



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจระดับของเอนไซม์ดีสอินทิกริน/เมทัลโลโปรตีเนส (ADAMs) ในซีรัม
ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และศักยภาพในการประยุกต์ใช้ทางคลินิก
(Determination of “A Disintegrin And Metalloproteases” (ADAMs) levels in serum of
cholangiocarcinoma patients and their clinical application potential)

โดย ผศ.ดร จุริรัตน์ ดาดวง และคณะ

ธันวาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจระดับของเอนไซม์ดีสอินทิกริน/เมทัลโลโปรตีเนส (ADAMs) ในซีรัม
ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และศักยภาพในการประยุกต์ใช้ทางคลินิก
(Determination of “A Disintegrin And Metalloproteases” (ADAMs) levels in serum of
choolangiocarcinoma patients and their clinical application potential)

คณะผู้วิจัย และสังกัด

ผศ.ดร. จุริรัตน์ ดาดวง (ผู้อำจ)*

รศ.ดร.เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์*

รศ.ดร.พัชรีย์ เจียรนัยกูร*

รศ.ดร.บรรจบ ศรีภา**

รศ.นพ.วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์***

* สายวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ** ภาควิชาพยาธิวิทยา
และ *** ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาเรื่องการตรวจระดับของเอนไซม์ดีฮิดรอนิกโรน/เมทิลโลโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และศักยภาพในการประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ดำเนินการเสร็จตามวัตถุประสงค์ทั้งนี้เพราะได้รับการสนับสนุนในด้านต่าง ๆ จากบุคลากรหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และอาสาสมัครปกติที่ได้อุทิศตัวอย่างซีรัมในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้การสนับสนุนด้านข้อมูลคนไข้และตัวอย่างซีรัม

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ที่อำนวยความสะดวก รวมทั้งสนับสนุน เครื่องมือและอุปกรณ์ ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประเภททุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2549

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปี 2550 ตลอดจนขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

โปรตีน “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) จัดอยู่ในแฟมิลี transmembrane ทำหน้าที่เป็น proteinase เร่งการย่อยสลาย extracellular matrix proteins และ integral membrane ดังนั้นโปรตีน ADAMs จึงมีบทบาทในการควบคุมการเกาะติดกันระหว่างเซลล์ และการทำลาย basement membrane ดังนั้นเอนไซม์นี้อาจเร่งการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้างรากฐานของเซลล์ข้างเคียงมะเร็งปฏภูมิ และ/หรือ เชื้อแบคทีเรียเลือด ก่อนที่มะเร็งจะแพร่ลุกลามออกไป กลุ่มผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาระดับของโปรตีน ADAM 12 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติโดยวิธี western blot analysis โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 57 ราย และ ซีรัมคนปกติจำนวน 18 ราย ซึ่งผู้ป่วยทุกรายมีผลทางพยาธิวิทยายืนยันว่าเป็นมะเร็ง จากนั้นทำการประเมินค่าที่ตรวจวัดได้เพื่อหาค่าจุดตัดที่เหมาะสมโดยวิธี Receiver Operating Characteristic (ROC) curve จึงได้ค่า cut-off ของความหนาแน่นที่ 3380 จากนั้นทดสอบ diagnosis value ของจุดตัดดังกล่าว พบว่ามี % sensitivity เท่ากับ 84 % และ % positive predictive value เท่ากับ 87 % เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ ADAM 12 ที่ตรวจวัดได้ระหว่างกลุ่มคนปกติ และในกลุ่มผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของ ADAM 12 ในซีรัมสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จากผลการศึกษาดังกล่าวการศึกษานี้ได้ทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีน ADAM12 จากซีรัมรวมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธีโครมาโตกราฟี โดยใช้ Q-FF (Fast Flow) ซึ่งเป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) และจากการทำ SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนหนึ่งแถบขนาด ~ 92 KDa ซึ่งมีขนาดเท่ากับโปรตีน ADAM12 ในการประเมินความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM12 ด้วยสมุนไพรรักษาซึ่งใช้น้ำสกัดจากสมุนไพรรักษา 25 ชนิดพบว่าสมุนไพรรักษาที่ให้ผลการยับยั้งการย่อยสลายเจลาติน (Gelatinase activity) มากที่สุดคือ ตะขบหิน (*Platyclada (F.b. Muell.) Meissn*) ซึ่งสามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 92.3 ส่วนสมุนไพรรักษาตัวอื่นๆที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์รองลงมาคือ บุนนาค (*Mesua ferrea* Linn), หวาย(*Calamus siamensis*) ,ผักชีฝรั่ง (*Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Hill), ละหุ่ง (*Ricinus communis* L) ซึ่งผลการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 81.5, 78.3, 77.9 และ 74.7 ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรรักษาในครั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่จะนำสมุนไพรรักษาดังกล่าวมาใช้เป็นยาที่ช่วยในการรักษาโรคมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามสมุนไพรรักษาที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ยังไม่มีข้อมูลพื้นฐาน ความรู้หรืองานวิจัยที่ช่วยสนับสนุน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นเพียงการศึกษาขั้นต้นที่นำไปสู่การวิจัยหาสารเคมีหรือสารที่ทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการลุกลามของมะเร็งต่อไป

Abstract

The “a distintegrin and metalloprotease” (ADAM) family contributes to regulation of the cell-cell and cell-matrix interaction that are critical determinants of malignancy. It also play important roles in the degradation of the basement membrane during tumor invasion. To establish the diagnostic utility of serum ADAM protein for patients with cholangiocarcinoma (CCA), the serum ADAM 12 was determined in 75 pathologically confirmed, 57 with CCA and 18 healthy people by western blot analysis. The ability of test was verified using an analysis of Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. The mean value of serum ADAM 12 in CCA patients was significantly higher than healthy people ($p < 0.001$). The area under the ROC curve was 0.8055. A cut-off value of 3380 densitometry units discriminated between the CCA and healthy group with a sensitivity of 84 % and a positive predictive value of 87 %. This study provided good differentiating between CCA and healthy people as diagnostic tool. Therefore, the human ADAM12 was purified from cholangiocarcinoma patient's pooled serum using simple chromatographic procedure. The enzyme was purified using Q-FF (Fast Flow) strong anion exchange chromatographic media. Results showed a single band of approximately 92 KDa protein in SDS-PAGE, corresponding to the human ADAM 12. The water extracts obtained from 25 plants were then evaluated for enzyme inhibition. The strongest inhibitory effect on gelatinase activity is *Platyclada* (F.b. Muell.) Meissn at 92%. *Mesua ferrea* Linn., *Calamus siamensis*, *Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Hill, *Ricinus communis* L also showed potent enzyme inhibitor at 81.5%, 78.3%, 77.9% and 74.7 %, respectively. The result of this study suggests that these plants are helpful and possibly used for cancer therapeutic natural agent. However, most are utilized without appropriate base knowledge or research support. This study is a basic study leading to further research works to find out chemicals or agents which function as critical components.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1.ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตของคนไทยในปัจจุบัน มะเร็งเกิดจากเซลล์ในร่างกายสูญเสียการควบคุมการแบ่งเซลล์และการเพิ่มจำนวน โดยเซลล์มะเร็งจะกระจายตัวแทรกซึมและเบียดเซลล์ปกติที่อยู่รอบข้าง ทำให้เซลล์สูญเสียการจัดระเบียบ แล้วลุกลามเข้าสู่หลอดเลือดและน้ำเหลือง ก่อให้เกิดพยาธิสภาพและแพร่กระจายจากอวัยวะต้นกำเนิดไปยังอวัยวะอื่น หากเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญ ได้แก่ ปอด ตับ และสมอง ก็มักจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว การแพร่กระจายของมะเร็งเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนหลายยีน ผลจากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องทำให้การควบคุมการแพร่กระจายมีลักษณะเฉพาะตัวของมะเร็งแต่ละชนิด (1)

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกายจะเคลื่อนผ่านโครงร่างที่เป็นฐานรากของเซลล์ (interstitial matrix) ซึ่งประกอบด้วย proteoglycans, glycoproteins และ filament proteins พบว่าระดับของเอนไซม์เร่งการย่อยสลายโปรตีน (proteinases) เพิ่มขึ้นในโรคมะเร็งหลายชนิด เอนไซม์ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ matrix metalloproteinases (MMPs), serine proteinases, cysteine proteinases และ aspartate proteinases เอนไซม์เหล่านี้จะเร่งการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้างรากฐานของเซลล์ข้างเคียงมะเร็งปฐมภูมิ และ/หรือ เชื้อบุเส้นเลือด ก่อนที่มะเร็งจะแพร่ลุกลามออกไป (2)

A Disintegrin And Metalloproteinases (ADAMs) เป็น MMPs ชนิดหนึ่ง และเป็น membrane-bound enzyme โครงสร้างของ ADAMs ประกอบไปด้วย disintegrin domain และ metalloproteinase domain อยู่ในสาย polypeptide เส้นเดียวกัน ปัจจุบัน ADAMs มีสมาชิก 40 ตัว มีรายงานแน่ชัดว่า ADAMs ทำหน้าที่เป็น proteinase เร่งการย่อยสลาย extracellular matrix proteins และ integral membrane ดังนั้นโปรตีน ADAMs จึงมีบทบาทหลักต่อการทำลาย extracellular matrix และลด adhesion ของเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายออกไป (3)

