยเปอร์เซ็นต์เซลล์ยึดเกาะ มีค่าเท่ากับ 77.61 ± 0.712, 71.37 ± 5.224, 62.24 ± 0.505, 60.94 ± 2.756 และ 50.12 ± 1.984 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเซลล์เท่ากับ 100.0 ± 0 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดน่าจะออกฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิด ในการออกฤทธิ์ร่วมกัน ซึ่งอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ adhesion โดยอาจจะมีต่อการแสดงออกของโปรตีนหรือความเสถียรในการยึดเกาะของเซลล์มะเร็ง

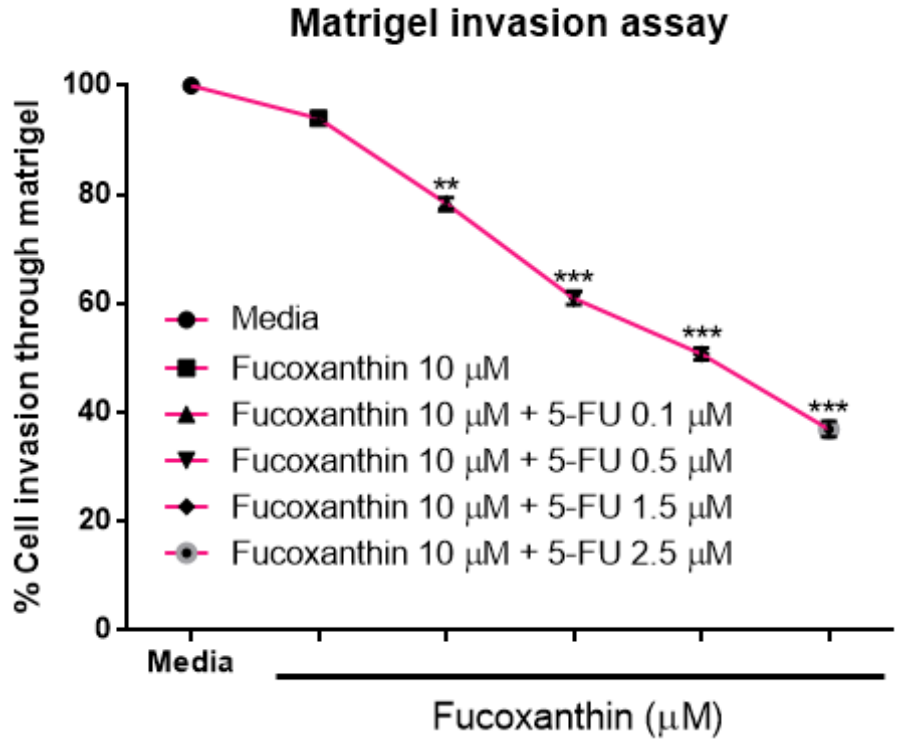


Fucoxanthin SW-620 cells	Time 24 hrs			
Adhesion assay	% Cell viability 1	% Cell viability 2	% Cell viability 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 µM	78.75000	77.77777778	76.30057803	77.61 ± 0.712
Fucoxanthin 10 µM + 0.1 µM 5-FU	78.75000	74.07407407	61.2716763	71.37 ± 5.224

Fucoxanthin 10 μM + 0.5 μM 5-FU	62.50000	62.96296296	61.2716763	62.24 ± 0.505
Fucoxanthin 10 μM + 1.5 μM 5-FU	64.37500	62.96296296	55.49132948	60.94 ± 2.756
Fucoxanthin 10 μM + 2.5 μM 5-FU	53.75000	46.91358025	49.71098266	50.12 ± 1.984

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักผ่านชั้น matrigel ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

