# ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดคูซูโนไคนินจากพริกไทยดำในหนูขาว ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร NMU

# ANTICANCER ACTIVITY OF KUSUNOKININ EXTRACT FROM *PIPER NIGRUM* IN NMU-INDUCED MAMMARY TUMOR RATS

ศิรินภา ดอกดวง[1] อามานร์ เทศอาเส็น[2] ศิริพร หมาดหล้า[3] สมชาย ศรีวิริยะจันทร์[4]
และ พจนพร ไกรดิษฐ์[5*]

[1] ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, อีเมล์ 5910220064@email.psu.ac.th

[2] ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, อีเมล์ ibnuidris1@gmail.com

[3] ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, อีเมล์ msuneeya@yahoo.com

[4] ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, อีเมล์ somchai.sr@psu.ac.th

[5] ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, อีเมล์ gpotchan@medicine.psu.ac.th

---------------------------------

## บทคัดย่อ

สารคูซูโนไคนิน เป็นสารบริสุทธิ์ชนิดลิกแนนจากพริกไทยดำ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ MCF-7 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของสารคูซูโนไคนิน ในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วยสาร N-nitroso-N-methylurea (NMU) ผลการทดลองพบว่าสารคูซูโนไคนินสามารถควบคุมการเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็ง โดยสัตว์ทดลองที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 2.25 4.5 และ 9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีอัตราการเพิ่มขึ้นของขนาดก้อนมะเร็งอยู่ในช่วง 10 – 30 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อวัน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุม (control) ที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของขนาดก้อนมะเร็งเท่ากับ 360 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อวัน บ่งบอกว่าสารคูซูโนไคนินมีผลรบกวนกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ระดับโปรตีนในก้อนมะเร็งจากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 2.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าระดับของโปรตีน Cyclin D1 และ Wnt-4 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าสารคูซูโนไคนินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น และผลจากการวิเคราะห์ระดับโปรตีนในก้อนมะเร็งจากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีระดับของโปรตีน E-cadherin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะระหว่างโมเลกุลเพิ่มขึ้น ผลจากการศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินทั้ง *in vitro* และ *in vivo* บ่งบอกว่าสารคูซูโนไคนินมีฤทธิ์ต้านการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้จะถูกนำไปใช้ในการออกแบบกลุ่มการทดลอง และจำนวนสัตว์ทดลองในการทดลองหลักของการศึกษาคุณสมบัติในการรักษามะเร็งของสารคูซูโนไคนินต่อไป

**คำสำคัญ:** การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์, คูซูโนไคนิน, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

## ABSTRACT

Kusunokinin, lignan isolated from *Piper nigrum*, was reported to have antiproliferation and induction of apoptosis on breast cancer cells, MDA-MB-468 and MCF-7. This preliminary study aimed to investigate the anticancer activity of kusunokinin in animal models, N-nitroso-N-methylurea (NMU) – induced Sprague-Dawley rats. Rats treated with 2.25, 4.5 and 9 mg/kg kusunokinin were significantly lower in the growth rate of tumor volume (10 -30 $mm^3$/day) when compared with the control group (~360 $mm^3$/day). The results suggested that kusunokinin may interfere with cancer cell proliferation. Therefore, the levels of protein involved in cell proliferation process were quantified by Western blotting and found that levels of protein Cyclin D1 and Wnt-4 were reduced in rats treated with 2.25 mg/kg kusunokinin.

In addition, kusunokinin presented antimigration activity on MCF-7 cells in dose-dependent manner and level of E-cadherin, protein belongs to a family of cell adhesion molecule in rats treated with 4.5 mg/kg kusunokinin was also increased. The obtained data indicated that kusunokinin performed antiproliferation and antimigration activities in both *in vitro* and *in vivo*. The outcome from this preliminary study provide the information necessary for designing the group of treatment and size of animal in the main trial for further investigate on the anticancer activity of kusunokinin.


