

การพัฒนาระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส เพื่อค้นหาสารต้านมะเร็ง

ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ ปฐมาพร ปริกษากร พันธุ์ธิดา ดริยวง จัตรภรณ์ ใจมา และ ปณิตดา เทพอัศธร
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

บทคัดย่อ ไทโรซีนไคเนสมีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญ การแพร่กระจาย การลุกลาม และการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง โปรตีนกลุ่มนี้หลายชนิดใช้ในการรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า การศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากตัวอย่างสารจำนวนมาก คณะผู้วิจัยได้พัฒนาระบบทดสอบ โดยเริ่มจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนกลุ่มนี้ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ด้วยวิธี quantitative real-time PCR รวมทั้งวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสใน cell lysate แต่ละชนิดด้วยวิธี ELISA เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสม คัดเลือกเซลล์ HeLa สำหรับพัฒนาระบบทดสอบ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าปริมาณ cell lysate 0.125 mg/mL peptide substrate 0.25 μ g ต่อหลุม ATP 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส เมื่อทดสอบระบบที่พัฒนาด้วยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสลดค่าสัญญาณในระบบได้ ทดสอบความใช้ได้ของระบบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าสัญญาณ พบว่าพารามิเตอร์ทุกค่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบนี้สามารถทำซ้ำได้และเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสาร คณะผู้วิจัยยังนำระบบทดสอบดังกล่าวทดสอบฤทธิ์กับสารสกัดสมุนไพร 180 ตัวอย่าง และตรวจสอบยืนยันฤทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี MTT assay และ transmembrane assay พบสารที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยงจริง ระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะสมเป็นระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส

คำสำคัญ: มะเร็ง, ระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส, สารยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส, เป้าหมายยาต้านมะเร็ง

Corresponding author E-mail: parnuphan.p@dmsc.mail.go.th

Received: 25 October 2021

Revised: 5 February 2022

Accepted: 7 February 2022

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ในปี พ.ศ. 2563 ประเมินการว่ามีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งจำนวน 10 ล้านคน และมีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นจำนวน 19.3 ล้านคน โดยในปี พ.ศ. 2583 คาดการณ์ว่าจะมีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 28.4 ล้านคน ต่อปี⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ติดต่อกันหลายปี ในปี พ.ศ. 2562 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง 84,073 คน โดยมีอัตราการตาย 128.2 คน ต่อประชากร 100,000 คน⁽²⁾ การรักษาโรคมะเร็งทำได้โดยการผ่าตัด การฉายรังสี และการใช้วิธีเคมีบำบัด แพทย์อาจพิจารณาการรักษาด้วยวิธีเดียวหรือหลายวิธีร่วมกัน การรักษาในปัจจุบันยังพบปัญหาการกลับเป็นซ้ำ การดื้อยา และการเกิดอาการไม่พึงประสงค์เนื่องจากยาเคมีบำบัด ไม่ออกฤทธิ์จำเพาะกับเซลล์มะเร็ง ทำลายเซลล์ปกติของร่างกาย⁽³⁾ การพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพดีและมีความจำเพาะต่อเป้าหมายจึงยังเป็นที่ต้องการสำหรับโรคนี

ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinases) เป็นเอนไซม์ (enzyme) ชนิดหนึ่งที่เป็นกุญแจสำคัญในการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การเจริญ การเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนรูปร่าง โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ถ่ายโอนหมู่ฟอสเฟตตัวท้าย (γ phosphate group) จาก adenosine triphosphate (ATP) ไปยังโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งไทโรซีน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นตัวรับ (receptor tyrosine kinase: RTK) และกลุ่มที่ไม่เป็นตัวรับ (non-receptor tyrosine kinase: NRTK) ภาพรวมกระบวนการส่งสัญญาณของไทโรซีนไคเนสกลุ่ม RTK เริ่มจากลิแกนด์ (ligand) จับกับ RTK ส่วนที่ยื่นอยู่นอกเซลล์ ทำให้ RTK เข้าคู่กันในรูปแบบไดเมอร์ (dimerization) และกระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตระหว่างกัน (autophosphorylation) ที่ kinase domain ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ จากนั้น RTK จะเริ่มส่งสัญญาณโดยดึงหมู่ฟอสเฟตจาก ATP และถ่ายโอนไปยังโปรตีนอื่น (phosphorylation) ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณ ซึ่งส่งผลการตอบสนองของเซลล์ต่อไป การส่งสัญญาณของไทโรซีนไคเนสกลุ่ม NRTK มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเมื่อ NRTK

ถูกกระตุ้นจะเกิด autophosphorylation หรือเกิด phosphorylation โดย NRTK ชนิดอื่นก่อนจะเริ่มส่งสัญญาณ การแสดงออกที่มากเกินไปของโปรตีนหลายชนิดในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแพร่กระจาย การลุกลาม และการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง^(4,5) โปรตีนกลุ่มนี้จึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนายา เช่น EGFR (epidermal growth factor receptor หรือ ErbB-1), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 หรือ ErbB-2), c-Met (hepatocyte growth factor receptor: HGFR) และ c-Kit (proto-oncogene receptor tyrosine kinase) เป็นต้น ยาที่จำเพาะต่อเป้าหมายเหล่านี้ได้รับการขึ้นทะเบียนในหลายประเทศแล้ว^(6,7) แต่ยังพบปัญหาการดื้อยา และการเกิดอาการไม่พึงประสงค์^(6,7) ดังนั้น การค้นหาสารยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase inhibitors) เพื่อพัฒนายาใหม่ที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมโปรตีนเป้าหมายหลายชนิด มีประสิทธิภาพดี และมีผลข้างเคียงน้อยจึงมีความสำคัญ

การวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าว นั้น แต่เดิมใช้วิธี filtration assay (FA) ซึ่งใช้ [γ -³²P] ATP ในการทำปฏิกิริยา และกรองแยกเปปไทด์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต ก่อนจะตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดรังสีแบบซินทิลเลชัน (scintillation counter)⁽⁸⁾ วิธีนี้ทำให้เกิดของเสียที่ประกอบด้วยสารกัมมันตรังสี และไม่เหมาะสมกับการทดสอบกับสารต่างๆ จำนวนมากจากคลังสารเคมี (compound library) จึงมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสด้วยวิธีการหรือหลักการอื่น เช่น วิธี scintillation proximity assay (SPA) ซึ่งใช้ [γ -³³P] ATP แทน [γ -³²P] ATP เนื่องจากมีความเสถียรมากกว่า และวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากโฟตอนที่ถูกปล่อยออกมาจากการจับตัวกันของเปปไทด์ที่เชื่อมกับไบโอติน (biotinylated peptide) กับเม็ดบีดหรือไมโครเพลทที่มี scintillant^(9,10) นอกจากนี้ยังมีวิธี fluorescence polarization (FP) ซึ่งใช้ระดับการบิดระนาบของแสง

(polarization) ในการตรวจวิเคราะห์⁽¹¹⁾ วิธี fluorescence resonance energy transfer (FRET) ซึ่งวิเคราะห์จากความเข้มข้นของการเรืองแสงที่เกิดจากการถ่ายทอดพลังงานระหว่างโมเลกุล⁽¹²⁾ และวิธี luciferase-based ATP detection ซึ่งวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากปริมาณ ATP ที่เหลือในระบบโดยเอนไซม์ luciferase⁽¹³⁾ วิธีตรวจวิเคราะห์ข้างต้นมีข้อจำกัด เช่น วิธี FA จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตรังสี จึงต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเฉพาะเท่านั้น วิธี FP ให้ค่าสัญญาณวิเคราะห์ต่อสัญญาณรบกวน (signal-to noise ratio: S/N) ต่ำและไม่เหมาะกับการทดสอบกับสารที่มีความเข้มข้นสูง วิธี FRET และ luciferase-based ATP detection เป็นการวัดปฏิกิริยาโดยอ้อมและอาจถูกรบกวนจากสารยับยั้ง protease หรือ luciferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในระบบทดสอบดังกล่าว

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส วิธีที่ใช้เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไทโรซีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphotyrosine) ในการตรวจวิเคราะห์⁽¹⁴⁻¹⁸⁾ ซึ่งสะดวกและสามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ส่วนใหญ่ มักใช้ไทโรซีนไคเนสที่บริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูงและมักจำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสชนิดหนึ่งๆ เท่านั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบทดสอบสำหรับวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสด้วยเทคนิค ELISA โดยศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนสในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกเซลล์ สำหรับพัฒนาระบบทดสอบ หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทดสอบความใช้ได้ของระบบและทดลองใช้กับสารจำนวนมาก ให้ได้ระบบทดสอบสำหรับคัดกรอง (screening assay) ที่สะดวก ประหยัดต้นทุน และครอบคลุมไทโรซีนไคเนสหลายชนิด สำหรับเป็นทางเลือกในการประยุกต์ใช้เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนสจากสารจำนวนมาก เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง HeLa (CLS, Germany) เซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง PLC/PRF/5 (CLS, Germany) และเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 (CLS, Germany) เลี้ยงในอาหาร MEM (Gibco, USA) ที่เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) และ 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-100 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan) เลี้ยงในอาหาร DMEM (Gibco, USA) ที่เสริมด้วย 10% FBS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ CO₂ 5%