มีรายงานพบปริมาณของ ADAM mRNA เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งตับ 4) มะเร็งเต้านม (5) มะเร็งกระเพาะอาหาร 6) เป็นต้น โดยเฉพาะมะเร็งตับจะมี mRNA ของ ADAM ชนิด 12 เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า โดยมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงของโรค (4) นอกจากนี้ ยังพบโปรตีน ADAM 12 หลุดออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ซึ่งปริมาณของโปรตีน ADAM 12 ในปัสสาวะจะแปรผันโดยตรงกับความรุนแรงของโรค ถ้าเป็นมะเร็งระยะลุกลามจะพบระดับสูงกว่าระยะเริ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7) ส่วนในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นั้น ยังไม่มีรายงานการศึกษาในระดับของโปรตีน ADAM12 แต่อย่างใด จากงานวิจัยนี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของ ADAM12 มากกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ดังกล่าวเพื่ออาจนำไปทดสอบกับ inhibitor ที่

เป็นสารสกัดจากพืชผักสมุนไพรธรรมชาติซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาและควบคุมการแพร่กระจายของโรคมะเร็งได้

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจกรองหา disintegrin/metalloprotease activity ของโปรตีน ADAM ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติ
2. เพื่อศึกษาศักยภาพในการเป็นตัวตรวจวัดมะเร็งท่อน้ำดี
3. เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ของ ADAM12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และทดสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้สารสกัดจากพืชผักและสมุนไพรไทย จำนวน 25 ชนิด

3. ขั้นตอนการศึกษา

3.1 ขั้นตอนการศึกษาเพื่อตรวจกรองหา disintegrin/metalloprotease activity ของโปรตีน ADAM ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติ

- ปรับความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างซีรัมที่จะให้ในการศึกษาให้เท่ากันทุกรายที่ 50 ug
- นำตัวอย่างซีรัมดังตารางที่ 1 มาตรวจหาโปรตีน ADAM12 activity ด้วยเทคนิค zymography
- นำตัวอย่างซีรัมดังตารางที่ 1 มาตรวจหาโปรตีน ADAM12 ด้วยเทคนิค western blot
- วัดความเข้มของ ADAM 12 บนแผ่น nitrocellulose โดยใช้โปรแกรม Image J
- เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ ADAM 12 ที่ตรวจพบในซีรัมคนปกติ และซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยสถิติ One way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS version 10 และหาค่า cut-off โดยวิธี ROC curves และคำนวณค่า % sensitivity และ % specificity

3.2 ขั้นตอนการศึกษาเพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ของ ADAM12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และทดสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้สารสกัดจากพืชผักและสมุนไพรไทย จำนวน 25 ชนิด

- เลือกตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตรวจพบว่ามีโปรตีน ADAM12 ด้วยเทคนิค western blot โดยใช้ตัวอย่างซีรัมจำนวน 10 รายแล้วนำมาผสมกันเพื่อใช้ในการแยกบริสุทธิ์
- ทำการแยกบริสุทธิ์ ADAM12 ด้วยเทคนิค anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus
- ตรวจวัดความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE
- ตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM12 ด้วยวิธี zymography
- นำซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมาทดสอบกับ inhibitor (EDTA) และพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ แล้วตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM12 ด้วยวิธี zymography

4. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้ gelatinase activity เพื่อตรวจกรองเพื่อแยกความแตกต่างของการทำงานของโปรตีน ADAM ระหว่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและคนปกตินั้นอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่อย่างไรก็ตามอาจใช้เทคนิคนี้ได้ในกรณีที่ใช้ตรวจสอบว่าเอนไซม์กลุ่ม disintegrin/metalloprotease ยังมีแอกติวิตีอยู่หรือไม่

จากการตรวจทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้ anti ADAM 9 และ 12 นั้น จะพบแต่โปรตีน ADAM 12 ในซีรัมตัวอย่างทุกราย ในขณะที่ตรวจไม่พบ ADAM 9 เลย นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ ADAM 12 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีความเข้มข้นมากกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตาม histological type พบว่าระดับของ ADAM 12 ในกระแสเลือดมีแนวโน้มสูงเมื่อความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นถึงแม้ว่าผลการทดสอบทางสถิติจะไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม จากนั้นทำการทดสอบหาค่า diagnostic values ณ จุด cut-off ที่ 3380 พบว่า % Sensitivity = 84, % Specificity = 70, % Positive predictive value = 87 และ % Negative predictive value = 64 ดังนั้นหากจะนำ ADAM 12 ในซีรัมมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอาจต้องใช้ตรวจควบคู่ไปกับการตรวจตามมาตรฐานทางคลินิก หรือการตรวจอย่างอื่นร่วมด้วย

จากการตรวจกรอง ADAM 12 ด้วย rabbit anti- human ADAM 12 (primary antibody) และ Goat anti-rabbit IgG conjugated Alkalinephosphatase (secondary antibody) โดยวิธี Western Blot ผลการตรวจพบว่าให้ผลบวกร้อยละ 100 ในการตรวจพบโปรตีน ADAM12

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีน ADAM 12 ได้โดยใช้เทคนิค HPLC ด้วย anion exchange chromatography ด้วยการผ่าน Q-FF (Fast Flow) ซึ่งเป็นแบบ strong anion exchange chromatography แล้ว elute ด้วย 0-0.4 M NaCl in 50 mM Tris buffer pH 7.5 และสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ADAM 12 ได้โดยวิธี SDS-PAGE

จากการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 ด้วย EDTA และพีชสมุนไพรรจำนวน 25 ชนิดโดยวิธี zymography ผลการทดลองพบว่า ตะขบหินมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 92.3 นอกจากนี้ยังพบว่า พีชสมุนไพรรตัวอื่นที่น่าสนใจ คือ บุนนาค หวาย ผักชีฝรั่ง และละหุ่ง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 ที่สูง (มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 มากกว่า ร้อยละ 70) คิดเป็นร้อยละ 81.5, 78.3, 77.9 และ 74.7 ตามลำดับ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iii
หน้าสรุปโครงการ (Executive summary)	iv
สารบัญตาราง	viii
สารบัญรูปภาพ	ix
คำย่อ	x
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์	4
วัสดุและขั้นตอนการศึกษา	5
วิธีการศึกษา	9
ผลการศึกษา	15
สรุปผลการศึกษา	27
วิจารณ์ผลการทดสอบ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	5
ตารางที่ 2 แสดงหมายเลขตัวอย่างและผลการตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ สำหรับการแยกบริสุทธิ์	5
ตารางที่ 3 แสดงรายการพืชผักสมุนไพรที่นำมาทดสอบการยับยั้ง activity ของเอนไซม์ ADAM 12	13
ตารางที่ 4 ผลการตรวจจำแนกชนิดของ ADAM protein ด้วย rabbit anti human ADAM 9 และ 12 โดยวิธี western blot analysis	15
ตารางที่ 5 แสดงผลความเข้มข้นของโปรตีนใน Fraction ที่ตรวจวัดโดยใช้ Bradford protein assay kit	20
ตารางที่ 6 ชื่อพืชผักสมุนไพรและสรรพคุณทางยา	32

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดโปรตีนรวมโดยวิธี Bradford	9
รูปที่ 2 ผลการตรวจกรอง disintegrin/metalloprotease activity โดยใช้ gelatin เป็นซับสเตรท	15
รูปที่ 3 ผลการทำ western blot analysis โดยใช้ rabbit anti human ADAM 12	16
รูปที่ 4 แสดงการกระจายข้อมูลของ densitometric units ของ ADAM 12 ในซีรัม	17
รูปที่ 5 แสดง The Roc curve ของ ADAM 12	18
รูปที่ 6 ผลการตรวจกรองหาระดับโปรตีน ADAM12 ในซีรัม ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค western blot	19
รูปที่ 7 Profile ของการทำบริสุทธิ์ ADAM 12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการผ่าน Q-FF (Fast Flow)	20
รูปที่ 8 Profile ของการทำบริสุทธิ์ ADAM 12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการผ่าน Q-FF (Fast Flow) ซึ่งเป็นแบบ strong anion exchange chromatography (A) นำ fraction จากรูปที่ 2 หมายเลข 4-14 มาทำ SDS-PAGE (B) นำ fraction จากรูปที่ 2 หมายเลข 4-14 มาทำ western blot	21
รูปที่ 9 แสดงกราฟและแผ่นเจลของการตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM 12 เมื่อทดสอบกับ EDTA และพืชผักสมุนไพร 25 ชนิดด้วยวิธี zymography และกราฟแสดง % inhibition ของพืชผักสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12	22
รูปที่ 10 แสดง % inhibition ของพืชผักสมุนไพร 14 ชนิดต่อการทำงานของ เอนไซม์ ADAM 12 โดยมีการเรียง % inhibition จากมากไปน้อย	26

คำย่อ

ADAM 12	=	A Disintegrin And Metalloproteinases 12
MMPs	=	Matrix Metalloproteinases
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis
g	=	gram
ul	=	microlitre
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
mA	=	milliampere
°C	=	Degree Celsius
TEMED	=	N’N’N’N’- Tetramethylethylenediamine
APS	=	Ammonium persulfonic
HCl	=	Hydrochloric acid
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
CBB	=	Coomasie brilliant blue
Min	=	Minute
Igs	=	Immunoglobulins

บทนำ

1.ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตของคนไทยในปัจจุบัน มะเร็งเกิดจากเซลล์ในร่างกายสูญเสียการควบคุมการแบ่งเซลล์และการเพิ่มจำนวน โดยเซลล์มะเร็งจะกระจายตัวแทรกซึมและเบียดเซลล์ปกติที่อยู่รอบข้าง ทำให้เซลล์สูญเสียการจัดระเบียบ แล้วลุกลามเข้าสู่หลอดเลือดและน้ำเหลือง ก่อให้เกิดพยาธิสภาพและแพร่กระจายจากอวัยวะต้นกำเนิดไปยังอวัยวะอื่น หากเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญ ได้แก่ ปอด ตับ และสมอง ก็มักจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว การแพร่กระจายของมะเร็งเกี่ยวข้องกับการทำงานของจีนหลายจีน ผลจากการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องทำให้การควบคุมการแพร่กระจายมีลักษณะเฉพาะตัวของมะเร็งแต่ละชนิด (1)