**Keywords:** anticancer, anti-migration, kusunokinin

## 1. บทนำ

การรักษามะเร็งเต้านมด้วยการใช้เคมีบำบัดเป็นการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ยังพบว่าผู้ป่วยจำนวนมากได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปากแห้ง ผมร่วง ติดเชื้อง่าย ซีด และเลือดออกง่าย เป็นต้น (ศิริมาศและวิจิตรา, 2551) ส่งผลให้การรักษาโรคมะเร็งเต้านมมักไม่ประสบผลสำเร็จ และนอกจากนั้นยังมีรายงานถึงการดื้อยาร่วมด้วย จากปัญหาดังกล่าว ในปัจจุบันจึงได้มีการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมาใช้ ซึ่งเป็นอีกแนวทางในการรักษาโรคมะเร็ง และลดการดื้อยา

พริกไทย (*Piper nigrum*) เป็นเครื่องเทศรสเผ็ดที่ใช้ในการปรุงอาหาร และมีประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆ โดยพริกไทยปรากฏเป็นส่วนผสมในตำรับยาหลายชนิด เช่น ตำรับยาเลือด ตำรับยาจุกเสียด ตำรับยาแก้กษัย ตำรับยาแก้ทางเสมหะ หอบหืด ตำรับยาแก้ซาง ตำรับยาแก้ริดสีดวง เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ของพริกไทย และพบว่าสารออกฤทธิ์สำคัญในพริกไทย ประกอบด้วย อัลคาลอยด์ ลิกแนน และเทอร์ปีน (Parmar et al., 1997) สารพิเพอรีน (piperine) เป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่พบมากที่สุดในพริกไทยดำ โดยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่างๆ ของสารพิเพอริน เช่น พบว่าสารสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเพาะเลี้ยงชนิด LNCaP, PC-3 และ DU-145 โดยลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต ได้แก่ p-STAT3 และ NF-kB (Abhilash et al., 2013) ในเซลล์มะเร็งเต้านมกลุ่ม triple-negative breast cancer (TNBC) พบว่าสารพิเพอรินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยเพิ่มระดับโปรตีน p21 ลดระดับโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 (Greenshields et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิเพอรินมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ได้ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 9.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sakpakdeejaroen & Itharat, 2009) แต่ทั้งนี้พบว่าเมื่อให้สารพิเพอรินแก่หนูทดลองจะมีความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ม้าม ต่อมไทมัส ต่อมน้ำเหลือง (Dogra, Khanna & Shanker, 2004)

และเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ของหนู (Daware, Mujumdar & Ghaskadbi, 2000) ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาสารสกัดจากพริกไทยดำที่แยกพิเพอรีนออก (piperine free *P. nigrum* extract; PFPE) พบว่า PFPE มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ MCF-7 (Sriwiriyajan, Ninpesh, Sukpondma, Nasomyon, & Graidist, 2014) และสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งและลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านมในหนูทดลองได้ โดยสาร PFPE มีผลลดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต ได้แก่ c-Myc, VEGF และ topoisomerase II และมีผลต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ โดยลดระดับโปรตีน bcl-2 และเพิ่มระดับโปรตีน p53 และ bax (Deng, Sriwiriyajan, Tedasen, Hiransai, & Graidist, 2016; Sriwiriyajan et al., 2016)

เมื่อนำ PFPE ไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (การแยกส่วนประกอบ และการตรวจสอบเอกลักษณ์) จะได้สารคูซูโนไคนิน (kusunokinin) (Sriwiriyajan, Sukpondma, Srisawat, Madla, & Graidist, 2017) ทั้งนี้สารคูซูโนไคนินสามารถสกัดได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Aristolochia cymbifera, Wikstromia indica, Haplophyllum vulcanicum* และ *Wikstroemia sikokiana* (Awale et al., 2014; Belkis, Tekant, Daniel & Manfr, 1996; Tomoya, Toshiaki and Mikio, 2000) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินในด้านต่างๆ เช่น เป็นพิษต่อปรสิต *Trypanosoma cruzi* โดยให้ค่า $IC_{50}$ ต่อปรสิตในระยะที่อยู่ภายในเซลล์ (amastigotes) เท่ากับ 17 ไมโครโมลาร์ และต่อปรสิตที่อยู่ในกระแสเลือด (trypomastigotes) เท่ากับ 51 ไมโครโมลาร์ (de Barros et al., 2005; Sartorelli, Carvalho, Reimão, Lorenzi, & Tempone, 2010) ในด้านการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสารคูซูโนไคนินที่แยกได้จากพริกไทยดำมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และ MDA-MB-468 ได้ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 4.37 และ 3.19 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินต่อเซลล์มะเร็งคือ (1) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยลดระดับโปรตีน topoisomerase II เพิ่มระดับโปรตีน p21 (2) ชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยลดระดับโปรตีน bcl-2 และเพิ่มระดับของโปรตีน p53, bax, cytochrome c, caspase-3, caspase-7 และ caspase-8 (Sriwiriyajan et al., 2017)

ผลจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารคูซูโนไคนินมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อศึกษาคุณสมบัติในการรักษามะเร็งเต้านมของสารคูซูโนไคนินในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วยสาร NMU ตลอดจนศึกษากลไกระดับโมเลกุลและการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินในการรักษามะเร็งเต้านมที่มีจำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่มเพิ่มขึ้นต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์การวิจัย

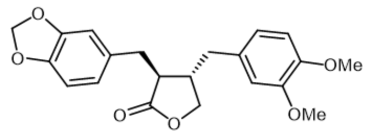
1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay

2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการรักษามะเร็งเต้านมของสารคูซูโนไคนินในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร NMU และศึกษาระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต (proliferation) และกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) ในก้อนมะเร็งด้วยวิธี Western blot analysis

**3. การดำเนินการวิจัย**

**3.1 สารคูซูโนไคนิน**

สารคูซูโนไคนินที่ใช้ในการศึกษา เป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพริกไทยดำ โดยใช้วิธีการสกัดและทำบริสุทธิ์ตามวิธีการของ Sriwiriyajan และคณะ (2017) โครงสร้างสารดังรูปที่ 1




รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารคูซูโนไคนิน

**3.2 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7**

เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วยอาหาร Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640) ที่มี penicillin ความเข้มข้น 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร streptomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร fetal bovine serum ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ L-glutamine ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80

**3.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี Wound healing assay**

เลี้ยงเซลล์ MCF-7 จำนวน 8 x $10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 12 หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นขูดเซลล์ด้วยทิปขนาด 200 ไมโครลิตร ให้เป็นแนวเส้นตรงผ่านกลางหลุม และล้างเศษเซลล์ที่ขูดออกด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุม) และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารคูซูโนไคนินที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.286, 0.571 และ 0.857 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) และทำการวัดความกว้างของรอยแผลที่ขูดที่เวลา 0 ชั่วโมง นำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ และถ่ายรูปเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วจึงคำนวณเป็นร้อยละของการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้วิธีคำนวณของ Li และคณะ (2017) แสดงดังสมการ

$$The\ rate\ of\ migration\ (\%) = 100 \times \frac{\text{wound healing width at } t_0 - \text{wound healing width at } t_1}{\text{wound healing width at } t_0}$$

Wound healing width at $t_0$ คือ ความกว้างของรอยแผลที่ขูดที่เวลา 0 ชั่วโมง

Wound healing width at $t_1$ คือ ความกว้างของรอยแผลที่ขูดที่เวลาต่างๆ (24 48 และ 72 ชั่วโมง)

**3.4 สัตว์ทดลอง และก้อนมะเร็งเต้านม**

ก้อนมะเร็งเต้านมที่ใช้ในการทดลอง เป็นก้อนมะเร็งเต้านมที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ของสาร kusunokinin จากพริกไทยดำในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งเต้านม (Ref. 01/59)” ภายใต้การกำกับดูแลของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ การดูแลและปฏิบัติต่อสัตว์ทดลอง เป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองแห่งชาติ

หนูขาวสายพันธุ์ Sprague – Dawley เพศเมียถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งเต้านมด้วยสาร N-nitroso-N-methylurea (NMU) หลังจากตรวจพบก้อนมะเร็ง หนูขาวจะได้รับยาเคมีบำบัด (doxorubicin) หรือสารคูซูโนไคนินในขนาดที่แตกต่างกัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงขนาดของก้อนมะเร็งเต้านม และเก็บก้อนมะเร็งเต้านมหลังสิ้นสุดการทดลอง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Western blotting โดยแบ่งหนูขาวออกเป็น 6 กลุ่ม และให้สารทดสอบตามแต่ละกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ (1) กลุ่ม Normal หนูกลุ่มนี้ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง เลี้ยงโดยให้อาหารและน้ำตามสภาวะปกติ (2) กลุ่ม Control เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสาร NMU แต่ไม่ให้สารชนิดใดเพิ่ม (3) กลุ่ม Dox 3 เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสาร NMU และให้ doxorubicin ขนาด 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ (4)-(6) เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสาร NMU และให้สาร kusunokinin ขนาด 2.25 4.5 และ 9.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ

**3.5 การศึกษาระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Western blot analysis**

เก็บก้อนมะเร็งเต้านมในหนูกลุ่มที่ 2 ถึง 6 มาสกัดและแยกโปรตีนตามวิธีการของ Sriwiriyajan และคณะ (2015) โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต ได้แก่ Wnt-4, c-Src, Erk1/2 และ Cyclin D1 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ได้แก่ E-cadherin, MMP-2 และ MMP-9 โดยใช้ GAPDH เป็น internal control และบ่มด้วย secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเมมเบรนไปประกบฟิล์มเพื่อดูระดับของโปรตีนหรือนำไปวัดด้วยเครื่อง fusion FX CCD นำผลที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีน (band intensity) ด้วยโปรแกรม Image J