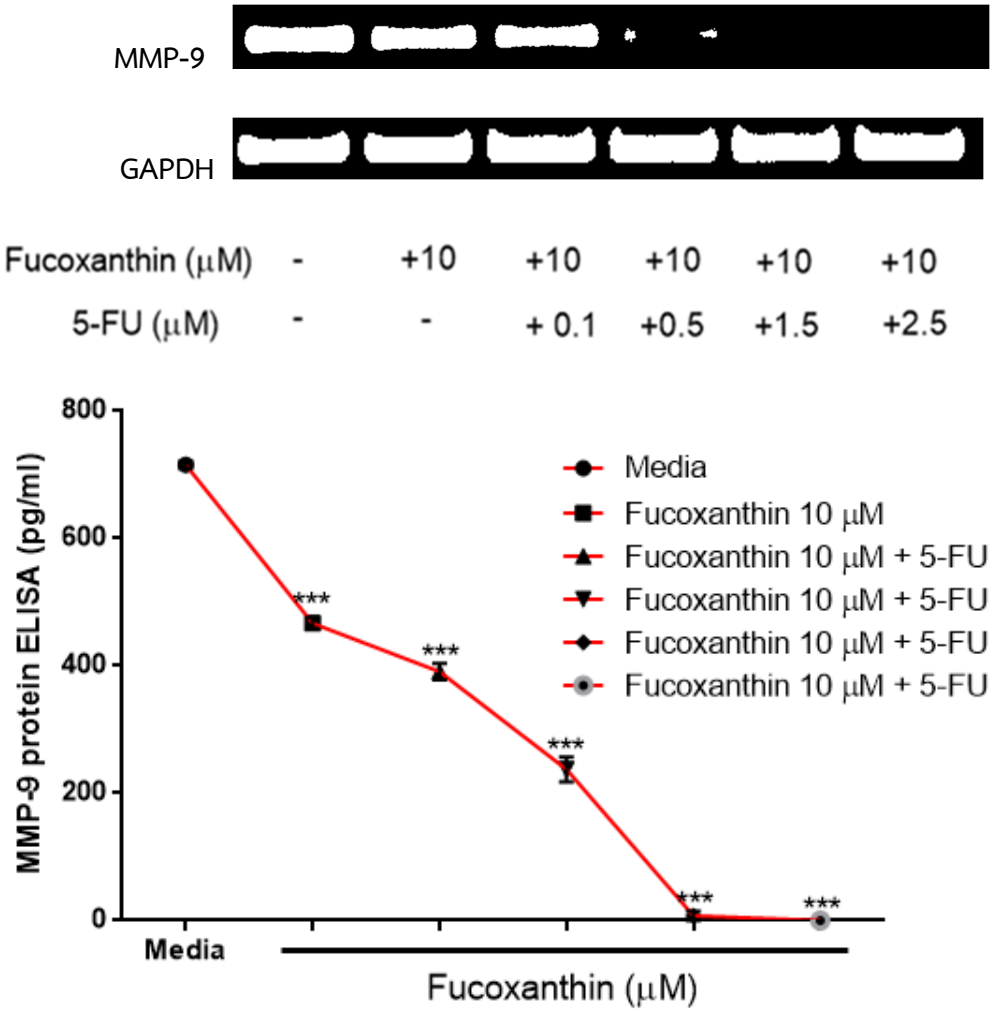
ผลการทดลองจากการทำ matrigel invasion assay พบว่าเมื่อทดสอบร่วมกันระหว่าง fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10 μM ร่วมกับยา 5-FU ที่เพิ่มความเข้มข้นเรื่อยๆตั้งแต่ 0.1, 0.5, 1.5, 2.5 μM พบว่าจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านชั้น matrigel-invasion layer ลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel มีค่าเท่ากับ 93.99 ± 0.530, 78.40 ± 1.002, 61.01 ± 1.200, 50.76 ± 1.123 และ 36.95 ± 1.458 % แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิด เมื่อทดสอบร่วมกับให้ผลเป็น synergistic effect ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงตรวจสอบผลของสาร Fucoxanthin ร่วมกับยา 5-FU ในระดับยีนและโปรตีน เพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งการลุกลามผ่านทางการลดการแสดงออกของ matrix metalloproteinase 9 ในเซลล์มะเร็ง



Fucoxanthin	Time 72 hrs			
SW-620 cells				
Matrigel invasion assay	Average 1	Average 2	Average 3	Mean ± SEM
Media	100	100	100	100.0 ± 0
Fucoxanthin 10 μM	95.00000	93.2038835	93.77990431	93.99 ± 0.530
Fucoxanthin 10 μM + 0.1 μM 5-FU	80.00000	78.6407767	76.55502392	78.40 ± 1.002
Fucoxanthin 10 μM + 0.5 μM 5-FU	63.00000	61.16504854	58.85167464	61.01 ± 1.200
Fucoxanthin 10 μM + 1.5 μM 5-FU	53.00000	49.51456311	49.76076555	50.76 ± 1.123
Fucoxanthin 10 μM + 2.5 μM 5-FU	39.50000	36.89320388	34.44976077	36.95 ± 1.458