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกายจะเคลื่อนผ่านโครงร่างที่เป็นฐานรากของเซลล์ (interstitial matrix) ซึ่งประกอบด้วย proteoglycans, glycoproteins และ filament proteins พบว่าระดับของเอนไซม์เร่งการย่อยสลายโปรตีน (proteinases) เพิ่มสูงขึ้นในโรคมะเร็งหลายชนิด เอนไซม์ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ matrix metalloproteinases (MMPs), serine proteinases, cysteine proteinases และ aspartate proteinases เอนไซม์เหล่านี้จะเร่งการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้างรากฐานของเซลล์ข้างเคียงมะเร็งปฐมภูมิ และ/หรือ เยื่อบุเส้นเลือด ก่อนที่มะเร็งจะแพร่ลุกลามออกไป (2)

A Disintegrin And Metalloproteinases (ADAMs) เป็น MMPs ชนิดหนึ่ง และเป็น membrane-bound enzyme โครงสร้างของ ADAMs ประกอบไปด้วย disintegrin domain และ metalloproteinase domain อยู่ในสาย polypeptide เส้นเดียวกัน ปัจจุบัน ADAMs มีสมาชิก 40 ตัว มีรายงานแน่ชัดว่า ADAMs ทำหน้าที่เป็น proteinase เร่งการย่อยสลาย extracellular matrix proteins และ integral membrane ดังนั้นโปรตีน ADAMs จึงมีบทบาทหลักต่อการทำลาย extracellular matrix และลด adhesion ของเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายออกไป (3)

มีรายงานพบปริมาณของ ADAM mRNA เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งตับ 4) มะเร็งเต้านม (5) มะเร็งกระเพาะอาหาร 6) เป็นต้น โดยเฉพาะมะเร็งตับจะมี mRNA ของ ADAM ชนิด 12 เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า โดยมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงของโรค (4) นอกจากนี้ ยังพบโปรตีน ADAM 12 หลุดออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ซึ่งปริมาณของโปรตีน ADAM 12 ในปัสสาวะจะแปรผันโดยตรงกับความรุนแรงของโรค ถ้าเป็นมะเร็งระยะลุกลามจะพบระดับสูงกว่าระยะเริ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7) ส่วนในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้น ยังไม่มีรายงานการศึกษาในระดับของโปรตีน ADAM12 แต่อย่างใด จากงานวิจัยนี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของ ADAM12 มากกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ดังกล่าวเพื่ออาจนำไปทดสอบกับ inhibitor ที่เป็นสารสกัดจากพืชผักสมุนไพรธรรมชาติซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาและควบคุมการแพร่กระจายของโรคมะเร็งได้

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับมะเร็ง

มะเร็ง คือการที่เซลล์เสียการควบคุมเกี่ยวกับการเจริญของเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และสามารถรุกรานเซลล์ข้างเคียงและอวัยวะอื่นๆ สาเหตุของการเกิดมะเร็งเนื่องจากการทำงานที่ไม่สมดุลของยีนก่อมะเร็ง (oncogene) ยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) และยีนซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair gene) ซึ่งเป็นความผิดปกติในส่วน genetic หรือ epigenetic

ยีนก่อมะเร็ง (Oncogene) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ (positive regulatory) และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (transformation) สาเหตุของความผิดปกติของยีนก่อมะเร็งเนื่องจาก การกลายพันธุ์ (mutation) การเพิ่มจำนวน (amplification) หรือการเคลื่อนย้ายตำแหน่ง (translocation) เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับยีนเพียงหนึ่งอัลลีลสามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ ความผิดปกติจึงเป็นแบบ Dominant

ยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) เป็นยีนควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ไม่ให้มีการแบ่งตัวมากเกินไป (negative regulation) ความผิดปกติของยีนต้านมะเร็งที่พบเช่น การขาดหายของโครโมโซมที่มียีนต้านมะเร็งอยู่ (loss of heterozygosity) หรือการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสด้านเดียว (point mutation) รวมไปถึงการเกิด methylation ซึ่งความผิดปกติต้องเกิดทั้งสองข้างของอัลลีลจึงทำให้เกิดมะเร็ง ความผิดปกติจึงเป็นแบบ recessive

ยีนซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair gene) เป็นยีนที่ควบคุมทางอ้อม (indirect) โดยควบคุมอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

ความผิดปกติในส่วน genetic คือ ความผิดปกติที่มีผลต่อการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนต่างๆ ได้แก่ Loss of heterozygosity (LOH) และ mutation

ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ epigenetic เป็นการดัดแปลงจีโนมซึ่งไม่ทำให้ลำดับเบสของยีนเปลี่ยนแปลง จีโนมที่ถูกดัดแปลงนี้สามารถถ่ายทอดได้ระหว่างที่เซลล์มีการแบ่งตัว ซึ่งขบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นได้บ่อยคือ DNA methylation (8)

2. มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma)

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์เยื่อของท่อน้ำดี ซึ่งรวมทั้งบริเวณ Intrahepatic และ Extrahepatic portion pdg;ho gall bladder และ ampulla of Vater การจัดกลุ่มมะเร็งท่อน้ำดีจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma หรือ peripheral type cholangiocarcinoma) และ มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) โดยศาสตราจารย์นายแพทย์ทองอวบ อุดรวิเชียร และรองศาสตราจารย์นายแพทย์วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์ได้เป็นผู้ริเริ่มเกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าโรคนี้นี้เป็นโรคที่พบในผู้ชายมากกว่าในผู้หญิง คือ 135.4 ต่อ 100,000 ในชาย และ 43.0 ต่อ 100,000 ในหญิง (9)

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยธรรมชาติและคณะ (10) พบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* ร่วมกับการได้รับสาร Dimethylnitrosamine สามารถส่งเสริมให้สัตว์ทดลองเกิดมะเร็งได้ ทั้งนี้พบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับเฉพาะ *Opisthorchis viverrini* หรือสาร Dimethylnitrosamine เพียงอย่างเดียวไม่พบการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นผลการศึกษาทั้งทางด้านสัตว์ทดลองและระบาดวิทยาสามารถสรุปได้ว่าพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่ออุททางเดินน้ำดีทำให้มีการอักเสบและมีความไวต่อสารก่อมะเร็งส่งผลให้เซลล์เยื่ออุททางเดินน้ำดีมีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนและพัฒนาไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในที่สุด

สำหรับกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับนั้นเชื่อกันว่าเป็นแบบ Multistep carcinogenesis โดย Kim (1984) ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่า สารก่อมะเร็งกลุ่ม nitrosamine เป็นตัวที่ทำให้เกิด initiation โดยไปสร้าง DNA adduct ทำให้เกิดมะเร็งและการพัฒนาต่อไปเป็นมะเร็งที่สมบูรณ์แบบ อย่างไรก็ตาม สาเหตุและกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เนื่องจากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีสูง โดยเฉพาะจังหวัดขอนแก่นมีอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีสูงที่สุดในประเทศและในโลก (9-15) อาจเนื่องจากชาวอีสานส่วนใหญ่มีฐานะไม่ค่อยดี ประกอบกับการขาดความรู้ด้านสุขภาพ ดังนั้นผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจึงมักมาพบแพทย์เมื่อมะเร็งลุกลามสู่ระยะสุดท้าย พยากรณ์โรคหลังการผ่าตัดก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ อันเป็นผลจากการลุกลามของมะเร็ง(15)

3. ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase)

โปรตีน ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) เป็นไกลโคโปรตีนที่พบในยูคาริโอต จัดอยู่ในแฟมิลี transmembrane proteins เป็นเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ที่ภาวะเป็นกลาง และอาศัยไอออนสังกะสีในการทำงาน (zinc dependent metalloproteases) จึงจัดอยู่ใน zinc protease superfamily โปรตีนใน ADAM แฟมิลีมีสมาชิกประมาณ 40 ตัว แต่ละตัวมีบทบาทแตกต่างกันซึ่งอาจควบคุมเกี่ยวกับการ membrane fusion, cell-cell และ cell-matrix interaction, cytokine, growth factor shedding และ cell migration ทั้งในสภาวะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตปกติและสภาวะที่เซลล์เกิดพยาธิสภาพบางชนิดเช่น การอักเสบ มะเร็ง cardiac hypertrophy, Alzheimer, arthritis (16-18)

โปรตีน ADAM ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ proteinase ย่อย integral membrane หรือ extracellular matrix proteins แล้วจึง remodeling ใหม่ (19) โครงสร้างของโปรตีน ADAM ประกอบไปด้วย prodomain, metalloproteinase domain, disintegrin domain, cysteine-rich domain, EGF-like domain, transmembrane domain และ cytoplasmic tail อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน prodomain มีบทบาทในการม้วนตัว (folding) ของโปรตีน ADAM ส่วน metalloprotease domain เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้เกิดการย่อย ซับสเตรทโดยมี Zn^{2+} เป็น cofactor และน้ำเป็นโมเลกุลสำคัญที่จำเป็นในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส disintegrin domain มีบทบาทในการจับกับ integrin receptors, cysteine-rich domain มีบทบาทในการจับ

กับ tumor cell line ชนิดต่าง ๆ และมีการศึกษาพบว่า โปรตีน ADAM มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับ โปรตีนในพิษงู (Snake venom metalloproteases ;SVMPs) (20-21)