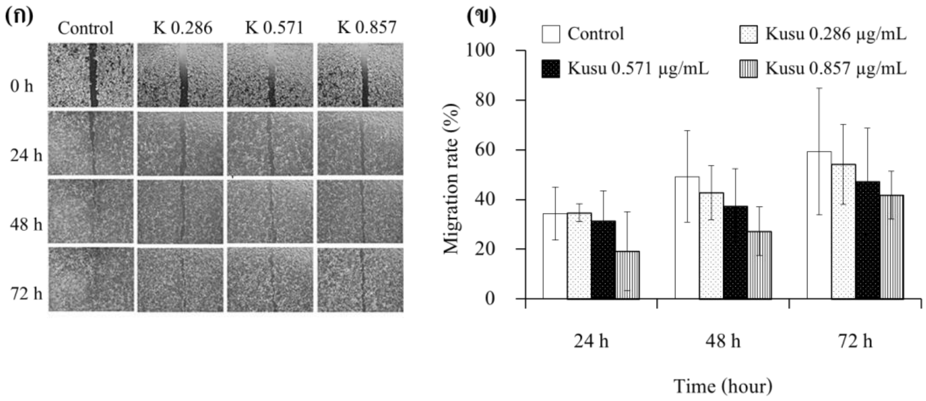
**3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D.) ระดับของโปรตีนรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D.) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างหนูกลุ่ม control และกลุ่ม treatment โดยใช้ One way ANOVA หาก *p-value* $\leq 0.05$ ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**4. ผลการวิจัย**

**4.1 ฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7**

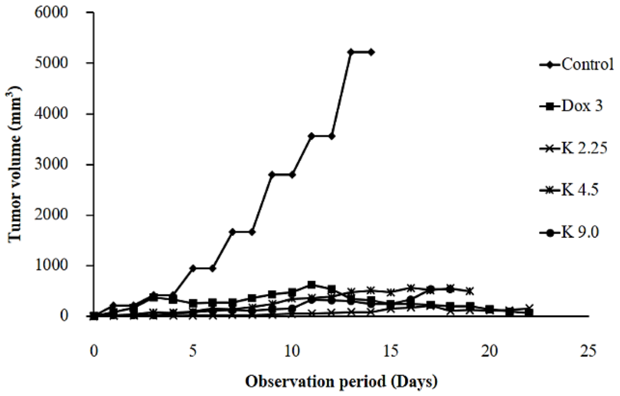
Wound healing assay เป็นวิธีการที่ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านช่องว่าง โดยทำการขูดตรงบริเวณกลางเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเคลื่อนที่เกิดขึ้นช่องว่างที่ขูดก็จะแคบลง จากการศึกษากระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ (control) มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 59.39 ส่วนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารคูซูโนไคนินที่ความเข้มข้น 0.286, 0.571 และ 0.857 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 54.09, 47.24 และ 41.79 ตามลำดับ จากผลการศึกษาจะเห็นว่าสารคูซูโนไคนินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 2 ดังนั้นสารคูซูโนไคนินอาจช่วยลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนต่างๆได้




รูปที่ 2 (ก) ฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ MCF-7 ด้วยวิธี Wound healing assay (ข) ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ MCF-7 ที่ได้รับสารคูซูโนไคนินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D.) (N=3)

**4.2 ฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินต่อการยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งเต้านมในหนูขาว**

หลังจากตรวจพบก้อนมะเร็งเต้านม หนูขาวจะได้รับยาเคมีบำบัด (doxorubicin) และสารคูซูโนไคนินขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 14-22 วัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าขนาดของก้อนมะเร็งในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดหรือสารคูซูโนไคนิน มีขนาดเล็กกว่าก้อนมะเร็งในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าก้อนมะเร็งในหนูขาวกลุ่ม control มีอัตราการเพิ่มขึ้นของ tumor volume สูงที่สุด (~ 360 $mm^3$/Day) ในขณะที่หนูที่ได้รับสารคูซูโนไคนินมีอัตราการเพิ่มขึ้นของ tumor volume อยู่ในช่วง 10-30 $mm^3$/Day ส่วนหนูขาวที่ได้รับ doxorubicin พบว่าปริมาตรของก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นและเริ่มลดลงหลังจากได้รับยาเป็นเวลา 11 วัน จากผลการศึกษาจะเห็นว่าสารคูซูโนไคนินมีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้