สารสกัดและพืชสมุนไพร

ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างจากคลังสารสกัดสมุนไพรของสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเป็นสารสกัดเอทานอล จำนวน 180 ตัวอย่าง จากพืช 120 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 การเตรียมสารสกัดโดยตัดชิ้นส่วนของตัวอย่างพืชให้มีขนาดเล็กและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นส่วนพืชแห้งที่ได้หมักด้วยเอทานอล 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองและหมักซ้ำอีก 24 ชั่วโมง นำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จากนั้นเตรียมตัวอย่าง โดยละลายสารสกัดที่ได้ด้วย absolute ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.3, 1, 3 และ 10 mg/mL

สำหรับตัวอย่างพืชที่แสดงฤทธิ์ที่ IC₅₀ < 100 µg/mL จากการคัดกรองด้วยระบบทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส ได้แก่ ทับทิม (*Punica granatum* L.) ว่านหอมแดง (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) มะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) น้านมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) และพลู (*Piper betle* L.) มีการเก็บรวบรวมตัวอย่างอีกครั้งจากพื้นที่จังหวัดราชบุรี เดือนกรกฎาคม 2562 และตรวจระบุชนิดพร้อมจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง ตัวอย่าง

ทั้งหมดเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขพรรณไม้ DMSC 5274, DMSC 5278, DMSC 5275, DMSC 5277 และ DMSC 5273 ตามลำดับ

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

เพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, MCF-7 และ KLU-100 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง แล้วยำเซลล์แต่ละชนิด จำนวน 1.5×10^6 เซลล์ มาสกัด RNA ด้วยชุดน้ำยา RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, USA) และใช้ชุดน้ำยา LightCycler® FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche, Germany) ใน

การเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ primers และสภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เพื่อศึกษายีนเป้าหมาย คือ *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ได้มาจากฐานข้อมูล PrimerBank⁽¹⁹⁾ โดยการสกัด RNA การเตรียม cDNA และการเพิ่มปริมาณ DNA ดำเนินการตามวิธีของชุดน้ำยาทั้งหมด จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี quantitative real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® (Roche, Germany) ใช้ยีน *GAPDH* ซึ่งเป็นยีนเจ้าบ้าน (housekeeping gene)⁽²⁰⁾ สำหรับ normalization คำนวณค่า relative expression จากการนำค่าการเพิ่มจำนวน (copy number) ของยีนเป้าหมายหารด้วยค่าการเพิ่มจำนวนของยีน *GAPDH*

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้	ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้
1	กระเจี๊ยบแดง	กิ่งและใบ ผลดิบ	14	กาหลง	ดอก ใบ
2	กระเทียม	หัวใต้ดิน	15	กุ่ม	ใบ
3	กระเทียมเถา	ใบ ดอก	16	แก้ว	ใบ
4	กระชาย	ส่วนเหนือดิน เหง้า	17	โกสน	ใบ
5	กระชายดำ	ส่วนเหนือดิน เหง้า	18	ขจร	กิ่งและใบ
6	กระตุมไพลิน	ส่วนเหนือดิน	19	ขมิ้น	ส่วนเหนือดิน
7	กระตือกวักดำ	ส่วนเหนือดิน	20	ข่อย	กิ่งและใบ
8	กระถิน	กิ่งและใบ ผล	21	ขัดมอน	ส่วนเหนือดิน
9	กระถินป่า	ใบ ดอก	22	ชำ	ส่วนเหนือดิน เหง้า
10	กระพังโหม	ส่วนเหนือดิน	23	ชิง	ส่วนเหนือดิน
11	กระสัง	ทุกส่วน	24	ขลุ	ส่วนเหนือดิน
12	กล้วย	ใบ ดอก ผลดิบ	25	จันทร์กระจ่างฟ้า	ใบ
13	กะเพราแดง	ส่วนเหนือดิน	26	ชะพลู	ใบ
			27	ช้างกระ	ใบ
			28	ขำมะเลียง	ดอก
			29	ขำมะนาด	ผล ใบ ดอก

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ (ต่อ)

ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้	ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้
30	ชุมเห็ดเทศ	ใบ ดอก	57	พญาขอ	ดอก
31	ต้อยติ่ง	ส่วนเหนือดิน ราก	58	พริกไทย	ใบ ผลดิบ
32	ตะไคร้	ใบ	59	พริกหอม	กิ่งและใบ ผล
33	ตะขบหิน	ส่วนเหนือดิน	60	พลู	ใบ
34	ตำแยแมว	ส่วนเหนือดิน ราก	61	พวงคราม	ใบ ดอก
35	ตีนตุ๊กแก	ทุกส่วน	62	พัฒนางชี	ราก
36	ทองพันชั่ง	กิ่งและใบ ราก	63	พังกา	ส่วนเหนือดิน
37	ทองหลาง	ดอก	64	พุด	ดอก
38	ทับทิม	กิ่งและใบ เมล็ด	65	พุทธรักษา	ส่วนเหนือดิน เหง้า
39	เทียนหยด	ผล	66	โพ	กิ่งและใบ ผล
40	ธรณีสาร	กิ่งและใบ	67	ไพลดำ	ส่วนเหนือดิน
41	น้อยหน่า	เมล็ด	68	ฟ้าทะลายโจร	ดอก
42	น้ำมันราชสีห์	ทุกส่วน	69	มะกรูด	เปลือกผล เมล็ด
43	บัวฉัตรขาว	ใบ ก้าน กลีบดอก	70	มะกา	กิ่งและใบ ใบ
44	บานไม่รู้โรย	ส่วนเหนือดิน	71	มะคำดีควาย	ผล
45	ใบนาคน	ส่วนเหนือดิน	72	มะดัน	ใบ
46	ผักเป็ดแดง	ส่วนเหนือดิน	73	มะตูม	ผล
47	ผักเสี้ยน	ส่วนเหนือดิน	74	มะนาว	ใบ
48	ผักเสี้ยนผี	ส่วนเหนือดิน	75	มะปราง	เปลือกผล ใบ
49	ผักแครด	ส่วนเหนือดิน	76	มะพูด	ใบ
50	ผักโขม	ส่วนเหนือดิน			เนื้อผลสุก เมล็ด
51	ผักกาดน้ำ	ทุกส่วน			เปลือกผล
52	ผักชี	ส่วนเหนือดิน			กิ่งและใบ เปลือกผล
53	ผักชีฝรั่ง	ใบ ดอก ราก			เปลือกผล ใบ
54	ผักบุ้ง	ใบ ผล			เนื้อผลสุก เมล็ด
55	ผักปลาบ	ส่วนเหนือดิน			
56	ผักหวานบ้าน	กิ่งและใบ ผล			

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ (ต่อ)

ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้	ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้
77	มะม่วงหาวมะนาวโห่	ใบ	98	ว่านกวณฉิม	ส่วนเหนือดิน
78	มะยม	เปลือกต้น	99	ว่านหอมแดง	เหง้า
		ใบ	100	ว่านทางจระเข้	เปลือกใบ
79	มะระ	ผล			เนื้อวุ้น
80	มะระขี้นก	ผล	101	สนแผง	ใบ
81	มะรุม	ใบ	102	สร้อยทอง	ส่วนเหนือดิน
		ผล	103	สะเดา	ใบ
82	มะละกอ	ใบ			ดอก
		ลำต้น			เมล็ด
83	มะลิ	ใบ	104	สะเดาดิน	ทุกส่วน
		ดอก	105	สระระแห่	ทุกส่วน
84	มะลิวัลย์	ใบ	106	สับปะรด	ใบ
		ดอก			เปลือกผล
85	มะแว้งเครือ	ส่วนเหนือดิน	107	สาบม่วง	ส่วนเหนือดิน
86	มันสำปะหลัง	ส่วนเหนือดิน	108	เสลดพังพอนตัวเมีย	ส่วนเหนือดิน
		หัวใต้ดิน	109	เสาวรส	กิ่งและใบ
87	โมกบ้าน	กิ่งและใบ	110	โสมไทย	ส่วนเหนือดิน
88	ไมยราบ	ส่วนเหนือดิน			ราก
89	ยอ	ผล	111	หญ้าแห้วหมู	ส่วนเหนือดิน
		ใบ			ราก
90	ย่านาง	ใบ	112	หญ้างวงช้าง	ส่วนเหนือดิน
91	รัก	กิ่งและใบ			ราก
92	รางจืด	ใบ	113	หญ้าหมอน้อย	ส่วนเหนือดิน
93	ราชพฤกษ์	ใบ	114	หนอนตายหยาก	ราก
		ดอก	115	หนามแดง	ผลดิบ
94	รำเพย	ใบ	116	หนามกระสุน	ทุกส่วน
95	ลูกใต้ใบ	ใบ	117	หนุมานประสาธกาย	ใบ
96	เล็บครุฑ	ส่วนเหนือดิน	118	หม่อน	ใบ
97	เล็บมือนาง	ใบ	119	เหงือกปลาหมอ	ส่วนเหนือดิน
		ดอก	120	อัญชัน	ดอก
					กิ่งและใบ

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้ในการศึกษา

ยีนเป้าหมาย	โปรตีน	Forward primer	Reverse primer
<i>EGFR</i>	EGFR	AGGCACGAGTAACAAGCTCAC	ATGAGGACATAACCAGCCACC
<i>HER2</i>	HER2	TGCAGGGAAACCTGGAAGCTC	ACAGGGGTGGTATTGTTTCAGC
<i>MET</i>	c-Met	ACAGTGGCATGTCAACATCGCT	CCATTGAGATCATCACTGGCT
<i>KIT</i>	c-Kit	GGCGACGAGATTAGGCTGTT	CATTCGTTTCATCCAGGATCTCA
<i>GAPDH</i>	GAPDH	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	CTCCACGACGTACTCAGCG