การแสดงออกของจีน ADAM ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จะแตกต่างกัน สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าโปรตีน ADAMs 2,7,18,20,21,29,30 อยู่ในเซลล์สืบพันธุ์ โปรตีนADAMs 8,9,10,11,12,15,17,19,22,23,28,33 พบได้ในอวัยวะอื่น ๆ ADAMs 9,12,19 พบที่ myoblasts (22) โดยโปรตีนเหล่านี้มีการแสดงออกที่เป็นแบบแผนแตกต่างกัน ซึ่งโปรตีน ADAMs บางชนิดจะแสดงออกเป็น multiple splice forms เช่น ADAM 22 (23) ส่วน ADAM 29,30 จะมี 2-3 รูปแบบที่มีความยาวของ cytoplasmic tail ต่างกัน (24)

ADAM 12 เป็นโปรตีนที่มีผู้ตรวจพบในปัสสาวะ ในขณะที่ ADAM proteins ชนิดอื่น ๆ ยังไม่มีรายงาน โปรตีน ADAM 12 มี 2 รูปแบบ คือ L และ S (25) (L = membrane- anchored long form, S = shorter secreted form) รูปแบบที่หลุดออกมาในปัสสาวะคือ S มีน้ำหนักโมเลกุล 68 kD ทำหน้าที่เป็น protease ย่อยยับยั้งสเตรทจำพวกเจลาติน คอลลาเจน type IV ไฟบริโนเจน แต่ถ้าหากมีสาร chelating agent เช่น hydroxamate compounds, TIMP-3 ร่วมอยู่ในปฏิกิริยา เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งการทำงานเพราะ Zn^{2+} ถูก chelating agent จับไว้ เอนไซม์จึงขาดโคแฟกเตอร์

ในปี ค.ศ.2004 Roy และคณะ (7) เป็นกลุ่มวิจัยกลุ่มแรกที่รายงานการค้นพบโปรตีน ADAM 12 ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และเมื่อทำการตรวจวัดระดับของโปรตีน ADAM 12 ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต่าง ๆ พบว่าระดับโปรตีน ADAM 12 จะเพิ่มขึ้นตามความรุนแรงของโรค จากการประเมินความไว (sensitivity) ของการตรวจวัดเพื่อการวินิจฉัยโรคพบว่ามีความไวสูง โดยมะเร็งเต้านมระยะเริ่มแรกมีความไว 85% และระยะลุกลามมีความไวถึง 100% แต่จะพบ ADAM 12 ได้น้อยมากในปัสสาวะของคนปกติ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจกรองหา disintegrin/metalloprotease activity ของโปรตีน ADAM ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติ
2. เพื่อศึกษาศักยภาพในการเป็นตัวตรวจวัดมะเร็งท่อน้ำดี
3. เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ของ ADAM12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และทดสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้สารสกัดจากพืชผักและสมุนไพรไทย จำนวน 25 ชนิด

วัสดุ และขั้นตอนการศึกษา

1.ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

เก็บตัวอย่างซีรัมจากคนปกติจำนวน 18 ราย และซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 57 ราย ที่มารับการรักษาที่ Tumor clinic โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ซึ่งทุกรายมีผลการตรวจยืนยันทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี และจำแนกผลทาง histological type ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง	ข้อมูลต่าง ๆ	จำนวน
1.คนปกติ	-	18
2.ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	Histological type	
	● Papillary	18
	● Well diff.	28
	● Poorly /Moderately diff.	11
Total	-	75

ตารางที่ 2 แสดงหมายเลขตัวอย่างและผลการตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อสำหรับใช้ในการแยกบริสุทธิ์

Code	ผล Histochemistry	Protien concentration	ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (ul)
X163	Moderately differentiated	50 ug	1.3
T002	Moderately differentiated		1.6
T003	Moderately differentiated		1.5
T013	Moderately differentiated		1.6
T017	Moderately differentiated		1.4
T048	Moderately differentiated		1.5
T062	Moderately differentiated		1.2
T073	Moderately differentiated		3.4
T079	Moderately differentiated		1.4
T092	Moderately differentiated		2.4
T131	Moderately differentiated		1.1

2. วัสดุและอุปกรณ์

- 2.1 Automatic pipette
- 2.2 Automatic pipette tip
- 2.3 Cylinder
- 2.4 Test tube
- 2.5 Breaker
- 2.6 เครื่องชั่งสาร
- 2.7 ช้อนตักสาร
- 2.8 Stirring rod
- 2.9 pH meter
- 2.10 Electrophoresis set
- 2.11 Eppendorf tube
- 2.12 กระดาษกรอง
- 2.13 Nitrocellulose membrane
- 2.14 Blotting equipment
- 2.15 เครื่อง Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus

3. น้ำยาและสารเคมี

3.1 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

- 3.1.1 Tris-HCl buffer pH 8.8 for separating gel (Solution A)
- 3.1.2 Tris-HCl buffer pH 6.8 for stacking gel (Solution B)
- 3.1.3 30% acrylamide stock for SDS-PAGE (Solution C)
- 3.1.4 Tris-glycine buffer pH 8.0 (Running buffer)
- 3.1.5 10% Ammonium persulfonic
- 3.1.6 TEMED
- 3.1.7 CBB staining solution
- 3.1.8 Destain solution
- 3.1.9 Quick start Bradford protein assay kit
- 3.1.10 AP conjugate substrate kit
- 3.1.11 Laemli sample buffer
- 3.1.12 Low molecular weight makers

3.2 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blot

- 3.2.1 Transfer buffer (Transblotting buffer)
- 3.2.2 TBS buffer
- 3.2.3 TBST buffer
- 3.2.4 Blocking solution (5% skim milk in TBST buffer)
- 3.2.5 Rabbit anti-human ADAM 9 และ 12 (primary antibody)
- 3.2.6 Goat anti-rabbit IgG conjugated Alkalinephosphatase (secondary antibody)
- 3.2.7 substrate buffer
- 3.2.8 p- nitrophenol phosphate (PNPP)
- 3.2.9 High Range Rainbow Molecular Weight Markers

3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำ การแยกบริสุทธิ์ ADAM12

- 3.3.1 50 mM Tris, pH 7.5 (Running buffer)
- 3.3.2 0.4 M NaCl in 50 mM Tris, pH 7.5 (Eluting buffer)
- 3.3.3 20% Ethanol

3.4 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำ Gelatinase activity (Zymography)

- 3.4.1 2.5% Triton X-100
- 3.4.2 substrate buffer
- 3.4.3 0.1% CBB staining solution
- 3.4.4 Destain solution
- 3.4.5 Distill water (DW)
- 3.4.5 gelatin
- 3.4.6 Native sample buffer

4. ขั้นตอนการศึกษาเพื่อตรวจกรองหา disintegrin/metalloprotease activity ของโปรตีน ADAM ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติ

- ปรับความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างซีรัมที่จะใช้ในการศึกษาให้เท่ากันทุกรายที่ 50 ug
- นำตัวอย่างซีรัมดังกล่าวที่ 1 มาตรวจหาโปรตีน ADAM12 activity ด้วยเทคนิค zymography
- นำตัวอย่างซีรัมดังกล่าวที่ 1 มาตรวจหาโปรตีน ADAM12 ด้วยเทคนิค western blot
- วัดความเข้มของ ADAM 12 บนแผ่น nitrocellulose โดยใช้โปรแกรม Image J
- เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ ADAM 12 ที่ตรวจพบในซีรัมคนปกติ และซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยสถิติ One way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS version 10 และหาค่า cut-off โดยวิธี ROC curves และคำนวณค่า % sensitivity และ % specificity

5. ขั้นตอนการศึกษาเพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ของ ADAM12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี และทดสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้สารสกัดจากพืชผักและสมุนไพรไทย จำนวน 25 ชนิด

- เลือกตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีที่ตรวจพบว่ามีโปรตีน ADAM12 ด้วยเทคนิค western blot โดยใช้ตัวอย่างซีรัมจำนวน 10 รายแล้วนำมาผสมกันเพื่อใช้ในการแยกบริสุทธิ์

- ทำการแยกบริสุทธิ์ ADAM12 ด้วยเทคนิค anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง

Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus

- ตรวจวัดความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE

- ตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM12 ด้วยวิธี zymography

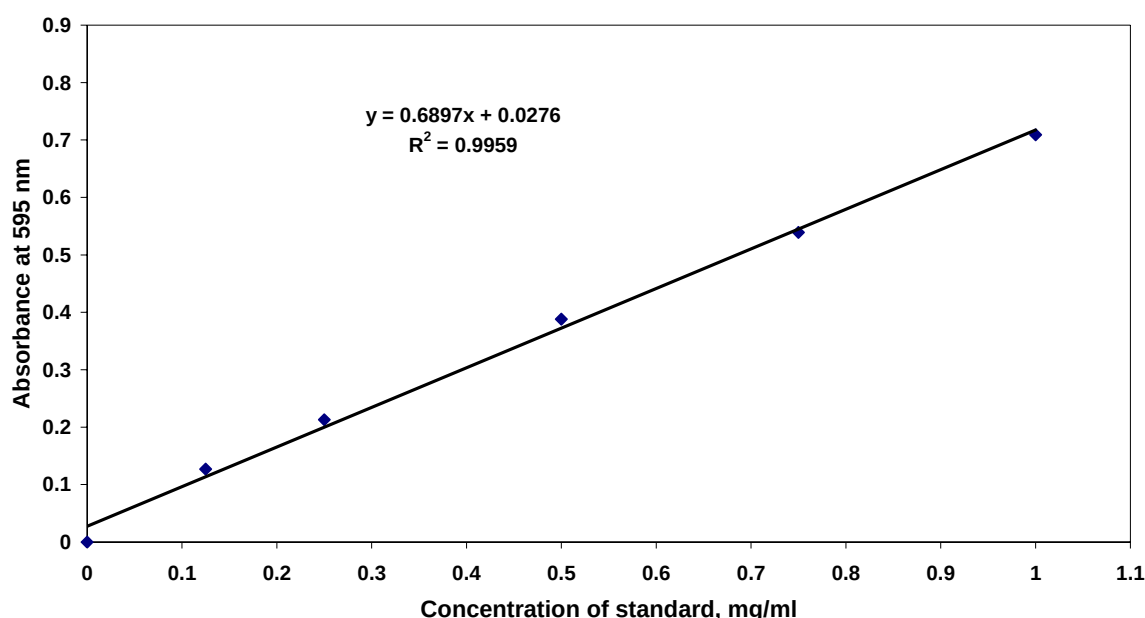
- นำซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีมาทดสอบกับ inhibitor (EDTA) และพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ แล้วตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM12 ด้วยวิธี zymography