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนของสาร fucoxanthin เมื่อให้ร่วมกับยา 5-fluorouracil ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักผ่านชั้น matrigel ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองจากการทำ ELISA assay เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบพบว่าปริมาณโปรตีนที่พบใน supernatant ของเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสาร fucoxanthin ทั้งที่ทำการทดสอบเพียงสารเดียวสามารถลดระดับเอนไซม์ MMP-9 ลงจาก 709.61 µg/ml มาที่ 475.76 µg/ml หรือเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-FU สามารถลดระดับเอนไซม์ MMP-9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่หรือการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง



Serum MMP-9 protein	Media	Fucoxanthin 10 µM			
		-	+ 5-FU 0.1 µM	+ 5-FU 0.5 µM	+ 5-FU 1.5 µM	+ 5-FU 2.5 µM
Mean	715.8	466.9	391.2	237.5	7.50	0.0

SEM	6.155	8.850	13.080	19.770	7.500	0.000

Fucoxanthin SW-620 cells	Time 48 hrs				
MMP ELISA assay	OD1	OD2	OD3	Average	MMP-9 proteins content
Media	1.036	1.071	1.073	1.06	709.61
Fucoxanthin 10 μM	0.742	0.762	0.764	0.756	475.769
Fucoxanthin 10 μM + 0.1 μM 5-FU	0.62	0.624	0.643	0.629	378.077
Fucoxanthin 10 μM + 0.5 μM 5-FU	0.473	0.472	0.473	0.472666667	257.3
Fucoxanthin 10 μM + 1.5 μM 5-FU	0.137	0.162	0.172	0.157	15
Fucoxanthin 10 μM + 2.5 μM 5-FU	0.016	0.026	0.027	0.023	0

Fucoxanthin SW-620 cells	Time 48 hrs				
MMP ELISA assay	OD1	OD2	OD3	Average	MMP-9 proteins content
Media	1.067	1.067	1.094	1.076	721.92
Fucoxanthin 10 μM	0.752	0.721	0.726	0.733	458.07
Fucoxanthin 10 μM + 0.1 μM 5-FU	0.701	0.647	0.642	0.663333333	404.23
Fucoxanthin 10 μM + 0.5 μM 5-FU	0.43	0.42	0.412	0.420666667	217.769
Fucoxanthin 10 μM + 1.5 μM 5-FU	0.124	0.126	0.12	0.123333333	0
Fucoxanthin 10 μM + 2.5 μM 5-FU	0.017	0.012	0.026	0.018333333	0

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก จัดเป็นโรคที่สำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งและมีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งและการกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำภายหลังการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดหรือยาที่ใช้ยับยั้งการดำเนินของโรคมะเร็ง ปัจจุบันปัญหาที่เกิดขึ้นจากการรักษา อันเนื่องมาจากการดื้อต่อยาเคมีบำบัด การใช้ยาแล้วไม่ได้ประสิทธิภาพในการรักษา หรือแม้แต่ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา ทำให้ในปัจจุบันประสบกับปัญหาการรักษาที่ไม่ได้ผลหรือได้ผลดีไม่เท่าที่ควร ทำให้ต้องใช้ยาหลายขนานหรือยาหลายชนิดร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์กันในการรักษา โดยในปัจจุบันการมีแนวทางการรักษามะเร็งโดยใช้สูตรยาเคมีบำบัดโดยใช้ยาหลายตัวร่วมกัน ทำให้ผลการรักษาดีขึ้น หรือผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตที่มากขึ้นหรือลดอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็ง และสามารถลดการแพร่กระจายและการดำเนินของโรคมะเร็ง หรือลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด โดยการวิจัยสมุนไพรมากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้การรักษามะเร็งในปัจจุบันดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพร หรือสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในปัจจุบันก็ยังเป็นที่สนใจและนิยมทำวิจัย เพื่อดูประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับยาเคมีบำบัด ที่ใช้เป็นยามาตรฐานหรือยาเริ่มต้นสำหรับการรักษามะเร็ง ทำให้ในปัจจุบันมีงานวิจัยออกมาอย่างแพร่หลาย ถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่ได้จากสมุนไพรหรือแม้กระทั่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้มาจากสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยยา 5-fluorouracil เป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในปัจจุบันและยังคงใช้กันอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากได้ผลในการรักษาที่ดีและมีผลข้างเคียงไม่มาก ทำให้ยานี้ถูกนำไปใช้เป็นยาร่วมสำหรับการรักษามะเร็ง ในรูปแบบสูตรยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษา แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโดยการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดขนาดของยาเคมีบำบัดลง น่าจะมีส่วนช่วยให้ผู้ป่วยได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษามะเร็งน้อยลงและชะลออัตราการดื้อยาหรือการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งภายหลังการรักษาในระยะเวลาไม่กี่ปี รวมถึงชะลอการประสบปัญหาการดื้อต่อการรักษาหรือการเกิดการรักษาที่ไม่เป็นผลสำเร็จ และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ เนื่องจากไม่สามารถชะลอการดำเนินของโรคมะเร็งที่พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะศึกษาถึงสารสำคัญที่มีอยู่ในธรรมชาติ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการรักษามะเร็ง