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษา

ยีนเป้าหมาย	<i>EGFR</i>	<i>HER2</i>	<i>MET</i>	<i>KIT</i>	<i>GAPDH</i>
Pre-incubation	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที
Amplification	45 รอบ	45 รอบ	45 รอบ	45 รอบ	45 รอบ
	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที
	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที
	72°C, 8 วินาที	72°C, 9 วินาที	72°C, 8 วินาที	72°C, 4 วินาที	72°C, 10 วินาที
Melting curve	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที
Cooling	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

การพัฒนาระบบทดสอบเริ่มจากการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การทำปฏิกิริยาไคเนส (kinase reaction) และการตรวจ phosphotyrosine ด้วยเทคนิค ELISA ดังแสดงในภาพที่ 1 ลำดับแรกเพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, MCF-7 และ KKKU-100 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง แล้วนำเซลล์แต่ละชนิดจำนวน 5×10^6 เซลล์ มาปั่นล้างด้วย PBS (Gibco, USA) และเตรียม cell lysate สำหรับทำปฏิกิริยา โดยเติม lysis buffer (KH_2PO_4 100 mM: pH 7.8, Na_3VO_4 1 mM, 0.2% Triton X-100, 10% glycerin) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 1,200 rpm 10 นาที นำ cell lysate ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) และปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้เป็น 1.50 mg/mL ด้วย lysis buffer

การทำปฏิกิริยาไคเนสดัดแปลงจากวิธีของ Ghosh G และคณะ⁽²¹⁾ ขั้นแรกเตรียม peptide substrate สำหรับปฏิกิริยาไคเนส โดยนำเปปไทด์ KKKAEEEEYFELVAC ที่เชื่อมกับ biotin ซึ่งสังเคราะห์จากบริษัท GenScript (USA) ใน coating buffer (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9.6) เคลือบลงบนไมโครเพลท Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific, USA) หลุมละ 2 µg บ่มที่ 4°C ข้ามคืนแล้วล้างไมโครเพลทด้วย tris buffered saline with Tween 20 (TBST; Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, 0.1% Tween 20, pH 7.6) จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาไคเนสโดยผสม 3X reaction buffer (HEPES 60 mM: pH 7.2, MnCl_2 30 mM, MgCl_2 45 mM, bovine serum albumin 120 µg/mL, dithiothreitol 3 mM) 50 µL, 50% glycerin 15 µL, 1 mM ATP (CALBIOCHEM, USA) 15 µL และ cell lysate 70 µL (รวม 150 µL ต่อปฏิกิริยา) นำสารละลายผสมดังกล่าวเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบด้วย peptide substrate ที่เตรียมไว้หลุมละ 50 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

การตรวจ phosphotyrosine ดำเนินการโดยล้างไมโครเพลทที่ทำปฏิกิริยาไคเนสด้วย TBST แล้ว block ด้วย 3% skim milk (BD Biosciences, USA) ใน TBST ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย TBST แล้วเติม phospho-tyrosine monoclonal antibody, clone pY20 (Invitrogen, USA) ซึ่งเป็น primary antibody ใน 3% skim milk/TBST อัตราการเจือจาง 1:1,000 ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย TBST จากนั้นเติม polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP (DakoCytomation, Denmark) ซึ่งเป็น secondary antibody ใน TBST อัตราการเจือจาง 1:2,000 ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย TBST จากนั้นเติม TMB 2-Component Microwell Peroxidase Substrate (SeraCare, USA) 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1% HCl ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท Infinite M200 PRO (TECAN, Switzerland)

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส
การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส ดำเนินการดังนี้

1) การแปรผันความเข้มข้นของ cell lysate 0–2 mg/mL โดยเตรียม cell lysate ให้มีความเข้มข้น 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL และทำปฏิกิริยาไคเนส โดยกลุ่มควบคุมให้เติม lysis buffer ในปริมาตรเท่ากัน จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส แล้วเปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุม เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

2) การแปรผันปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0–2 μ g ต่อหลุม โดยนำ peptide substrate ใน coating buffer มาเคลือบลงบนไมโครเพลท Nunc MaxiSorpTM หลุมละ 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 μ g โดยกลุ่ม

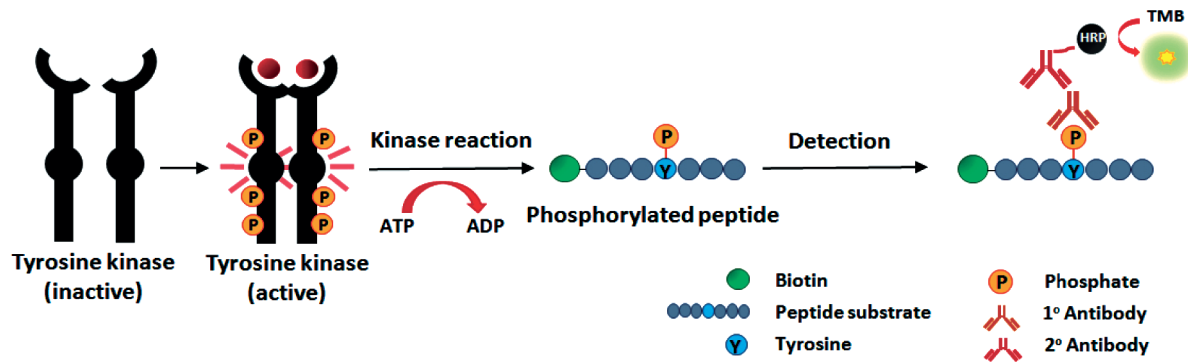
ควบคุมให้เติม coating buffer ในปริมาตรเท่ากัน บ่มที่ 4°C ชำมคืนและทำปฏิกิริยาไคเนสโดยใช้ความเข้มข้น cell lysate ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 1) จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส แล้วเปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุมเพื่อคัดเลือกปริมาณที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

3) การแปรผันความเข้มข้นของ ATP ในปฏิกิริยา 0–200 nM โดยเตรียมสารละลาย ATP ที่ความเข้มข้น 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mM แล้วนำไปผสมกับ 3X reaction buffer, 50% glycerin และ cell lysate และทำปฏิกิริยาไคเนส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 nM ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมให้เติมน้ำกลั่นในปริมาตรเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้น cell lysate และปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลทที่ได้จากการทดสอบในข้อ 1) และ 2) จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส แล้วเปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุมเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

4) การแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 0–60 นาที โดยทำปฏิกิริยาไคเนสและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 0, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที โดยใช้ความเข้มข้น cell lysate ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท และความเข้มข้น ATP ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 1) – 3) จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส เปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุม (เวลาในการทำปฏิกิริยา 0 นาที) เพื่อคัดเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลาย (solvent tolerance) ของระบบทดสอบ

ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นในสภาวะที่มีตัวทำละลายเอทานอล และ dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, USA) ปริมาณ 0–10% โดยเติม absolute ethanol หรือ DMSO ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5, 1, 2, 4, 6, 8



ภาพที่ 1 การตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสด้วยเทคนิค ELISA ขั้นแรกทำปฏิกิริยาไคเนสเพื่อให้เกิดการถ่ายโอนหมู่ฟอสเฟตจาก ATP ไปยัง peptide substrate ที่ตำแหน่งไทโรซีน จากนั้นใช้แอนติบอดีที่จำเพาะในการตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงาน

และ 10% และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ก่อนนำสารละลายผสมดังกล่าวเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบ peptide substrate ที่เตรียมไว้ เพื่อทำปฏิกิริยาไคเนส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μ g ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 30 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์ค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลาย และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติมตัวทำละลายทั้งสองชนิด ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

การตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบ

ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง รวม 7 ชนิด แบ่งเป็นสารที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส EGFR, HER2, c-Met และ c-Kit รวม 6 ชนิด คือ axitinib, crizotinib, sunitinib, gefitinib, erlotinib และ lapatinib^(6,7) และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งด้วยกลไกการแทรกตัวเข้าไปใน DNA (DNA intercalation) คือ doxorubicin สารทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich (USA) โดยเติมสารในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนสให้มีความเข้มข้น 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 และ 100 μ g/mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ก่อนนำสารละลายผสมเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบ peptide substrate เพื่อ

ทำปฏิกิริยาไคเนส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μ g ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 30 นาที จากนั้นวัดค่าสัญญาณการดูดกลืนแสง และวิเคราะห์ร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (%inhibition) แล้ววาดกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้ร้อยละ 50 (inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) เพื่อตรวจสอบว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้สำหรับคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนสได้หรือไม่ ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

การทดสอบความใช้ได้ของระบบทดสอบ

การทดสอบความใช้ได้ของระบบ กรณีทดสอบต่างหลุม (intra-plate) ต่างไมโครเพลท (inter-plate) และต่างวัน (inter-day) ดัดแปลงจากวิธีของ Iversen PW และคณะ⁽²²⁾ ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นในสภาวะต่างๆ ที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณที่ผ่านการปรับค่าแล้ว (normalized signal ซึ่งในที่นี้คือ %inhibition) ระดับสูงสุด (max) ปานกลาง (mid) และต่ำสุด (min) ดังนี้