วิธีการศึกษา

1. การตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมในซีรัมตัวอย่างโดย Quick start Bradford protein assay kit

เตรียม bovine serum albumin ความเข้มข้น 1mg/ ml เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับทำ standard curve จากนั้น เจือจางสารมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 0.75 mg/ml ตามลำดับ แล้ว pipette สารละลายมาตรฐาน 1 ul ลงใน dye 1 ml ผสมให้เข้ากันดี วางที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ (แกน Y) กับปริมาณ bovine serum albumin (แกน X) ดังรูปที่ 1 สำหรับการตรวจหาโปรตีนรวมในตัวอย่าง ก็ทำเช่นเดียวกัน แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับ standard curve ก็จะทำให้ทราบความเข้มข้น

Bradford Protein Assay



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดโปรตีนรวมโดยวิธี Bradford

2. การเตรียม Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียม 8.5 % separating gel solution นำไปเทลงในกระจกของชุด gel electrophoresis (ATTO patent P, Japan) หลังจาก gel มีการจัดเรียงตัวที่สมบูรณ์ซึ่งใช้เวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที แล้วจึงเท 6 % stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel แล้วตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างซีรัมโดยนำมาผสมกับ solubilizing buffer จากนั้น load ส่วนผสมดังกล่าว บน stacking gel ด้วยปริมาณที่เหมาะสม แล้วใส่กระแสไฟฟ้าแก่ชุด gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า จนกระทั่งแถบสีของ solubilizing buffer เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลาย gel จึงนำ gel ที่ได้ไปย้อมด้วย 0.1% coomassie brilliant blue R-250 หรือนำไปทำ Western immunoblotting ต่อไปดังรายละเอียดด้านล่างนี้

- การเตรียมเจล สำหรับทำ SDS-PAGE โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังตาราง

Component	Final gel concentration	
	8.5%separating gel	6% stacking gel
Solution C	2 ml	0.3 ml
Solution A	1.5 ml	-
Solution B	-	0.75 ml
DW	2.5 ml	1.95 ml
ผสมให้เข้ากันดี		
10%APS	40 ul	30 ul
TEMED	3 ul	2 ul

-การ เตรียมตัวอย่าง สำหรับทำ SDS-PAGE โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการวัดความเข้มข้นแล้วด้วย Quick start Bradford protein assay kit โดยใช้ประมาณ 1-2 ul (ขึ้นอยู่กับผู้ป่วยแต่ละราย) ซึ่งจะมีความเข้มข้น 50 ug ผสมกับ native sample buffer 10 ul นำไปต้มเดือดเป็นเวลา 2 นาที และทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำแข็งแล้วนำไปโหลดลงเจลที่เตรียมไว้

-การ Run electrophoresis จะใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 30 mA (สำหรับ ช่วง Stacking gel) และ 40 mA (สำหรับช่วง Separating gel) นานประมาณ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย 0.1% CBB หรือนำไปทำ Western immunoblotting ต่อไป

3. Western Immunoblotting

นำสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 50 ug มาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ดังข้อที่ 2 แล้ว transfer ไปยังแผ่น nitrocellulose เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน blocking solution (5% skim milk ใน TBST) ที่ 4°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน จากนั้นนำไปแช่ใน rabbit anti-human ADAM12 (Sigma Catalog no.A3351) ที่เจือจางด้วย blocking solution (1:500) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBST buffer 3x5 นาที แช่แผ่น nitrocellulose ใน goat anti-rabbit IgG linked with alkaline phosphatase เจือจางด้วย TBST buffer (1:500) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST buffer 3x5 นาที TBS buffer 3x5 นาที และ substrate buffer 2x30 วินาที นำไป develop ใน NBT/BCIP substrate solution จนกระทั่งสังเกตเห็นเป็นแถบสีม่วงปรากฏขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

วิธีการทำ western blot มีขั้นตอนโดยละเอียดดังนี้

- เช็ดเครื่อง blotting ให้สะอาดด้วย 70% alcohol
- แช่แผ่น nitrocellulose และกระดาษกรองจำนวน 6-8 แผ่นใน transblotting buffer 15 นาที
- จากนั้นวาง nitrocellulose และกระดาษกรองตามลำดับดังนี้

- กระดาษกรอง 4 แผ่น
- Nitrocellulose
- Gel
- กระดาษกรอง 4 แผ่น
- ทำการ blotting โดยใช้เครื่อง blotting
 - ต่อกระแสไฟฟ้าโดยกำหนดให้ 160 mA 60 min (1 แผ่น) 90 min (2 แผ่น)
- เตรียม 5% skim milk ใน TBST buffer เพื่อใช้เป็น Blocking solution สำหรับ block nonspecific
- แช่ nitrocellulose ใน blocking solution นาน 60 นาทีหรือข้ามคืนที่ 4 °C
(1 g skim milk ใน 20 ml TBST)
- เจือจาง primary antibody (Rabbit anti-human ADAM12) ด้วย 5% skim milk ใน TBST buffer ในอัตราส่วน 1:500
- incubate แผ่น nitrocellulose ใน primary antibody เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย TBST buffer 3 ครั้งๆละ 5 นาที
- เจือจาง secondary antibody (Mouse anti-rabbit Igs conjugated Alkaliphosphatase) ด้วย 5% skim milk ใน TBST buffer ในอัตราส่วน 1:500
- incubate แผ่น nitrocellulose ใน secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย TBST buffer 3 ครั้งๆละ 5 นาที
- ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย TBS buffer 3 ครั้งๆละ 5 นาที
- แช่ ด้วย substrate buffer 2 ครั้งๆ ละ 30 วินาที
- เติม substrate (p-nitrophenol phosphate (PNPP)) จนเห็น band แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

4. การเตรียม substrate gel เพื่อใช้ในการตรวจกรอง gelatinase activity ของ ADAMs โปรตีน

เตรียม 8.5 % separating gel solution โดยเติมสารละลาย gelatin ลงไปด้วยเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุทธิที่ 0.1 g% จากนั้นนำไปเทลงในกระจกของชุด gel electrophoresis (ATTO patent P, Japan) หลังจาก gel มีการจัดเรียงตัวที่สมบูรณ์ซึ่งใช้เวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที แล้วเท 6 % stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel แล้วตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที อีกด้านหนึ่ง เตรียมซีรัมตัวอย่างมาผสมกับ solubilizing buffer จากนั้น load ซีรัม บน stacking gel ด้วยปริมาณที่เหมาะสม แล้วใส่กระแสไฟฟ้าแก่ชุด gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 20 มิลลิแอมป์ จนกระทั่งแถบสีของ solubilizing buffer เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลาย gel จึงนำแผ่น gel ที่ได้ไปล้างด้วย 2.5% Triton X-100 จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

จากนั้นนำแผ่นเจลไป incubate ใน substrate buffer (50 mM Tris, pH 7.6, containing 5 mM CaCl_2 , 1 uM ZnCl_2 , and 0.02% NaN_3) ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำ gel ไปย้อมด้วย 0.1% coomassie brilliant blue

R-250 ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้ว destain ด้วยน้ำประปา โดยบริเวณที่มี gelatinase activity จะมองเห็น clear zone จึงหยุดล้างเจล

5. การแยกบริสุทธิ์ ADAM12 ด้วยเทคนิค anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง

Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus

5.1 เตรียมตัวอย่างซีรัม ซึ่งตรวจสอบด้วยเทคนิค western blot แล้วว่ามีโปรตีน ADAM12

- นำ pooled serum ปริมาตร 200 ul ผสม 50 mM Tris , pH 7.5 จำนวน 800 ul (อัตราส่วน 1:4) ผสมให้เข้ากันดีแล้วกรองโดยใช้กระดาษกรองที่มี pore size ~ 0.45 µm

5.2 ฉีด (inject) ตัวอย่างซีรัมเข้าเครื่อง Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus

โดยใช้ Syringe ขนาด 1 ml

5.3 HPLC condition คือ

- Eluent : 50 mM Tris, pH 7.5 (solv A)
0.4 M NaCl in 50 mM Tris, pH 7.5 (solv B)
- Gradient : 0-100 % of solv B (20 min)
- Flow rate : 1 ml/min
- Detection : mAu, 280 nm
- Column : Q-FF column (strong anion exchange chromatography)

5.4 เก็บ Fraction โดยใช้หลอดทดลองขนาด 13 x 100 โดยแต่ละ Fraction เก็บประมาณ 1 ml

6. ตรวจวัดความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE (ข้อ2) และตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM 12 ด้วยวิธี zymography (ข้อ4)