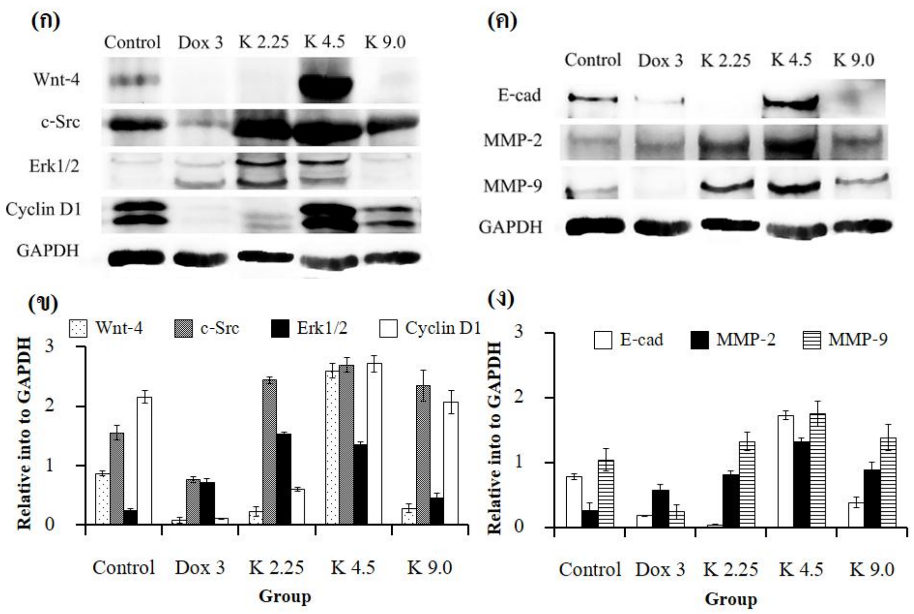



รูปที่ 3 ผลของสารคูซูโนไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของก้อนมะเร็งในหนูขาวที่ได้รับการกระตุ้นให้เป็นมะเร็งด้วยสาร NMU

**4.3 ฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินต่อระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ ในก้อนมะเร็งเต้านมของหนูขาวที่ได้รับสาร NMU**

นำก้อนมะเร็งมาสกัดโปรตีนและตรวจสอบระดับของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Western blot analysis โดยจากการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 2.25 มี

ระดับโปรตีน Cyclin D1 และ Wnt-4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 2.25 และ 9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีระดับโปรตีน E-cadherin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ามีระดับ E-cadherin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 เพิ่มขึ้น ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารคูซูโนไคนินขนาด 2.25-9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และลดลงเล็กน้อยในหนูกลุ่มที่ได้รับ doxorubicin ดังรูปที่ 4




รูปที่ 4 ระดับของโปรตีนในก้อนมะเร็งของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วยสาร NMU (ก และ ค) ผลการตรวจสอบระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Western blot analysis (ข และ ง) ระดับของโปรตีนรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

**5. การอภิปรายผลและบทสรุป**

การนำสารสำคัญจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ มาใช้ในการรักษามะเร็ง นับเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้กับผู้ป่วยเพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับอาการข้างเคียงที่พบ และการดื้อยา รวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดียิ่งขึ้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารคูซูโนไคนินเป็นสารบริสุทธิ์ชนิดลิกแนนจากพริกไทยดำ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ MCF-7 ทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Sriwiriyajan et al., 2017) จากการศึกษาเพิ่มเติม พบว่าสารคูซูโนไคนินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยผลการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ผลที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สามารถควบคุมได้ง่าย บ่งบอกว่าสารคูซูโนไคนินจากพริกไทยดำมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม นำมาสู่การศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) ที่ลงลึกในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารคูซูโนไคนินจากพริกไทยดำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสาร NMU