การทดสอบในสภาวะที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณสูงสุด (max) โดยทำปฏิกิริยาไคเนส แต่ไม่เติม cell lysate และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ลงในปฏิกิริยา ใช้ lysis buffer ในปริมาตรเดียวกันแทน cell lysate ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนส

การทดสอบในสภาวะที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณปานกลาง (mid) โดยทำปฏิกิริยาโคเนส และเติมสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนโคเนส (gefitinib) ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาโคเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 $\mu\text{g/mL}$

การทดสอบในสภาวะที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณต่ำสุด (min) โดยทำปฏิกิริยาโคเนส แต่ไม่เติมสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนโคเนสในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาโคเนส

การทำปฏิกิริยาโคเนส ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μg ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาโคเนส 30 นาที จากนั้นวัดค่าสัญญาณการดูดกลืนแสง โดยทดสอบสภาวะละ 4 ซ้ำ ในไมโครเพลทเดียวกัน (intra-plate) จำนวน 3 ไมโครเพลท (inter-plate) ติดต่อกัน 3 วัน (inter-day) แล้วคำนวณค่า Z' factor ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลักในการพิจารณาความใช้ได้และคุณภาพของระบบ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation หรือ %CV) ของค่าสัญญาณ และค่า %inhibition จากสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$Z' \text{ factor} = 1 - 3 \times \frac{SD_{\max} - SD_{\min}}{\text{mean}_{\max} - \text{mean}_{\min}}$$

$$\%CV = \frac{SD}{\text{mean}} \times 100$$

$$\%inhibition = \left(\frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{test}}}{OD_{\text{control}}} \right)$$

โดย SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, mean คือ ค่าเฉลี่ย, OD_{control} และ OD_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ตามลำดับ

เกณฑ์การยอมรับของผลการทดสอบ^(22,23) ได้แก่ การทดสอบ intra-plate โดยแต่ละไมโครเพลทจะต้องมีค่า $\%CV_{\max}$, $\%CV_{\text{mid}}$, $\%CV_{\min} \leq 20\%$, ค่า SD ของ %inhibition ระดับปานกลาง ($SD_{\text{mid-normalized}}$) ≤ 20 และค่า Z' factor ≥ 0.5 ส่วนการทดสอบ inter-plate และ inter-day ค่า %inhibition ระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวันต้องแตกต่างกันน้อยกว่า 15%

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนโคเนสในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นทดสอบกับตัวอย่างจากคลังสารสกัดสมุนไพร โดยเป็นสารสกัดเอทานอลจำนวน 180 ตัวอย่าง จากพืช 120 ชนิด โดยเติมตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 0.3, 1, 3 และ 10 mg/mL ปริมาตร 1.5 μL ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาโคเนส ใช้ gefitinib ที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol ที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ นำสารละลายผสมบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบ peptide substrate เพื่อทำปฏิกิริยาโคเนส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μg ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาโคเนส 30 นาที จากนั้นวัดค่าสัญญาณการดูดกลืนแสง ทดสอบ 2 ซ้ำ สำหรับการทดสอบเบื้องต้น (primary screening) จากนั้นวิเคราะห์ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนโคเนส (%inhibition) และ IC_{50} และคัดเลือกสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ทดสอบฤทธิ์อีกครั้ง โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนโคเนส มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเตรียมเซลล์ HeLa ให้มีปริมาณ 2×10^5 cells/mL แล้วเพาะเลี้ยงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 μL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 0.3, 1, 3 และ 10 mg/mL ปริมาตร 2 μL ใช้ gefitinib เดิมที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol เดิมที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ เพาะเลี้ยงต่อ 48 ชั่วโมง และตรวจวัดการเจริญของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay⁽²⁴⁾ เพื่อวิเคราะห์ค่าร้อยละ

การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (%inhibition) สำหรับหาค่า IC_{50} ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยดัดแปลงจากวิธี trans-membrane assay⁽²⁵⁾ โดยเตรียมเซลล์ HeLa ให้มีปริมาณ $2.5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่ไม่ผสม FBS ใส่ลงใน cell culture insert (Corning, USA) หลุมละ 300 μL และเติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 1 หรือ 3 mg/mL ปริมาตร 3 μL ใช้ gefitinib ที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol ที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นเตรียมไมโครเพลทสำหรับวาง cell culture insert โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่ผสม FBS 10% และรีคอมบิแนนท์โปรตีน SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) 100 mg/mL ปริมาตรรวม 700 μL ลงในไมโครเพลทชนิด 24 หลุม และเติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 1 หรือ 3 mg/mL ปริมาตร 7 μL ใช้ gefitinib ที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol ที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นนำ cell culture insert ที่เตรียมวางลงบนไมโครเพลท และเพาะเลี้ยง 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ตรึงเซลล์ด้วยเมทานอล (JT Baker, USA) และย้อมสีเซลล์ด้วย 25% Giemsa stain solution (Merck, USA) นับจำนวนเซลล์ที่เกาะอยู่บน cell culture insert และคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ (%inhibition) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง

สำหรับรีคอมบิแนนท์โปรตีน SDF-1 ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง⁽²⁶⁾ ผลิตโดยโคลนยีน *SDF-1* จากเซลล์ PLC/PRF/5 เข้าสู่พลาสมิด pGEM®-T (Promega, USA) เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น subclone เข้าสู่พลาสมิด pET-21a

(Novagen, USA) และนำเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA affinity chromatography⁽²⁷⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ ANOVA (analysis of variance) จากนั้นเปรียบเทียบข้อมูลที่ต่างกันด้วย Tukey's multiple comparisons test กำหนดค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์โดยซอฟต์แวร์ GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA)

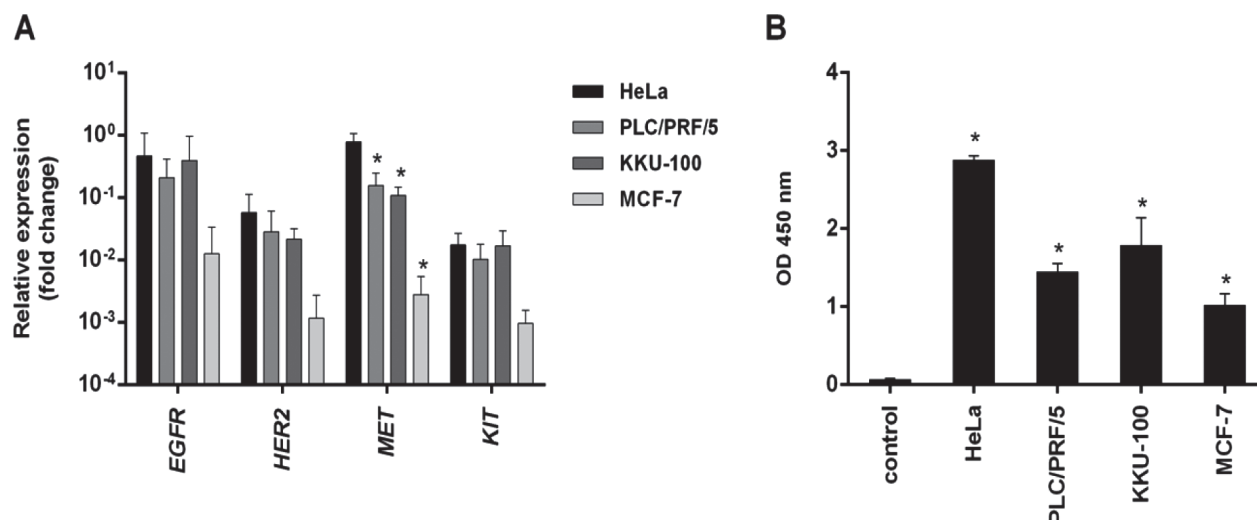
ผล

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส พบว่าโดยภาพรวม เซลล์ HeLa มีระดับการแสดงออกของยีนทั้งสี่ชนิด คือ *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* สูงกว่าเซลล์ PLC/PRF/5, MCF-7 และ KKKU-100 อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *EGFR*, *HER2* และ *KIT* ไม่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ยกเว้นยีน *MET* ที่มีการแสดงออกในเซลล์ HeLa มากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงอื่น ดังแสดงในภาพที่ 2A

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส โดยนำ cell lysate ของเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, KKKU-100 และ MCF-7 มาทำปฏิกิริยาไคเนส และตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส พบว่าเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, KKKU-100 และ MCF-7 ให้ค่าสัญญาณเป็น 2.88, 1.45, 1.79 และ 1.02 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2B เนื่องจากเซลล์ HeLa มีระดับการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนสสูงกว่าเซลล์ชนิดอื่นโดยภาพรวม และมีระดับการทำงานของโปรตีนไทโรซีนไคเนสสูงที่สุด จึงเลือกใช้เซลล์ HeLa ในการพัฒนาระบบทดสอบ