สาร fucoxanthin เป็นสาหร่ายที่พบได้ทั่วไป มีสีส้มได้มาจาก brown seaweeds โดยสาร fucoxanthin จัดเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ลดเบาหวาน และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของสาร fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งผ่านทางการยับยั้งกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต แบ่งตัว รวมถึงขั้นตอนสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ถูกตรวจสอบโดยเทคนิค MTT cell viability assay ภายหลังการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 15, 20, 25 และ 30 μM เป็นระยะเวลา 24,

48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 cells มีความไวต่อต่อสารทดสอบ fucoxanthin ตามความเข้มข้นของสาร fucoxanthin และระยะเวลาที่บ่มภายหลังการทดสอบที่นานขึ้น โดยค่า inhibitory concentration ที่ 50 % (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีค่าเท่ากับ 21.74 ± 0.0488, 13.95 ± 0.510, 9.911 ± 0.096 และ 8.674 ± 0.111 ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งค่า IC_{50} มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด ภายหลังการทดสอบ แสดงว่าสาร fucoxanthin มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ เมื่อทำการทดลองศึกษาต่อในวิธี drug combination assay พบว่า เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งด้วยสาร fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 μM ร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.5 และ 2.5 μM เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งมีการตอบสนองที่ดี เมื่อทดสอบด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน โดยค่า IC_{50} ภายหลังการทดสอบ ด้วยสาร fucoxanthin + 2.5 μM 5-fluorouracil มีค่าเท่ากับ 9.735 ± 0.101 μM ส่วนการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin + 1.5 μM 5-fluorouracil และ fucoxanthin + 0.5 μM 5-fluorouracil มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.27 ± 0.115 μM และ 14.21 ± 0.540 μM ผลการทดสอบจะเห็นได้ว่า เมื่อทดสอบร่วมกันสามารถลดขนาดของยา 5-fluorouracil ได้ และเซลล์มะเร็งมีความไวต่อสารทดสอบมากขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิด สามารถเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์สำหรับการนำไปใช้ในการศึกษาทดลองต่อไปในสัตว์ทดลอง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลในการรักษากับ ยาที่ใช้เป็นยาร่วมกันในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งพบว่า เมื่อทดสอบด้วยสาร fucoxanthin เพียงอย่างเดียว และทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.5, 1.5 และ 2.5 μM พบว่าสามารถลดการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งกับชั้น matrigel ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบใน matrigel invasion assay พบว่า สาร fucoxanthin และ fucoxanthin เมื่อทดสอบร่วมกับยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่ำมาก สามารถลดการลุกลามของเซลล์มะเร็งผ่านชั้น matrigel ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าจำนวนของเซลล์มะเร็งที่เคลื่อนที่ผ่านชั้น matrigel มีปริมาณลดลงตามลำดับ คือ 93.99, 78.40, 61.01,50.76 และ 36.95 % เมื่อนำมาคำนวณสัดส่วนของเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านชั้น matrigel เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือ เปอร์เซ็นต์ proportional invasiveness จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร fucoxanthin อาจจะใช้เป็นสารที่ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้