7. การเตรียมน้ำสกัดจากพืชผักสมุนไพร

นำพืชผักสมุนไพรชนิดต่างๆ (ตารางที่ 2) มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปบดโดยใช้สมุนไพรต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 g/ml หลังจากนั้นนำมากรองผ่านผ้าก๊อชหลายๆชั้น เพื่อกรองเอาเศษสมุนไพรที่มีขนาดใหญ่ออกไปแล้วนำน้ำกรองที่เป็นน้ำสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆไปทำ lyophilized แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C ก่อนนำมาทดสอบให้ละลายน้ำสกัดสมุนไพรทุกชนิดด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 200 mg

ตารางที่ 3 แสดงรายการพืชผักสมุนไพรที่นำมาทำการทดสอบการยับยั้ง activity ของเอนไซม์ ADAM 12

ลำดับที่	ชื่อพืชผักสมุนไพร	ลำดับที่	ชื่อพืชผักสมุนไพร
1	จักรนารายณ์	13	น้ำสามต้น
2	บุรณาค	14	หว่ายลิง
3	รัก	15	คนที่สอ
4	ฟ้าทะลายโจน	16	ว่านเพชรหึง
5	เสลดพังพอน	17	ประคำดีควาย
6	เครือชูด	18	ตะขบหิน
7	พนมสวรรค์	19	ลิ้นมังกร
8	ดอกหางเสือ	20	ว่านน้ำทอง
9	ผักบุ้งทะเล	21	ว่านร้อนทอง
10	ละหุ่ง	22	กระโดนน้ำ
11	หว่าย	23	ผักบุ้ง
12	หว่ายตะมอย	24	จี๋เหล็ก
		25	ผักชีฝรั่ง

8. ทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กับ inhibitor (EDTA) และพืชผักสมุนไพร 25 ชนิด
 นำซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมาทดสอบกับ inhibitor (EDTA) และพืชผักสมุนไพร 25 ชนิด
 แล้วตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM 12 ด้วยวิธี zymography

8.1 เตรียมตัวอย่างโดยนำซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 10 ราย มาผสมรวมกันเพื่อใช้ในการทดสอบ
 แล้วนำซีรัมไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง กับสารทดสอบต่างๆ โดยมี
 อัตราส่วนดังนี้

Serum	Substrate buffer	สารทดสอบ
2 ul	15 ul	40 mM EDTA 15 ul (Negative control)
2 ul	15 ul	DW 15 ul (positive control)
2 ul	15 ul	พืชผักสมุนไพร 15 ul (มี 25 ชนิด)

จากนั้น นำมาเติม native sample buffer 30 ul แล้วนำไปทำ zymography โดยโหลดตัวอย่าง หลุมละ 20 ul

9. วัดความเข้มของ clear zone บนแผ่น zymography โดยใช้โปรแกรม Image J

10. คำนวณ % inhibition ของพืชผักสมุนไพรต่อการทำงานของ ADAM 12

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ : $\% \text{ activity} = \text{Peak area} \times \text{Calculation factor}$

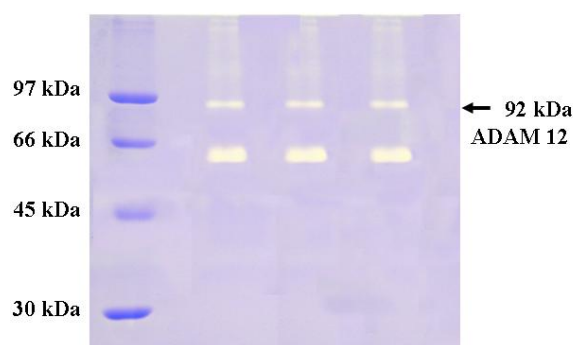
$\text{Calculation factor} = 100 / \text{Peak area of positive control}$

$\% \text{ inhibition} = 100 - \% \text{ activity}$

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเพื่อตรวจกรองหา disintegrin/metalloprotease activity ของโปรตีน ADAM ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติ

1. ได้ทำการตรวจกรองหา disintegrin/metalloprotease activity ของโปรตีน ADAM ด้วยวิธี Polyacrylamide gel zymography ในซีรัมจำนวน 75 ตัวอย่าง โดยเป็นซีรัมจากคนปกติจำนวน 18 ราย และเป็นซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 57 ราย ผลของการตรวจในซีรัมของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงเป็นตัวอย่างในรูปที่ 1



รูปที่ 2 ผลการตรวจกรอง disintegrin/metalloprotease activity โดยใช้ gelatin เป็นซับสเตรท

ผลบวกจะแสดง clear zone ให้เห็นซึ่งมีตำแหน่งที่ 92 kDa.

แถวที่ 1 คือ Marker

แถวที่ 2 คือ ซีรัมจากคนปกติ

แถวที่ 3 และ 4 คือ ซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

2. ได้ทำการจำแนกชนิดของ ADAM protein ด้วย rabbit anti human ADAM 9 และ 12 โดยวิธี Western Blot Analysis ผลการตรวจพบว่าเฉพาะ ADAM 12 เท่านั้นที่ให้ผล positive ในขณะที่ ADAM 9 ให้ผล negative ในทุกตัวอย่างทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4

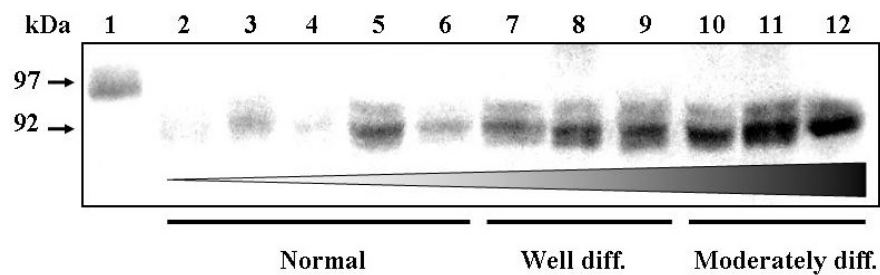
ตารางที่ 4 ผลการตรวจจำแนกชนิดของ ADAM protein ด้วย rabbit anti human ADAM 9 และ 12

โดยวิธี Western Blot Analysis

กลุ่มตัวอย่าง	ADAM 9 (no.)	ADAM 12 (no.)
กลุ่มปกติ	0 (18)	18 (18)
กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	0 (57)	57 (57)
รวม	0 (75)	75 (75)

3. ทำการวัดความเข้มข้นของแบนที่ปรากฏในแผ่น nitrocellulose ด้วยโปรแกรม Image J ซึ่ง

ได้ผลดังแสดงเป็นตัวอย่างในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลการทำ Western blot analysis โดยใช้ rabbit anti human ADAM 12

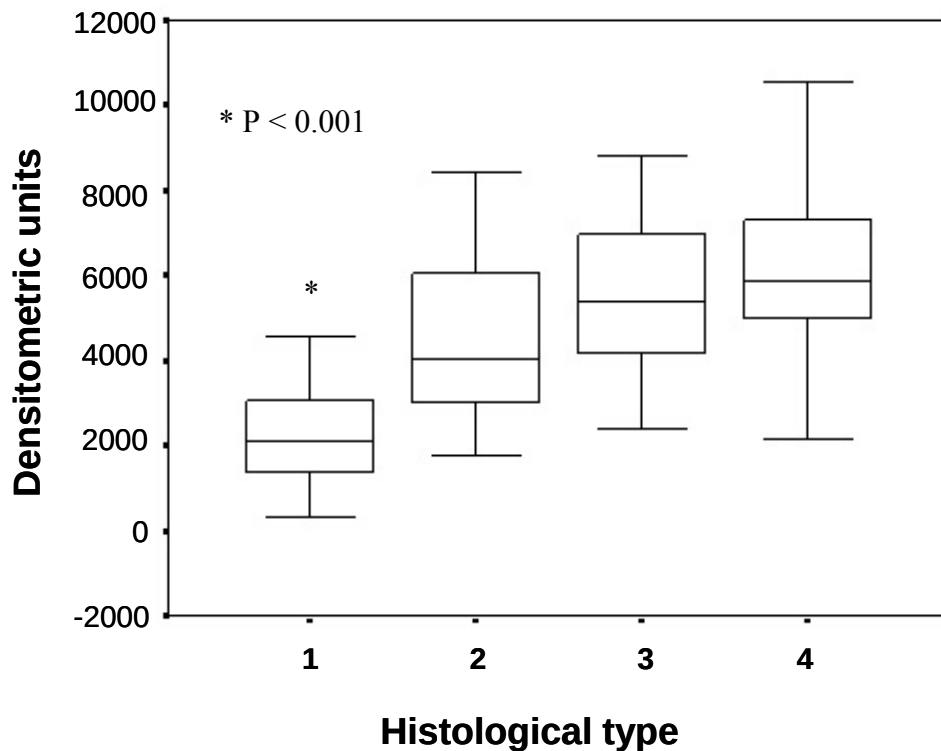
แถวที่ 1 คือ Marker

แถวที่ 2-6 คือซีรัมจากคนปกติ

แถวที่ 7-9 คือซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แบบ Well differentiated

แถวที่ 10-12 คือซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แบบ Moderately differentiated

4. ทำการทดสอบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของแบนที่วัดได้ในซีรัมคนปกติ กับในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้สถิติ One way ANOVA ผลการทดสอบพบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของ ADAM12 ในซีรัมมากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) (รูปที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างตามลักษณะของ histological type ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4 แสดงการกระจายข้อมูลของ densitometric units ของ ADAM12 ในซีรัมของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาโดยวิธี immunoblots ซึ่งตัวอย่างได้แบ่งตามลักษณะของ histological type ดังนี้

1 คือ Normal (n = 18)