ผลการศึกษาพบว่าสารคูซูโนไคนินจากพริกไทยดำสามารถควบคุมอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาตรก้อนมะเร็งได้ โดยหนูขาวที่ได้รับสารคูซูโนไคนินมีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาตรก้อนมะเร็งอยู่ในช่วง 10-30 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อวัน ในขณะนี้หนูขาวกลุ่ม control (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ เพิ่ม) มีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาตรก้อนมะเร็ง 360 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อวัน ดังนั้นฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินจากพริกไทยดำจึงอาจมีผลเกี่ยวข้องกับการรบกวนกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง จึงทำการสกัดโปรตีนจากก้อนมะเร็งเพื่อศึกษาระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต จากการศึกษาจะเห็นว่า doxorubicin และสารคูซูโนไคนินขนาด 2.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถลดระดับโปรตีน Wnt-4 และ Cyclin D1 ซึ่งโปรตีน Wnt-4 หรือโมเลกุลบางอย่างที่เป็นส่วนประกอบของวิถีสัญญาณนี้จะทำหน้าที่เพิ่มการแสดงออกของ Cyclin D1 ดังนั้นการลดระดับของโปรตีน Wnt-4 อาจมีผลให้ระดับ Cyclin D1 ลดลงไปด้วย ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ $G_1$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sriwiriyajan และคณะ (2017) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารคูซูโนไคนินในระดับเซลล์ พบว่าสารสามารถทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ $G_2$/M และเมื่อศึกษากลไกระดับโมเลกุลพบว่าสารคูซูโนไคนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส โดยลดระดับโปรตีน topoisomerase II และเพิ่มระดับโปรตีน p21 ซึ่งจะทำให้เกิดความเสียหายของ DNA ส่งผลให้วัฏจักรเซลล์หยุดลง จากนั้น p53 จะกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสเพื่อทำลายเซลล์ที่มีความเสียหายต่อไป จึงส่งผลให้ก้อนมะเร็งเต้านมของหนูในกลุ่มที่ได้รับ doxorubicin หรือสารคูซูโนไคนินมีขนาดลดลง ซึ่งผลที่ได้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารโพโดฟิลโลทอกซิน (Podophyllotoxin) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารคูซูโนไคนิน ที่สกัดได้จากรากของพืชในกลุ่ม Podophyllum เช่น *P. peltatum*, *P. emodii* และ *P. hexandrum* (Cragg & Newman, 2005) ซึ่งพบว่าสารโพโดฟิลโลทอกซินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด SGC7901 โดยทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ $G_2$/M ส่งผลให้วัฏจักรเซลล์หยุดลง (Zhang, Zhou, Liu, Chen, & Yang, 2008)

ทั้งนี้จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาผลของสารคูซูโนไคนินต่อระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต สามารถนำไปออกแบบการทดลองในครั้งต่อไป โดยทำการออกแบบให้ doxorubicin ร่วมกับสารคูซูโนไคนินในสัตว์ทดลอง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารคูซูโนไคนินให้ดียิ่งขึ้น ดังเช่นการศึกษาของ Girish และคณะ (2004) พบว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่น grape seed extract (GSE) ขนาด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ doxorubicin ขนาด 25-75 นาโนโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 โดยทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ $G_1$ นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 การให้ GSE ร่วมกับ doxorubicin สามารถเพิ่มเซลล์ในระยะ $G_1$ ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ doxorubicin เพียงตัวเดียว

สืบเนื่องจากผลการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าสารคูซูโนไคนินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 จึงได้ทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ในก้อนมะเร็งเต้านม ทั้งนี้การศึกษากลไกการเคลื่อนที่ในระดับโมเลกุลจำเป็นต้องพิจารณาโปรตีน 2 กลุ่ม ได้แก่ (1) E-cadherin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะระหว่างโมเลกุล (van Roy & Berx, 2008) ดังนั้นการสูญเสียหน้าที่หรือการลดปริมาณของ E-cadherin จะชักนำให้เกิดกระบวนการ epithelial mesenchymal transition (EMT) (Larue & Bellacosa, 2005) ทำให้เซลล์มีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ (2) MMP-2 และ MMP-9 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ (Roomi,

Monterrey, Kalinovsky, Rath & Niedzwiecki, 2008) ดังนั้นจากผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ ระดับโปรตีน E-cadherin ควรคงที่หรือเพิ่มขึ้น ส่วน MMP-2 และ MMP-9 ควรลดลง ซึ่งจากการศึกษาระดับของโปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม ในก้อนมะเร็งเต้านมพบว่าสารคูซูโนไคนินขนาด 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถเพิ่มระดับ E-cadherin ส่วนยาเคมีบำบัดสามารถลดระดับ MMP-2 และ MMP-9 ได้

จากผลการศึกษาเบื้องต้นในสัตว์ทดลองสรุปได้ว่าสารคูซูโนไคนินมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลอง เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต โดยลดระดับโปรตีน Wnt-4 และ Cyclin D1 และยับยั้งกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยเพิ่มระดับโปรตีน E-cadherin ส่วน doxorubicin สามารถลดระดับโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งจากการศึกษาจะเห็นว่าการให้ยาเคมีบำบัดและสารคูซูโนไคนินมีผลเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่ต่างชนิดกัน แต่ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) ข้อมูลที่ได้อาจจะยังไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษากลไกของสารเพิ่มเติม และโมเลกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจจะออกแบบการทดลองโดยให้ doxorubicin ร่วมกับสารคูซูโนไคนินในขนาดต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นยาในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมต่อไป