Matrix metalloproteinase 9 หรือ MMP-9 จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ เนื่องจากในปัจจุบันจะใช้เป็น marker สำหรับตรวจวัดเพื่อดูความสามารถในการแพร่กระจายของก้อนมะเร็งไปยังบริเวณอื่นในร่างกาย โดยระดับเอนไซม์ที่เพิ่มสูงขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับอาการที่แย่ลงในผู้ป่วยและระดับการตอบสนองต่อ

การรักษาในผู้ป่วยมะเร็ง โดยในผู้ป่วยมะเร็งจะพบว่ามีระดับของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับคนปกติ จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าสาร fucoxanthin เพียงสารเดียวและเมื่อทดสอบร่วมกับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ได้แก่ 0.1, 0.5, 1.5 และ 2.5 μM สามารถลดการแสดงออกของยีน MMP-9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการตรวจวัดระดับเอนไซม์ MMP-9 ใน cell supernatant ภายหลังการทดสอบด้วยสาร fucoxanthin และยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.5, 2.5 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-9 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมื่อทดสอบด้วยสารเพียงชนิดเดียวและ เมื่อทดสอบร่วมกับยามาตรฐาน 5-fluorouracil สามารถลดระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน MMP-9 ได้อย่างมีนัยสำคัญ เป็นไปได้ว่าสารทั้ง 2 ชนิด อาจมีผลการการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase อื่นๆ หรือ biomarker อื่นๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการลุกลามและขั้นตอนสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจจะต้องมีการตรวจสอบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารทั้ง 2 เพิ่มมากขึ้น เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล อีกทั้งยังมีประโยชน์ต่อสำหรับการศึกษาต่อในทางการแพทย์ เพื่อดูประสิทธิภาพของสารทั้ง 2 ชนิด ต่อไป

ผลการทดลอง/ผลการวิจัยที่ได้ทั้งหมด

ผลการศึกษาที่ได้ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร fucoxanthin มากขึ้น และทราบเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าว ในด้านฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ผ่านทางการลดการรอดชีวิต รวมถึงฤทธิ์อื่นๆ ในด้านของการยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลาม และยังมีผลต่อเนื่องในด้านการยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีประโยชน์กับผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะแพร่กระจาย และยังเป็นการส่งเสริมการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ในท้องทะเล รวมถึงประโยชน์ด้านอื่นๆที่จะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมะเร็งที่เข้ารับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดต่อไป

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

การวิจัยในขั้นต่อไป อาจตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร fucoxanthin เพิ่มเติม เพื่อทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งมะเร็งมากขึ้น โดยอาจทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งเพิ่มเติม ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะมีประโยชน์สำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไป เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น ทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ สำหรับการประยุกต์ใช้นั้น อาจจะต้องรวบรวมข้อมูลถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา รวมถึงข้อมูลด้านความปลอดภัยของสาร fucoxanthin เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แน่นอนและเชื่อถือได้สำหรับการศึกษาต่อยอด เพื่อเพิ่มพูนการนำสารชนิดนี้ไปใช้ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยก่อนที่จะนำไปใช้ได้จริงต้องตรวจสอบเพื่อหาขนาดของสารหรือยาที่เหมาะสม รวมถึงรูปแบบของการให้ยาร่วมกับยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil ก่อน

ผลผลิต (Output)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

- Manmuan S, Manmuan P. (2018) Fucoxanthin inhibit cell proliferation and affecting invasion ability in SW-620 colorectal cancer cells. The 5th Joint Symposium of Thammasat University, BK21 PLUS of CUK and National Defense Medical Center. November 9th-10th, 2018 Thammasat University, Rangsit Center, THAILAND International Conference Hall, 2nd floor, Piyachat Building II

- Manmuan S, Manmuan P. (2019) Fucoxanthin inhibit cell adhesion and decreasing MMP-9 activity in SW-620 colorectal cancer cells. The 7th Annual meeting of the Society for Stem Cell Research " Stem Cell and Regenerative Medicine" 2019. Siriraj Medical Research Center (SiMR) Building, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

รายงานการเงิน (ตามแบบฟอร์ม) โดยลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย – สัญญาเลขที่ 169/2561