ภาพที่ 2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส และการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ (A) การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส ได้แก่ *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, PLC/PRF/5, KKKU-100 และ MCF-7 ด้วยวิธี quantitative real-time PCR ทดสอบกับเซลล์ชนิดละ 3 ตัวอย่าง * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ HeLa (B) การตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสจาก cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, PLC/PRF-5, KKKU-100 และ MCF-7 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติม cell lysate จากการวัด phosphotyrosine ที่เกิดจากปฏิกิริยาไคเนส ด้วยวิธี ELISA ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell lysate ในช่วง 0-2 mg/mL พบว่าค่าสัญญาณจากการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติม cell lysate เป็น 0.15 โดยค่าสัญญาณจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ความเข้มข้น 0.008 mg/mL (0.53) และจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น จากนั้นจะเริ่มคงที่เมื่อ cell lysate มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 mg/mL ขึ้นไป โดยค่าสัญญาณในช่วงความเข้มข้น 0.25-2 mg/mL จะอยู่ระหว่าง 3.68-3.87 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงปริมาณ cell lysate ที่มากเกินไป จึงเลือกความเข้มข้น 0.125 mg/mL ซึ่งให้ค่าสัญญาณเป็น 3.44 ในการทดลองต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3A

การศึกษาปริมาณ peptide substrate ที่เหมาะสมในการเคลือบไมโครเพลท และการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ATP ในปฏิกิริยา พิจารณาด้วยหลักการ

เดียวกัน สำหรับ peptide substrate พบว่าที่ปริมาณ 0.031 μ g ต่อหลุมขึ้นไป จะให้ค่าสัญญาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะเริ่มคงที่เมื่อมีปริมาณตั้งแต่ 0.5 μ g ต่อหลุม ดังแสดงในภาพที่ 3B จึงเลือกใช้ปริมาณ 0.25 μ g ต่อหลุม ในการทดลองต่อไป ส่วน ATP จะให้ค่าสัญญาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ความเข้มข้น 3.1 nM ขึ้นไป และจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 nM จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 25 nM ในการทดลองต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3C

สำหรับเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไคเนส พบว่าค่าสัญญาณจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 10 นาทีขึ้นไป และจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้น โดยที่เวลา 30 และ 60 นาที จะให้ค่าสัญญาณเป็น 3.24 และ 3.76 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณา Z' factor ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลักในการทดสอบความใช้ได้ของระบบ พบ

ว่าค่า Z' factor ของระบบทดสอบเป็น 0.83 และ 0.89 ซึ่งใกล้เคียงกันและผ่านเกณฑ์การยอมรับ เพื่อไม่ให้ระบบทดสอบนี้ใช้เวลามากเกินไป จึงเลือกใช้เวลา 30 นาทีในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 3D

การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลาย (solvent tolerance) ของระบบทดสอบ

การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลายของระบบพบว่าตัวทำละลายเอทานอลและ DMSO จะเริ่มทำให้ค่าสัญญาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ความเข้มข้น 6% และ 8% ตามลำดับ โดยจะทำให้ค่าสัญญาณลดลงเหลือ $74.02 \pm 12.67\%$ และ $74.40 \pm 6.91\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4A การทดสอบกับสารทดสอบจึงไม่ควรมีตัวทำละลายเหล่านี้เกินความเข้มข้นดังกล่าว

การตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบ

การตรวจสอบความถูกต้องของระบบโดยทดสอบกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ axitinib, crizotinib, sunitinib, gefitinib, erlotinib และ lapatinib ลดค่าสัญญาณในระบบตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิดกับค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ดังแสดงในภาพที่ 4B โดยเมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของสารกลุ่มนี้ พบว่า sunitinib, crizotinib, axitinib, gefitinib และ erlotinib มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสสูง โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.1–2.5 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ lapatinib มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสต่ำกว่าสารอื่นในกลุ่ม โดยมีค่า IC_{50} เป็น $88.53 \pm 9.95\%$ ดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วน doxorubicin ซึ่งเป็นสารยับยั้งมะเร็งกลไกอื่น ไม่ลดค่าสัญญาณ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$

การทดสอบความใช้ได้ของระบบทดสอบ

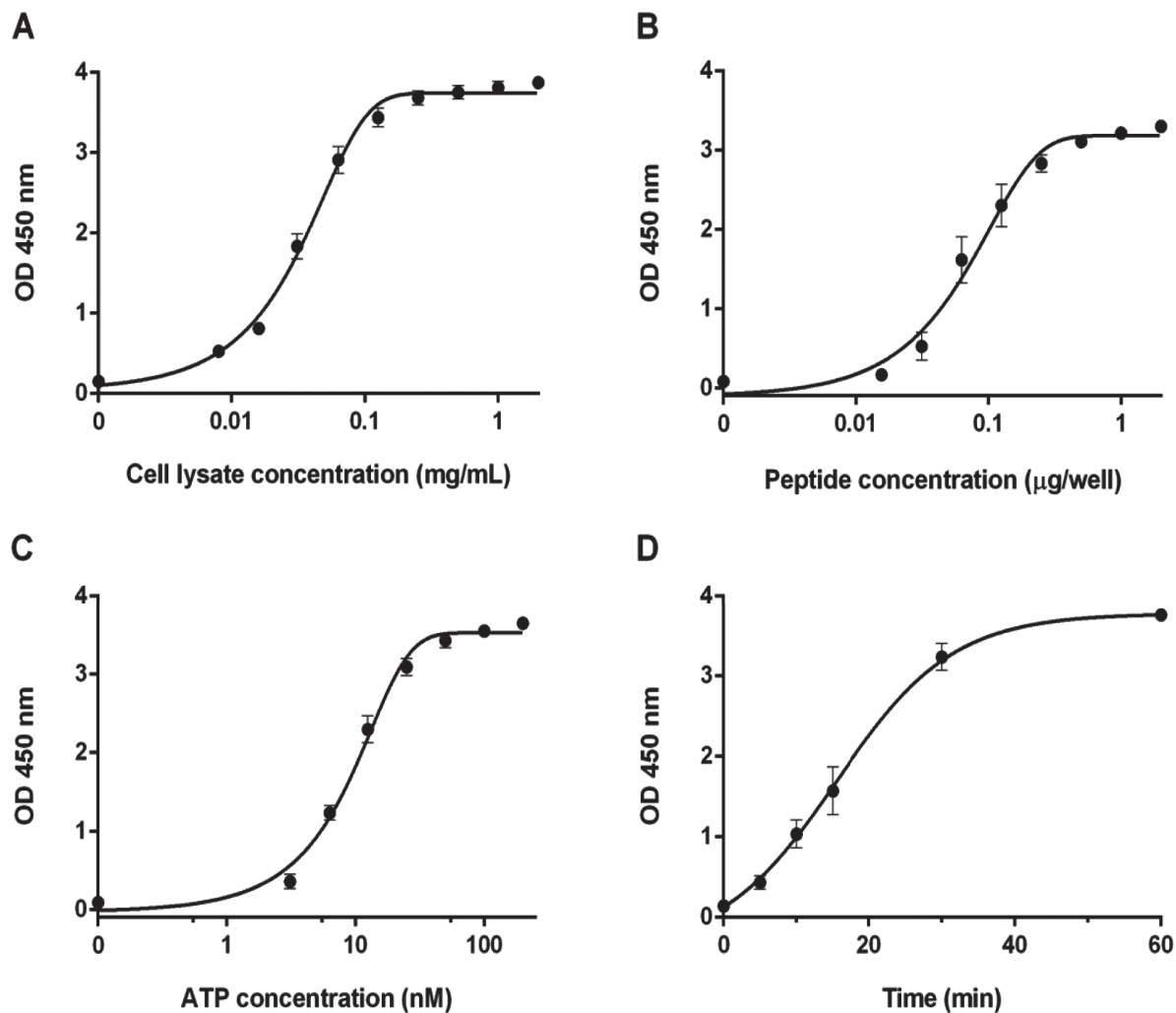
การทดสอบความใช้ได้ของระบบกรณีทดสอบต่างหลุม (intra-plate) พบว่าค่า Z' factor, $\%CV_{\text{max}}$,

$\%CV_{\text{mid}}$, $\%CV_{\text{min}}$ และ $SD_{\text{mid-normalized}}$ ของแต่ละไมโครเพลทอยู่ในช่วง 0.77–0.96, 1.06–7.05, 0.71–12.09, 4.45–13.13 และ 0.44–4.15 ตามลำดับ ซึ่งทุกค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 5 การทดสอบความใช้ได้ของระบบกรณีทดสอบต่างไมโครเพลท (inter-plate) และต่างวัน (inter-day) พบว่าผลต่างของค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ($\%inhibition$) ระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.08–5.67 และ 0.08–13.07 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 15% และอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ผลการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถทำได้

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

เมื่อนำระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสที่พัฒนาขึ้นทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากพืช 120 ชนิด จำนวน 180 ตัวอย่าง พบสารสกัดจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากทับทิม วานหอมแดง มะยม น้ำมันมะขามสีห์ และพลู มีค่า IC_{50} สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสเป็น 16.25 ± 3.27 , 23.16 ± 1.94 , 30.59 ± 7.47 , 50.44 ± 1.64 และ 73.82 ± 10.45 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวก มีค่า IC_{50} เป็น 1.71 ± 0.50 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 7 สำหรับสารสกัดสมุนไพรอีก 175 ตัวอย่าง พบว่ามีค่า IC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$