## 6. ข้อเสนอแนะ

ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารคูซูโนไคนินในสัตว์ทดลองที่มีจำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นไปใช้ในการออกแบบการทดลอง ซึ่งใช้การทดลองแบบ complete randomized design โดยแบ่งการทดลองเป็น (1) หนูกลุ่มปกติ (2) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU (3) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับสารคูซูโนไคนินขนาดต่างๆ (4) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU และได้รับ doxorubicin (5) หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร NMU ร่วมกับสารคูซูโนไคนินขนาดต่างๆ คำนวณจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ดังสมการ

$$n = 2[((Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})\sigma)/2]^2$$

โดย - $Z_{\alpha/2}$ คือ ค่าคงที่จากตาราง Z ตามค่า $\alpha = 1.96$

- $Z_{\beta}$ คือ ค่าคงที่จากตาราง Z ตามค่า power การกระตุ้นให้เกิดมะเร็งเต้านมด้วยสาร NMU สามารถทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองชนิด SD rats เพศเมียได้ 80% = 1.28

- D คือ ค่า effect size ในที่นี้ คือ ค่าเปอร์เซ็นต์การลดขนาดก้อนในกลุ่มทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุม = 0.5

- $\sigma$ คือ ค่า standard deviation ของกลุ่มควบคุม = 1

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ใช้หนูขาวเพศเมียสายพันธุ์ Sprague-Dawley ได้รับความอนุเคราะห์จากนายอามานร์ เทศอาเส็น ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และได้รับเงินทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**เอกสารอ้างอิง**

ศิริมาศ กาญจนวาศ, และวิจิตรา ทัศนียกุล. (2551). โมโนโครนอล แอนติบอดี: เป้าหมายของการรักษามะเร็ง. *ศรีนครินทร์เวชสาร, 23*(4), 440-446.

สรายุทธ์ จันทร์มหเสถียร. (2549). ยาต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งไซคลินดีเพนเดนท์ไคเนส. *วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์, 3*(7), 1-15.

Abhilash Samykutty, Aditya Vittal Shetty, Gajalakshmi Dakshinamoorthy, Mary Margaret Bartik, Gary Leon Johnson, … Brian Webb. (2013). Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. *Public Library of Science, 8*(6), e65889.

Awale, S., Kato, M., Dibwe, D. F., Li, F., Miyoshi, C., Esumi, H., … Tezuka, Y. (2014). Antiausterity activity of arctigenin enantiomers: Importance of (2R, 3R)-absolute configuration. *Natural Product Communications, 9*(1), 79-82.

Belkis Gözler, Tekant Gözler, Daniel Rentsch & Manfred Hesse. (1996). Lignans, alkaloids and coumarins from *Haplophyllum vulcanicum*. *Phytochemistry*, *42*(3), 695-699.

Chan, M. M., Lu, X., Merchant, F. M., Iglehart, J. D., & Miron, P. L. (2007). Serial transplantation of NMU-induced rat mammary tumors: A model of human breast cancer progression. *International Journal of Cancer, 121*(3), 474-485.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology, 100*(1-2), 72-79.

Daware MB, Mujumdar AM & Ghaskadbi S. (2000). Reproductive toxicity of piperine in Swiss albino mice. *Planta Medica, 66*(3), 231–236.

de Barros, M., Leal, I. C., Kuster, R. M., Amaral, A. C., Kokis, V., de Silva, M. G., & dos Santos, K. R. (2005). Brazilian phytopharmaceuticals-evaluation against hospital bacteria. *Phytotherapy Research, 19*(6), 519-525.

Deng, Y., Sriwiriyajan, S., Tedasen, A., Hiransai, P., & Graidist, P. (2016). Anti-cancer effects of *Piper nigrum* via inducing multiple molecular signaling *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology, 188*, 87-95.

Dogra RKS, Khanna S & Shanker R. (2004). Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology, 196*(3), 229–236.

Gözler, B., Rentsch, D., Gözler, T., Ünver, N., & Hesse, M. (1996). Lignans, alkaloids and coumarins from *Haplophyllum vulcanicum*. *Phytochemistry 42*(3), 695-699.

Greenshields AL, Doucette CD, Sutton KM, Madera L, Annan H, … Yaffe PB. (2015). Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Letters, 357*(1), 129-140.