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ สารฟลูโคแซนทีนเพิ่มฤทธิ์ต้านมะเร็งของยา 5-ฟลูออโรยูราซิลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ผ่านทางการลดระดับเอนไซม์แมทริกซ์เมทาโลโปรติเอส

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) อ.สุวิศิษฎ์ แม้นเหมือน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 30 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 0 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2562

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 167,400 บาท เมื่อวัน เดือน ปี 15/01/2561

งวดที่ 2 (40%) 133,920 บาท เมื่อวัน เดือน ปี 14/08/2561

งวดที่ 3 (10%) 33,480 บาท เมื่อวัน เดือน ปี -

รวม 334,800 (ยังไม่รวมค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน 33,480)

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	33,480	33,480	0
2. ค่าจ้าง	0	0	0
3. ค่าวัสดุ	301,320	303,342	-2,020
4. ค่าใช้สอย	0	0	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	0	0	0
รวม	334,800	336,822	-2,020

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง (Reference)

1. National Center for Health Statistics, Division of Health Interview Statistics. National Health Interview Survey Public Use Data File 2010. Centers for Disease Control and Prevention. Hyattsville, MD., 2011.

2. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. Ecancermedicalscience. 2015;9:520.

3. Nakayama et al. Current options for the diagnosis, staging and therapeutic management of colorectal cancer. Gastrointest Tumor. 2014 ; 1 : 25-32.

4. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. Molecules. 2008;13(8):1551-69.

5. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet. 2000;355(9209):1041-7.

6. Hua, H.; Li, M.; Luo, T.; Yin, Y.; Jiang, Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: An evolving paradigm. Cell. Mol. Life Sci. 2011, 68, 3853–3868.

7. Choi, J.Y., et al., Overexpression of MMP-9 and HIF-1alpha in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. J Breast Cancer, 2011. 14(2): p. 88-95.

8. Verma, R.P. and C. Hansch, Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. Bioorg Med Chem, 2007. 15(6): p. 2223-68.

9. Roomi, M.W., et al., Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. Oncol Rep, 2009. 21(5): p. 1323-33.

10. Kim SM, Jung YJ, Kwon ON, Cha KH, Um BH, Chung D, et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga Phaeodactylum tricornutum. Applied biochemistry and biotechnology. 2012;166(7):1843-55.

11. Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. Biochimica et biophysica acta. 2004;1675(1-3):113-9.

12 . Rwigemera A, Mamelona J, Martin LJ. Inhibitory effects of fucoxanthinol on the viability of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 are correlated with modulation of the NF-kappaB pathway. Cell biology and toxicology. 2014;30(3):157-67.

13. Rwigemera A, Mamelona J, Martin LJ. I Comparative effects between fucoxanthinol and its precursor fucoxanthin on viability and apoptosis of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Anticancer Res. 2015;35:207-219.

14. Kotake-Nara E, Asai A, Nagao A. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. Cancer letters. 2005;220(1):75-84.

15. ภัทรวินฑ์ อัตตะสาระ และคณะ “มะเร็งที่พบมาก 10 อันดับแรกในผู้หญิง “ รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล ฉบับที่ 27 สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (2555) : 3.

16. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2009;361(25):2449-60.

17. Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, Sykes DP. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. 2012;14(2):e31-47.

18. Kim SL, Kim SH, Trang KT, Kim IH, Lee SO, Lee ST, et al. Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil in combination with parthenolide in human colorectal cancer. Cancer letters. 2013;335(2):479-86.

19. Holick CN, Michaud DS, Stolzenberg-Solomon R, Mayne ST, Pietinen P, Taylor PR, et al. Dietary carotenoids, serum beta-carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. American journal of epidemiology. 2002;156(6):536-47.

20. Dembitsky, V.M.; Maoka, T. Allenic and cumulenic lipids. Prog. Lipid Res. 2007, 46, 328–375.

21. Nomura, T.; Kikuchi, M.; Kubodera, A.; Kawakami, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Biochem. Mol. Biol. Int. 1997, 42, 361–370.

22. Beppu, F.; Niwano, Y.; Tsukui, T.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. J. Toxicol. Sci. 2009, 34, 501–510.