เนื่องจากระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นเป็นระบบทดสอบสำหรับคัดกรองเบื้องต้น และใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการทดสอบ การศึกษานี้จึงคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสที่ $IC_{50} < 100$ $\mu\text{g/mL}$ ได้แก่ ทับทิม วานหอมแดง มะยม น้ำมันมะขามสีห์ และพลู ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาไคเนส (A) การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell lysate โดยเติม cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ที่ความเข้มข้น 0-2 mg/mL ในปฏิกิริยา และตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดจากการทำงานของไทโรซีนไคเนส (B) การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ peptide substrate โดยเคลือบเปปไทด์ KKKAEEEEYFELVAC ที่เชื่อมกับ biotin ที่ไมโครเพลท ปริมาณ 0-2 μg ต่อหลุม และทำปฏิกิริยาไคเนส เพื่อตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น (C) การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ATP ในปฏิกิริยา โดยเติม ATP ในปฏิกิริยาให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-200 nM และตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น (D) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส โดยทำปฏิกิริยาไคเนส 0, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที และตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

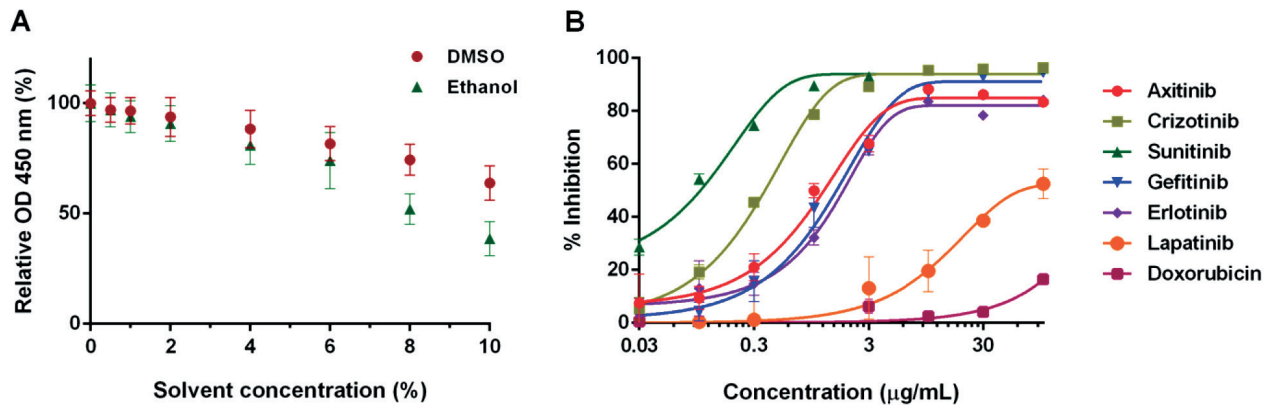
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดจากว่านหอมแดงและพลูมีค่า IC_{50} สำหรับ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเท่ากับ 89.89 ± 6.31 และ 90.91 ± 2.21 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดจากทับทิม

มะยม และน้ำนมราชสีห์ มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวกมีค่า IC_{50} เป็น 19.58 ± 0.17 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อพิจารณาค่าร้อยละ การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดจากว่านหอมแดงและพลูยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 64.99 ± 7.34 และ

62.93±8.18 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากมะยมแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกัน ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ตั้งแต่ 3-100 µg/mL เฉลี่ยร้อยละ 49.00±2.66 ในขณะที่สารสกัดจากทับทิม และน้ำมันราซสีห์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพียง

ร้อยละ 21.75±5.43 และ 22.26±1.02 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL สำหรับ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวก ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 82.65±4.64 ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลายและการตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (A) การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลาย โดยเติมตัวทำละลายเอทานอล และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0-10% ในปฏิกิริยาไคเนสและเปรียบเทียบค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น เพื่อตรวจสอบผลกระทบของตัวทำละลายที่มีต่อระบบทดสอบ (B) ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิดกับค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ตรวจสอบความถูกต้องของระบบโดยทดสอบกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง 7 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.03-100 µg/mL ทดสอบ 3 ครั้ง ครึ่งละ 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ค่า IC₅₀ ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งที่ได้จากการทดสอบด้วยระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส

สาร	IC ₅₀ (µg/mL)
Axitinib	1.58±0.54
Crizotinib	0.50±0.01
Sunitinib	0.12±0.02
Gefitinib	2.11±0.17
Erlotinib	2.16±0.13
Lapatinib	88.53±9.95
Doxorubicin	> 100

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดจากพลูยับยั้งการแพร่กระจายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 30 และ 10 µg/mL โดยยับยั้งร้อยละ 98.58±1.23 และ 50.86±9.97 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากว่านหอมแดงยับยั้งการแพร่กระจายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL โดยยับยั้งร้อยละ 47.08±2.90 ในขณะที่สารสกัดจากมะยม ทับทิม และน้ำมันราซสีห์ ไม่แสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ สำหรับ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวก ยับยั้งการแพร่กระจายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 30 และ 10 µg/mL โดยยับยั้งร้อยละ 99.97±0.04 และ 86.57±11.77 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดสอบความใช้ได้ของระบบทดสอบ เพื่อคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส กรณีทดสอบต่างหลุม

พารามิเตอร์		Z' factor	%CV _{max}	%CV _{mid}	%CV _{min}	SD _{mid-normalized}
วันที่ 1	plate 1	0.93	2.04	0.76-4.12	13.04	0.62-1.77
	plate 2	0.89	3.27	1.17-6.44	6.70	1.08-2.56
	plate 3	0.96	1.06	1.30-7.75	8.42	1.21-3.28
วันที่ 2	plate 1	0.95	1.61	0.83-7.19	4.45	0.44-2.35
	plate 2	0.94	1.45	1.43-12.09	12.65	1.31-3.85
	plate 3	0.84	5.14	4.28-9.21	5.13	1.07-4.15
วันที่ 3	plate 1	0.87	3.96	2.07-4.71	6.74	0.90-2.56
	plate 2	0.82	5.35	0.71-7.29	13.13	0.69-3.68
	plate 3	0.77	7.05	1.22-4.06	8.15	0.22-3.00
เกณฑ์การยอมรับ		≥ 0.5	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20

ตารางที่ 6 ผลต่างของค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวัน เมื่อทดสอบกับสาร gefitinib ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น gefitinib (μg/mL)	ค่าเฉลี่ย %inhibition	เกณฑ์การยอมรับ	ผลต่างของค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (%)			
			inter-plate			inter-day
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	
0.25	5.77±2.12	< 15	0.95-2.84	0.59-2.23	0.45-2.71	0.27-5.95
0.50	13.50±2.87		0.90-2.34	0.28-2.95	1.25-2.71	0.09-7.53
1.00	25.72±3.57		2.44-5.67	0.55-1.44	2.68-5.58	0.25-10.50
2.00	42.65±4.63		0.14-3.88	0.08-2.58	1.17-3.59	0.08-13.07
4.00	62.62±3.37		0.44-3.24	0.25-1.84	0.46-3.09	0.25-9.89
8.00	79.29±1.85		0.15-2.05	0.17-0.49	0.31-2.67	0.15-5.37

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ฤทธิ์ยับยั้ง การทำงานของ ไทโรซีนไคเนส (IC ₅₀ , μg/mL)	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็ง (IC ₅₀ , μg/mL)	ฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็ง (%inhibition)	
				30 μg/mL	10 μg/mL
ว่านหอมแดง	เหง้า	23.16±1.94	89.89±6.31	47.08±2.90	5.53±1.39
พลู	ใบ	73.82±10.45	90.91±2.21	98.58±1.23	50.86±9.97
มะยม	เปลือกต้น	30.59±7.47	> 100	-	-
ทับทิม	กิ่งและใบ	16.25±3.27	> 100	-	-
น้ำมันราสบี	ทุกส่วน	50.44±1.64	> 100	-	-
Gefitinib (positive control)		1.71±0.50	19.58±0.17	99.97±0.04	86.57±11.77

วิจารณ์

ระบบทดสอบฤทธิ์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการพัฒนายา การเลือกใช้ระบบทดสอบที่เหมาะสมจะช่วยให้ค้นพบสารออกฤทธิ์ที่อาจนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นสารต้นแบบทางยาได้ ระบบทดสอบที่ดีสำหรับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ควรตรวจวัดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สนใจได้ ทำซ้ำได้ มีความคงทนต่อสารเคมี มีคุณภาพและประหยัดต้นทุน⁽²⁸⁾ การวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าวนี้ทำได้หลายหลักการซึ่ง ELISA เป็นหลักการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้พัฒนาระบบทดสอบ ระบบทดสอบหลักการ ELISA นั้นง่ายและสามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป มีทั้งรูปแบบที่ใช้เซลล์ (cell-based assay)^(14,15) และรูปแบบที่ใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical assay)⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัด ระบบทดสอบที่ใช้เซลล์ต้องทดสอบสารกับเซลล์ในแต่ละหลุมของไมโครเพลทก่อน แล้วจึงเตรียม cell lysate และถ่ายไปยังอีกไมโครเพลทหนึ่งเพื่อวิเคราะห์การทำงานของไทโรซีนไคเนส แต่ผลของสารทดสอบอาจทำให้เซลล์ในแต่ละหลุมมีจำนวนมากน้อยต่างกัน การจะควบคุมให้มีความเข้มข้นเท่ากันจึงเป็นเรื่องยาก ส่วนระบบทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีมักใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูง และจำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสชนิดหนึ่งๆ เท่านั้น ระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่จำเป็นต้องใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์ ไม่จำเพาะกับโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง และไม่มีความยุ่งยากในการควบคุมความเข้มข้นของ cell lysate จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้