Girish Sharma, Anil K. Tyagi, Rana P. Singh, Daniel C.F. Chan, & RajeshAgarwal. (2004). Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment, 85*, 1-12.

Hallman K, Aleck K, Dwyer B, Lloyd V, Quigley M, Sitto N, Siebert AE & Dinda S. (2017). The Effects of Turmeric (Curcumin) on Tumor Suppressor Protein (p53) and Estrogen Receptor (ERα) in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer*, *10*(9), 153-161.

Hsieh, C. J., Kuo, P. L., Hsu, Y. C., Huang, Y. F., Tsai, E. M., & Hsu, Y. L. (2014). Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. *Free Radical Biology & Medicine, 67,* 159-170.

Ikeda R, Nagao T, Okabe H, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M & Mori M. (1998). Anti-proliferative constituents in Umbelliferae plants. IV. Constituents in the fruits of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *6*(46), 875–878.

Intouch Sakpakdeejaroen, & Arunporn Itharat. (2009). Cytotoxic compounds against Breast Adenocarcinoma cell (MCF-7) form Pikutbenjakul. *Journal of Health Research, 23*(2), 71-76.

Larue, L., & Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: Role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene, 24*(50), 7443-7454.

Lee, W., Kim, K. Y., Yu, S. N., Kim, S. H., Chun, S. S., Ji, J. H.,… Ahn, S. C. (2013). Pipernonaline from *Piper longum* Linn. induces ROS-mediated apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 430*(1), 406-412.

Li J, Guo Y, Duan L, Hu X, Zhang X, Hu J, … Luo DX. (2017). AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. *Oncotarget*, *8*(20), 33694-33703.

Lou, C., Zhu, Z., Zhao, Y., Zhu, R., & Zhao, H. (2017). Arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., inhibits metastasis of human breast cancer cells through the downregulation of MMP-2/-9 and heparanase in MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports, 37*(1), 179-184.

Maxwell, T., Chun, S. Y., Lee, K. S., Kim, S., & Nam, K. S. (2017). The anti-metastatic effects of the phytoestrogen arctigenin on human breast cancer cell lines regardless of the status of ER expression. *International Journal of Oncology, 50*(2), 727-735.

Okunishi, T., Umezawa, T., & Shimada, M. (2000). Enantiomeric compositions and biosynthesis of *Wikstroemia sikokiana* lignans. *Journal of Wood Science, 46*(3), 234-242.

Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., & Jha, A. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry, 46*(4), 597-673.

Rajalekshmi DS, Kabeer FA, Madhusoodhanan AR, Bahulayan AK, Prathapan R, Prakasan N, … Nair MS. (2016). Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26*(7), 1767-1771.

Sartorelli, P., Carvalho, C. S., Reimão, J. Q., Lorenzi, H., & Tempone, A. G. (2010). Antitrypanosomal activity of diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. *Planta Medica, 76*(13), 1454-1456.

Scully RC & Livingston DM. (2000). In search of the tumor suppressor functions of BRAC1 and BRCA2. *Nature*, *408*(6811), 429-432.

Sriwiriyajan, S., Ninpesh, T., Sukpondma, Y., Nasomyon, T., & Graidist, P. (2014). Cytotoxicity screening of plants of genus *Piper* in breast cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13*(6), 921-928.

Sriwiriyajan, S., Sukpondma, Y., Srisawat, T., Madla, S., & Graidist, P. (2017). (-)-Kusunokinin and piperloguminine from *Piper Nigrum* : An alternative option to treat breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 92*, 732-743.

Sriwiriyajan, S., Tedasen, A., Lailerd, N., Boonyaphiphat, P., Nitiruangjarat, A., Deng, Y., & Graidist, P. (2016). Anticancer and cancer prevention effects of Piperine-free *Piper nigrum* extract on N-nitrosomethylurea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Journal Cancer Prevention, 9*(1), 74-82.

Thompson, H. J., & Singh, M. (2000). Rat models of premalignant breast disease. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 5*(4), 409–420.

Tomoya Okunishi, Toshiaki UmezawaEmail & Mikio Shimada. (2000). Enantiomeric compositions and biosynthesis of *Wikstroemia sikokiana* lignans. *Journal of Wood Science, 46*(3), 234-242.

van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences , 65*(23), 3756-3788.

Zhang, J., Zhou, C. S., Liu, S., Chen, H., & Yang, C. (2008). Effect of podophyllotoxin on human gastric cancer cell line SGC 7901. *Journal of Central South University, 33*(8), 718-722.