23. Englert, G.; Bjørnland, T.; Liaaen-Jensen, S. 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series. Magn. Reson. Chem.1990, 28, 519–528.

24. A.Asai, T. Sugawara, H.Ono, and A.Nagao, “Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin a in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites,” Drug Metabolism and Disposition, vol. 32, no. 2, pp. 205–211, 2004.

25. T. Kadekaru,H. Toyama, and T. Yasumoto, “Safety evaluation of fucoxanthin purified from Undaria pinnatifida,” Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, vol. 55, no. 6, pp. 304–308, 2008.

26. C. Ishikawa, S. Tafuku, T. Kadekaru et al., “Antiadult T-cell leukemia effects of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol,” International Journal of Cancer, vol. 123, no. 11, pp. 2702–2712, 2008.

27. Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. Marine drugs. 2011;9(10)

28. Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. Biochimica et biophysica acta. 2004;1675(1-3):113-9.

29. Kotake-Nara, E, Sugawara, T, Nagao, A. Antiproliferative effect of neoxanthin and fucoxanthin on cultured cells. Fish. Sci. 2005, 71, 459–461.

30. Das, S.K., Hashimoto, T., Shimizu, K., Yoshida, T., Sakai, T., Sowa, Y., Komoto, A., Kanazawa, K. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. Biochim. Biophys. Acta 2005, 1726, 328–335.

31. Takahashi K, Hosokawa M, Kasajima H, Hatanaka K, Kudo K, Shimoyama N, et al. Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues. Oncology letters. 2015;10(3):1463-7.

32. Lopes-Costa, E., et al. (2017). "Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells." J Toxicol Environ Health A 80(13-15): 776-787.

33. Mei C, Zhou S, Zhu L, Ming J, Zeng F, Xu R. Antitumor Effects of Laminaria Extract Fucoxanthin on Lung Cancer. Mar Drugs. 2017;15(2).

34. Liu Y, Zheng J, Zhang Y, Wang Z, Yang Y, Bai M, et al. Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. Neurochem Res. 2016;41(10):2728-51.

35. Yu RX, Yu RT, Liu Z. Inhibition of two gastric cancer cell lines induced by fucoxanthin involves downregulation of Mcl-1 and STAT3. Hum Cell. 2017.

36. Chitty JL, Filipe EC, Lucas MC, Herrmann D, Cox TR, Timpson P. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. F1000Res. 2018;7.

37. Hua, H.; Li, M.; Luo, T.; Yin, Y.; Jiang, Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: An evolving paradigm. Cell. Mol. Life Sci. 2011, 68, 3853–3868.

38. Hu, J.; van den Steen, P.E.; Sang, Q.X.; Opdenakker, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 2007, 6, 480–498.

39. Langenskiold, M.; Holmdahl, L.; Falk, P.; Ivarsson, M.L. Increased plasma mmp-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. Int. J. Colorectal Dis. 2005, 20, 245–252.

40. Dragutinovic, V.V.; Radonjic, N.V.; Petronijevic, N.D.; Tatic, S.B.; Dimitrijevic, I.B.; Radovanovic, N.S.; Krivokapic, Z.V. Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) and -9 (mmp-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. Mol. Cell. Biochem. 2011, 355, 173–178.

41. Bauvois, B., New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. Biochim Biophys Acta, 2012. 1825(1): p. 29-36.

ภาคผนวก (Appendix)

Buffers and reagents

1. RPMI-1640 stock solution ปริมาตร 1 ลิตร

- RPMI powder 10.4 g

- $NaHCO_3$ 1.5 g

- ddH_20 900 ml

ปรับ pH ที่ 7.4 โดย 1 M HCl และ 1 M NaOH

เติม ddH_20 จนได้ปริมาตร 1 ลิตร และกรองผ่านหัวกรอง ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร

2. 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร

- NaCl 80.65 g

- KCl 2 g

- KH_2PO_4 2 g

- Na_2HPO_4 11.5 g

- ddH_2O 900 ml

ปรับ pH ที่ 7.4 โดย 1 M HCl และ 1 M NaOH

เติม ddH_20 จนได้ปริมาตร 1 ลิตร นาไป sterilized โดยวิธี autoclave

3. Complete RPMI-1640 media ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- Incomplete RPMI-1640 media 89 ml

- Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) 10 ml

- Penicillin/Streptomycin 1 ml