การศึกษานี้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีน *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* ในเซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกเซลล์สำหรับพัฒนาระบบทดสอบ เนื่องจากยีนทั้งสี่ชนิดเป็นยีนของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนสที่เป็นเป้าหมายการรักษา และมียาที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกาแล้ว^(6,7) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (PLC/PRF/5), มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-100) และมะเร็งเต้านม (MCF-7)

มีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าเซลล์มะเร็งจากคนไข้มีการแสดงออกของโปรตีนของยีนกลุ่มดังกล่าว⁽²⁹⁻³¹⁾ สำหรับการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้งสี่ชนิด พบว่าเซลล์ HeLa ให้ค่าสัญญาณสูงสุดสอดคล้องกับผลการศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพบว่าเซลล์ HeLa มีการแสดงออกของยีนทั้งสี่ชนิดสูงกว่าเซลล์อื่นโดยภาพรวม อย่างไรก็ตามเนื่องจากระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นไม่จำเพาะกับโปรตีนไทโรซีนไคเนสชนิดใดชนิดหนึ่ง ค่าสัญญาณที่เกิดขึ้นจึงอาจเกิดจากการทำงานของไทโรซีนไคเนสชนิดอื่นที่พบในเซลล์ HeLa ร่วมด้วย เช่น Janus kinase (JAK), focal adhesion kinase (FAK), platelet-derived growth factor receptors (PDGFR) และ fibroblast growth factor receptors (FGFR) เป็นต้น⁽³²⁾

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไคเนส พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ cell lysate, peptide substrate และ ATP ทำให้ค่าสัญญาณจากการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึงระดับหนึ่ง ค่าสัญญาณจะเริ่มคงที่ แสดงให้เห็นถึงปริมาณที่มากเกินไป ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การทดสอบฤทธิ์สาร การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงควรเลือกความเข้มข้นที่ยังอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) และทำให้ได้ค่าสัญญาณที่สูงเพียงพอ การศึกษานี้จึงเลือก cell lysate 0.125 mg/mL, peptide substrate 0.25 µg ต่อหลุม และ ATP 25 nM ในการทำปฏิกิริยา สำหรับการหาระยะเวลาที่เหมาะสม พิจารณาด้วยหลักการเดียวกัน เพื่อไม่ให้ระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นใช้เวลานานเกินไป จึงเลือกใช้เวลา 30 นาที ในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากให้ค่าสัญญาณที่สูง และให้ค่า Z' factor ที่ใกล้เคียงกับการทำปฏิกิริยา 60 นาที ซึ่งสภาวะที่ได้นี้อาจแตกต่างจากระบบทดสอบลักษณะเดียวกันในการศึกษาอื่น^(16-18, 21) เนื่องจากเซลล์ โปรตีน หรือซับสเตรตที่ใช้ต่างกัน

การศึกษานี้ได้ทดสอบความคงทนของระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นต่อตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการละลายสารทดสอบ ได้แก่ เอทานอลและ DMSO เนื่องจากสารละลายทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนตกตะกอน

หรือเสียสภาพ^(33,34) จึงอาจส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ในปฏิกิริยาไคเนส ผลการทดสอบพบว่าสารละลายทั้งสองชนิดจะทำให้ค่าสัญญาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ความเข้มข้น 6% และ 8% ตามลำดับ โดยทั่วไป การทดสอบฤทธิ์ของสารมักมีสารละลายในสัดส่วน 0.1% ถึง 5%⁽³⁴⁾ จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความคงทนต่อตัวทำละลายทั้งสองชนิด การศึกษาขึ้นยังได้ตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบโดยใช้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนสทั้งหมดลดค่าสัญญาณของระบบ ขณะที่สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ด้วยกลไกอื่นไม่ลดค่าสัญญาณโดยรวม จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้ อย่างไรก็ตามพบการลดลงของค่าสัญญาณเล็กน้อยจากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ด้วยกลไกอื่นที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณสารที่มากเกินไปรบกวนการทำงานของปฏิกิริยา ระบบทดสอบนี้จึงอาจมีข้อจำกัดในการทดสอบกับสารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป

การศึกษานี้ใช้ Z' factor เป็นพารามิเตอร์หลักในการตรวจสอบคุณภาพและประสิทธิภาพของระบบ โดย Z' factor เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงช่วงความกว้างของค่าสัญญาณ ระบบทดสอบที่มีค่า Z' factor ตั้งแต่ 0.5 ขึ้นไปถือว่าเป็นระบบทดสอบที่ดี⁽²³⁾ จึงใช้ค่านี้ในการกำหนดเกณฑ์การยอมรับ นอกจากนี้ยังใช้ %CV และ SD เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนของค่าสัญญาณ และใช้ผลต่างของค่า %inhibition ตรวจสอบความแตกต่างของการทดสอบระหว่างไมโครเพลตและระหว่างวัน⁽²²⁾ ผลการศึกษาพบว่าค่าพารามิเตอร์ทุกค่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนามีคุณภาพและสามารถทำได้

การทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรจำนวน 180 ตัวอย่าง จากพืช 120 ชนิด พบสารสกัด 5 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ คือ ทับทิม วานหอมแดง มะยม น้านมราชสีห์ และพลู เนื่องจากระบบทดสอบที่พัฒนาเป็นระบบทดสอบสำหรับคัดกรองเบื้องต้น และใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการทดสอบ อาจถูกรบกวนจากสารอื่น เช่น สารที่มี

คุณสมบัติทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงอีกครั้ง เนื่องจากไทโรซีนไคเนสเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การศึกษานี้จึงเลือกที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็ง ผลการศึกษพบว่า สารสกัดจากใบพลูแสดงฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 30 และ 10 µg/mL ส่วนสารสกัดจากเหง้าว่านหอมแดงยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่ความเข้มข้น 30 µg/mL โดยสารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีค่า IC_{50} สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่ำกว่า 100 µg/mL แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการศึกษาอื่นซึ่งพบว่า สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง⁽³⁵⁻³⁸⁾ สำหรับสารสกัดจากเปลือกต้นมะยม แม้จะไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ และมีค่า IC_{50} สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงกว่า 100 µg/mL แต่สารสกัดชนิดนี้มีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกันในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ คือ $49.00 \pm 2.66\%$ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นมะยมแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ระดับหนึ่ง โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในสารสกัดจากเปลือกต้นมะยม แต่มีรายงานสารออกฤทธิ์บางชนิดที่สกัดแยกได้จากรากและใบของต้นมะยมแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง^(39, 40) จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม สำหรับสารสกัดจากกิ่งและใบทับทิมและต้นน้านมราชสีห์ แม้จะแสดงฤทธิ์ดีจากการทดสอบด้วยระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้น แต่เมื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าไม่แสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ สาเหตุอาจเกิดจาก 1) การตรวจสอบยังไม่ครอบคลุม เนื่องจากไทโรซีนไคเนสเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ ทั้งการเจริญเติบโต การแพร่กระจาย การลุกลาม และการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง แต่การศึกษานี้

ตรวจสอบเฉพาะฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเท่านั้น จึงอาจต้องตรวจสอบเพิ่มเติม 2) สารแสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าที่ทดสอบ เช่น สารสกัดจากน้ำมันราชสีห์ ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เป็น > 200 , 100.13 ± 10.01 และ 144.60 ± 5.52 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ⁽⁴¹⁾ และ 3) เกิดผลบวกปลอม สารสกัดสมุนไพรที่มีสารกลุ่ม tannins เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทำให้โปรตีนตกตะกอน⁽⁴²⁾ สารสกัดที่มีสัดส่วนของสารกลุ่ม tannins สูง อาจทำให้ไทโรซีนไคเนสเสียสภาพ จนส่งผลกระทบต่อระบบทดสอบ ซึ่งทับทิมและน้ำมันราชสีห์ต่างมีสารกลุ่มนี้^(43,44) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสสูงเกินจริงจนเกิดผลบวกปลอม

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้คัดกรอง เพื่อค้นหาสารต้านมะเร็งที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้ อย่างไรก็ตามอาจเพิ่มประสิทธิภาพของระบบทดสอบได้หากศึกษาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไคเนสเพิ่มเติม เช่น pH อุณหภูมิ ปริมาณ Mg^{2+} และ Mn^{2+} รวมถึงส่วนประกอบในสารละลายบัฟเฟอร์ และอาจนำไปปรับเปลี่ยนเพื่อประยุกต์ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ที่จำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสชนิดใดชนิดหนึ่งได้โดยใช้ไทโรซีนไคเนสที่บริสุทธิ์หรือใช้ cell lysate ของเซลล์ที่ถูกทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจเพิ่มสูงขึ้นจากการนำยีนของโปรตีนดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องทำการตรวจสอบและศึกษาสถานะที่เหมาะสมเพิ่มเติม

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาระบบทดสอบสำหรับวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งระบบทดสอบดังกล่าวสามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ครอบคลุมไทโรซีนไคเนสหลายชนิด และประหยัดต้นทุน การทดสอบความใช้ได้ของระบบ พบว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านมะเร็งที่มีกลไกยับยั้งไทโรซีนไคเนส มีความ

คงทนต่อตัวทำละลาย และสามารถทำซ้ำได้ เมื่อนำระบบที่พัฒนามาทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรจำนวนมาก พบสารที่แสดงฤทธิ์จริง ระบบทดสอบนี้จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้สำหรับคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากสารหลายชนิด เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจระบุชนิดพันธุ์พืช และจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิง

เอกสารอ้างอิง

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209–49.
2. กลุ่มข้อมูลข่าวสารสุขภาพ. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2562. นนทบุรี: กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2563. หน้า 78–79.
3. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*. [serial online]. 2015; [cited 2021 Oct 21]; 5(4): [6 screens]. Available from: URL: <https://biomedicine.cmu.edu.tw/doc/17-1.pdf>.
4. Gocek E, Moulas AN, Studzinski GP. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 51(3): 125–37.
5. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. [serial online]. 2018; [cited 2021 Oct 21]; 17: [13 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
6. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: breakthrough and

- challenges of targeted therapy. *Cancers*. [serial online]. 2020; [cited 2021 Oct 21]; 12(3): [17 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3390/cancers12030731>.
7. Metibemu DS, Akinloye OA, Akamo AJ, Ojo DA, Okeowo OT, Omotuyi IO. Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in cancer treatments. *Egypt J Med Hum Genet*. [serial online]. 2019; [cited 2021 Oct 21]; 20(1): [16 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0035-0>.
 8. Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U, Wilson JC, Anderson WB. Rapid filtration assays for protein kinase C activity and phorbol ester binding using multiwell plates with fitted filtration discs. *Anal Biochem* 1992; 206(1): 24-35.
 9. Nakayama GR, Nova MP, Parandoosh Z. A scintillating microplate assay for the assessment of protein kinase activity. *J Biomol Screen* 1998; 3(1): 43-8.
 10. Park YW, Cummings RT, Wu L, Zheng S, Cameron PM, Woods A, et al. Homogeneous proximity tyrosine kinase assays: scintillation proximity assay versus homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal Biochem* 1999; 269(1): 94-104.
 11. Kumar EA, Charvet CD, Lokesh GL, Natarajan A. High-throughput fluorescence polarization assay to identify inhibitors of Cbl(TKB)-protein tyrosine kinase interactions. *Anal Biochem* 2011; 411(2): 254-60.
 12. Rodems SM, Hamman BD, Lin C, Zhao J, Shah S, Heidary D, et al. A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases. *Assay Drug Dev Technol* 2002; 1(1): 9-19.
 13. Koresawa M, Okabe T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase. *Assay Drug Dev Technol* 2004; 2(2): 153-60.
 14. King IC, Feng M, Catino JJ. High throughput assay for inhibitors of the epidermal growth factor receptor-associated tyrosine kinase. *Life Sci* 1993; 53(19): 1465-72.
 15. Baumann CA, Zeng L, Donatelli RR, Maroney AC. Development of a quantitative, high-throughput cell-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of colony-stimulating factor-1 receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 60(1): 69-79.
 16. Zhang XH, Guo XN, Zhong L, Luo XM, Jiang HL, Lin LP, et al. Establishment of the active catalytic domain of human PDGFR β tyrosine kinase-based ELISA assay for inhibitor screening. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770(10): 1490-7.
 17. Angeles TS, Steffler C, Bartlett BA, Hudkins RL, Stephens RM, Kaplan DR, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for trkA tyrosine kinase activity. *Anal Biochem* 1996; 236(1): 49-55.
 18. Bauer SM, Gehringer M, Laufer SA. A direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative evaluation of Janus kinase 3 (JAK3) inhibitors. *Anal Methods* 2014; 6(21): 8817-22.
 19. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res*. [serial online]. 2009; [cited 2021 Oct 21]; 38: [8 screens]. Available from URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1005>.
 20. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21(3): 389-95.
 21. Ghosh G, Yan X, Kron SJ, Palecek SP. Activity assay of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in triple-negative breast cancer cells using peptide-conjugated magnetic beads. *Assay Drug Dev Technol* 2013; 11(1): 44-51.
 22. Iversen PW, Beck B, Chen YF, Dere W,

- Devanarayan V, Eastwood BJ, et al. HTS assay validation. In: Assay guidance manual. [online]. 2012; [cited 2021 Oct 21]: [26 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83783>.
23. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4(2): 67-73.
24. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. In: Assay guidance manual. [online]. 2012; [cited 2021 Oct 21]: [25 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>.
25. Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics* 2011; 3(1): 107-24.
26. Settasupana K, Pruksakorn P, Leunchai-chaweng A, Prachasuphap A, Dhepakson P. Cloning, expression and purification of human CXCL12 alpha recombinant protein. Poster session presented at: The 24th Annual Medical Sciences Conference; Thailand. [online]. 2016 Jun 1-3; [cited 2021 Oct 21]: [1 screen]. Available from: URL: <http://e-library.dmhc.moph.go.th/ebooks/files/P2-11%20กัญจรัตน์.pdf>.
27. Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zárate-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, et al. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gαi/mTORC1 axis. *FASEB J* 2015; 29(3): 1056-68.
28. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 2011; 162(6): 1239-49.
29. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl 4): S9-15.
30. Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, et al. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105(1): 131-8.
31. Chung CY, Yeh KT, Hsu NC, Chang JHM, Lin JT, Horng HC, et al. Expression of c-kit proto-oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 217(2): 231-6.
32. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. [serial online]. 2011; [cited 2021 Oct 21]; 7(1): [8 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1038/msb.2011.81>.
33. Herskovits TT, Gadegbeku B, Jaillet H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J Biol Chem* 1970; 245(10): 2588-98.
34. Tjernberg A, Markova N, Griffiths WJ, Hallén D. DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen* 2006; 11(2): 131-7.
35. Lestari D, Kartika R, Marlina E. Antioxidant and anticancer activity of Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb on leukemia cells L1210. *J Phys Conf Ser*. [serial online]. 2019; [cited 2021 Oct 21]: 1277: [7 screens]. Available from: URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1277/1/012022>.
36. Suwarso E. The apoptosis effects of ethylacetate extract of Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. against T47D cells. *Int J PharmTech Res* 2014-2015; 7(3): 535-9.
37. Widowati W, Wijaya L, Wargasetia T, Bachtiar I, Yellianty Y, Laksmitawati D. Antioxidant, anticancer, and apoptosis-inducing effects of Piper extracts in Hela cells. *J Exp Integr Med* 2013; 3(3): 225-30.
38. Boontha S, Taowkaen J, Phakwan T, Worauai-cha T, Kamonnate P, Buranrat B, et al. Evaluation of antioxidant and anticancer effects of Piper betle L (Piperaceae) leaf extract on MCF-7 cells, and preparation of transdermal patches of the extract. *Trop J Pharma Res* 2019; 18(6): 1265-72.
39. Duong TH, Bui XH, Pogam PL, Nguyen

- HH, Tran TT, Nguyen TAT, et al. Two novel diterpenes from the roots of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeel. *Tetrahedron* 2017; 73(38): 5634–8.
40. Geng HC, Zhu HT, Yang WN, Wang D, Yang CR, Zhang YJ. New cytotoxic dichapetalins in the leaves of *Phyllanthus acidus*: Identification, quantitative analysis, and preliminary toxicity assessment. *Bioorg Chem.* [serial online]. 2021; [cited 2021 Oct 21]; 114: [6 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105125>.
41. Kwan YP, Saito T, Ibrahim D, Al-Hassan FM, Ein Oon C, Chen Y, et al. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. *Pharm Biol* 2016; 54(7): 1223–36.
42. Silva GL, Kinghorn AD, Lee IS. Special problems with the extraction of plants. In: Cannell RJP, editors. *Natural products isolation*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 343–363.
43. Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of Punicalin and Punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloyl-punicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem Pharm Bull* 1986; 34(2): 650–5.
44. Ahmad W, Singh S, Kumar S. Phytochemical screening and antimicrobial study of *Euphorbia hirta* extracts. *J Med Plants Stud* 2017; 5(2): 183–6.

Development of Tyrosine Kinase Inhibitor Screening Assay for Anti-cancer Agents

Parnuphan Panyajai, Patamaporn Pruksakorn, Pantida Treeyoung, Chattraporn Jaima, and Panadda Dhepakson

Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Tyrosine kinases play a key role in various cellular signaling pathways, linking to proliferation, migration, invasion and angiogenesis of cancer cells. Many of these are therapeutic targets for the treatment of cancers. This study aimed to develop the tyrosine kinase inhibitor assay for compound library screening. The assay development was started by investigating the expression levels of genes associated with these proteins in four cancer cell lines by quantitative real-time PCR, and measuring the tyrosine kinase activity of each cell lysate by ELISA. HeLa cell was chosen for the development. We further optimized the assay conditions, and the following were found: cell lysate, 0.125 mg/mL; peptide substrate, 0.25 µg/well; ATP, 25 nM; and incubation time of 30 minutes was suitable for the kinase reaction. The assay system was verified by using anti-cancer agents. The results showed that tyrosine kinase inhibitors decreased the assay signal. We also validated this assay by quantitative measurement of signal variability. It was shown that all parameters met the acceptance criteria, indicating that this assay was reproducible and suitable for screening. This developed assay was also used to test 180 medicinal plant extracts, and the active extracts were further tested by MTT and transmembrane assays. The results showed that some extracts exhibited potential anti-cancer activity in cell lines. Thus, the developed assay could be used for screening of tyrosine kinase inhibitors in a large number of samples.

Keywords: Cancer, Tyrosine kinase inhibitor screening assay, Tyrosine kinase inhibitors, Cancer therapeutic targets