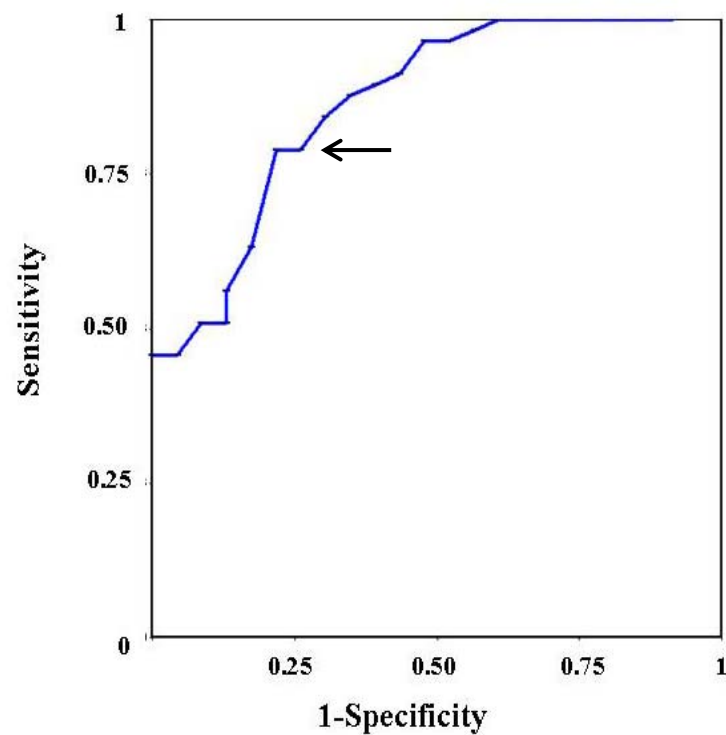
2 คือ Papillary (n = 18)

3 คือ Well differentiated (n = 28)

4 คือ Poorly / Moderately differentiated (n = 11)

* คือมีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่นำมาศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

5. หาค่า cut-off โดยวิธี ROC curves ซึ่งมีค่า AUC (The area under the ROC curve) เท่ากับ 0.8055 (รูปที่ 5) และได้ค่า cut-off เท่ากับ 3380 Densitometric score



รูปที่ 5 แสดง The ROC curve ของ ADAM12
ลูกศรชี้แสดงค่า cut-off point ที่ 3380

6. หาค่า diagnostic values

		Cancer	
		+	-
cutoff=3380	+	48	7
	-	9	16

% Sensitivity = 84

% Specificity = 70

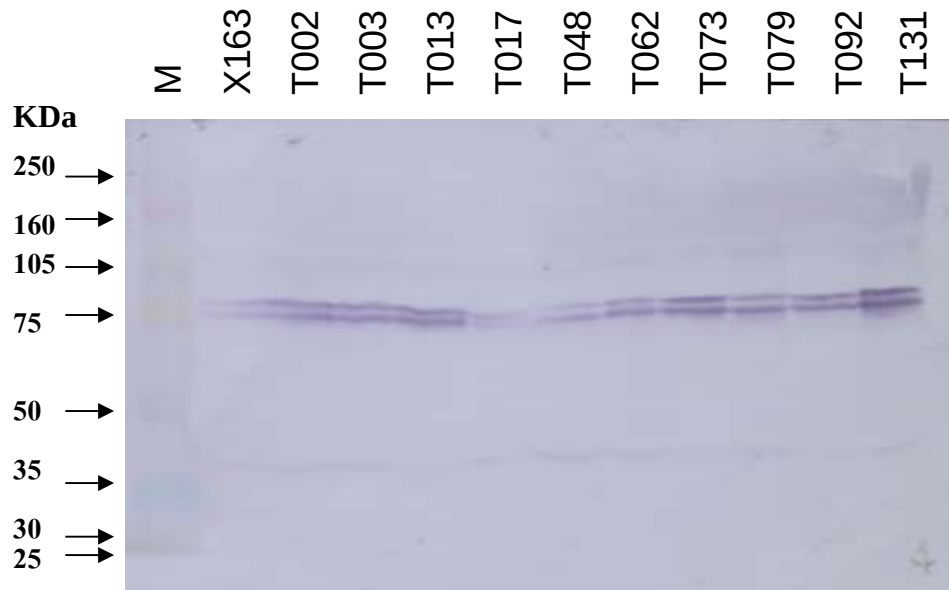
% Positive predictive value = 87

% Negative predictive value = 64

ผลการศึกษา

เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ของ ADAM12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี และทดสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้สารสกัดจากพืชผักและสมุนไพรไทย จำนวน 25 ชนิด

7. การตรวจกรองหาระดับโปรตีน ADAM12 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีด้วย เทคนิค western blot ซึ่งได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 6



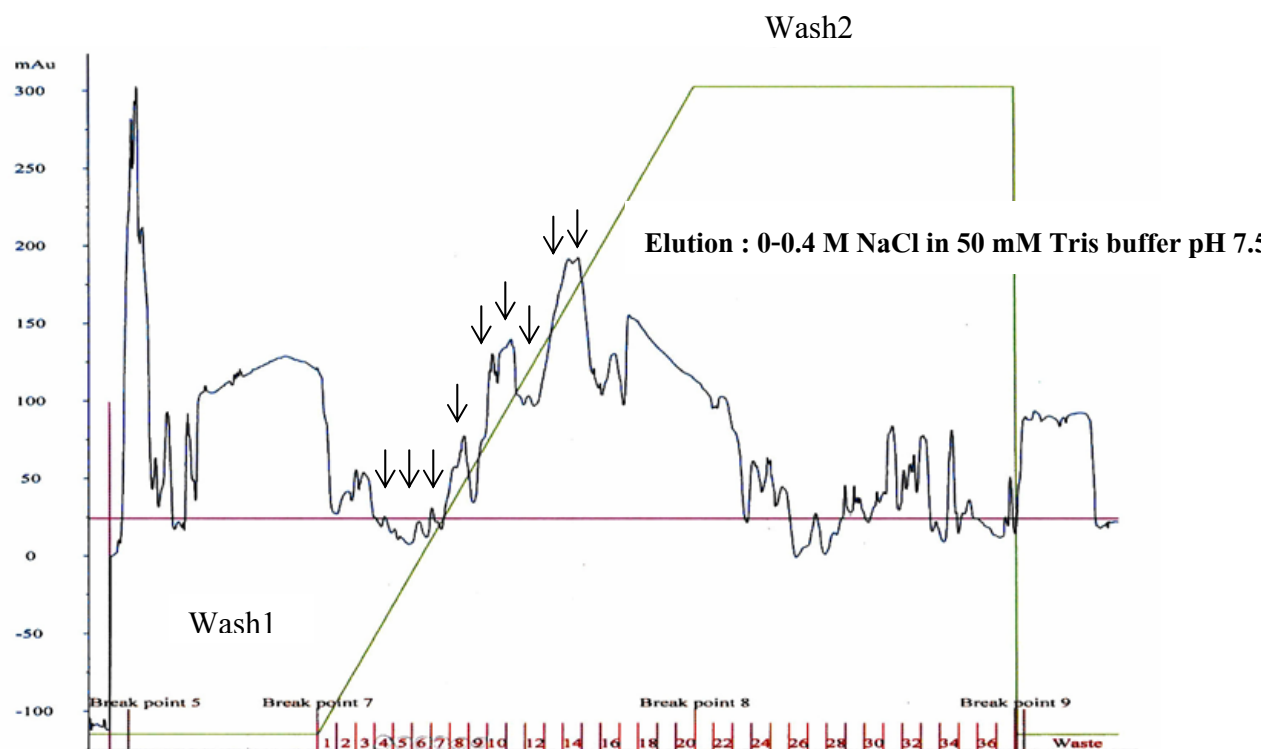
M : Molecular weight marker

รูปที่ 6 ผลการตรวจกรองหาระดับโปรตีนADAM12 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีด้วยเทคนิค western blot

8. การแยกบริสุทธิ์ ADAM12 ด้วยเทคนิค anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง

Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus ซึ่งได้ผลการศึกษาเป็นดังนี้

หลังจากที่ทำการแยกบริสุทธิ์ได้มีการเลือก fraction โดยเทียบกับ HPLC profile ที่ได้ออกมา ซึ่งหลักในการเลือกคือ เลือก fraction ตรงกับเส้นกราฟที่สูงขึ้นในช่วงที่ทำการชะ (Elute) โปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 0.4 M NaCl in 50 mM Tris, pH 7.5 ดังรูปที่ 7



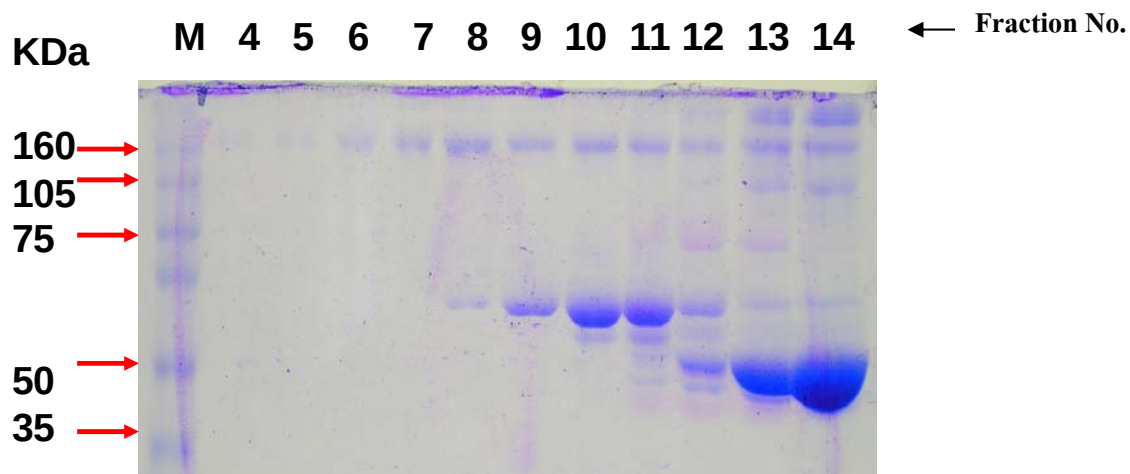
รูปที่ 7 Profile ของการทำบริสุทธิ์ ADAM 12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยการผ่าน Q-FF (Fast Flow) ซึ่งเป็นแบบ strong anion exchange chromatography แล้ว elute ด้วย 0-0.4 M NaCl in 50 mM Tris buffer pH 7.5

จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละ Fraction ด้วย Bradford protein assay kit ซึ่งมีผลความเข้มข้นแสดงในตารางที่ 5 แล้วจึงนำ Fraction ดังกล่าวไปทำ Dialysis แล้วจึงนำมาทำการทดสอบ SDS-PAGE และ Western blot ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ผลความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละ Fraction ที่ตรวจวัดโดย Bradford protein assay kit

fraction No.	final concentration (ug/20ul)
4	0.20
5	0.07
6	0.21
7	0.19
8	0.17
9	0.53
10	1.09
11	1.21
12	1.09
13	3.32
14	4.13

9. ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE, Western blot และตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM 12 ด้วยวิธี zymography ให้ผลการทดสอบดังรูปที่ 8



รูปที่ 8A



รูปที่ 8B

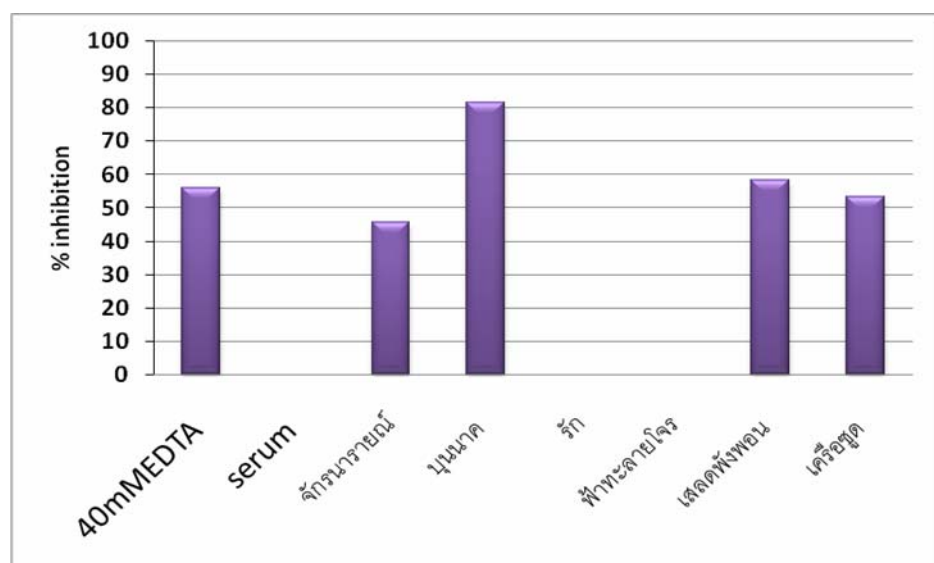
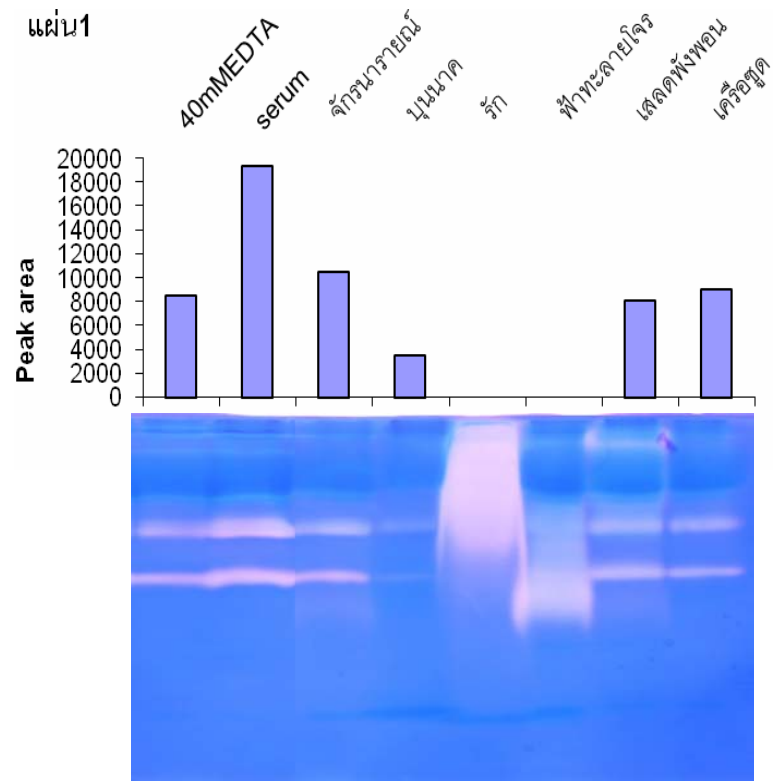
รูปที่ 8 Profile ของการทำบริสุทธิ์ ADAM 12 จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท้องน้ำดีด้วยการผ่าน Q-FF (Fast Flow) ซึ่งเป็นแบบ strong anion exchange chromatography

(A) นำ fraction จากรูปที่ 2 หมายเลข 4-14 มาทำ SDS-PAGE

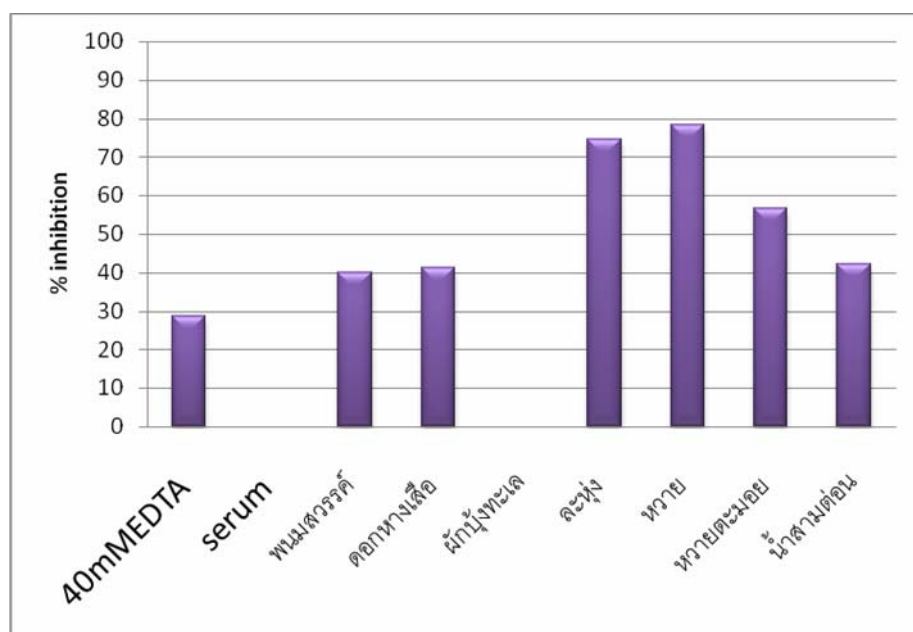
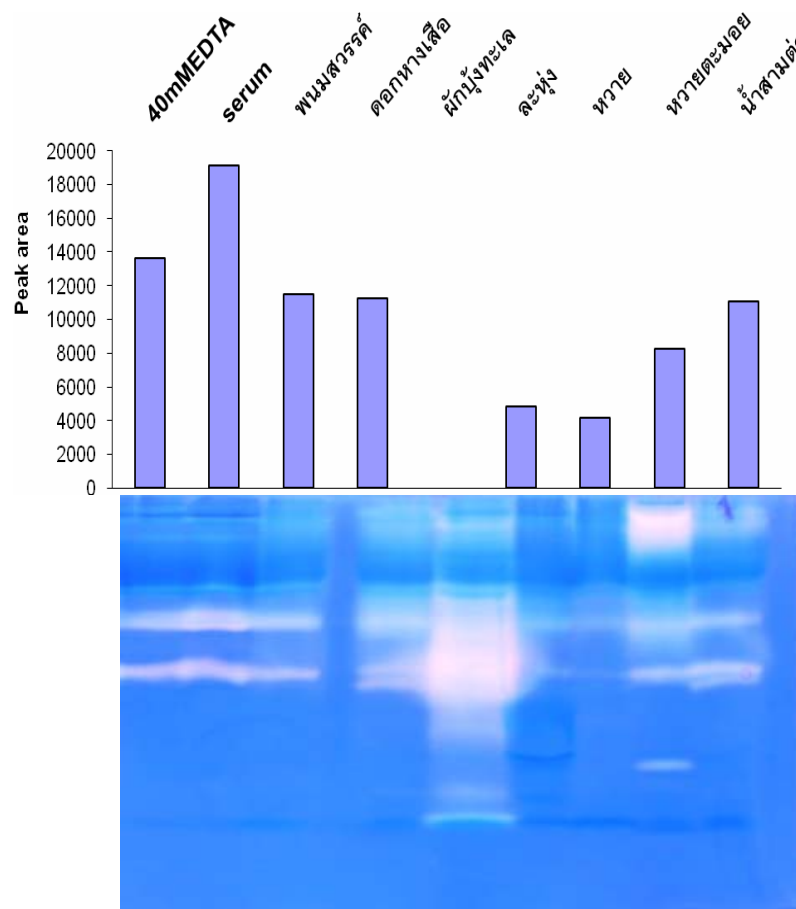
(B) นำ fraction จากรูปที่ 2 หมายเลข 4-14 มาทำ western blot โดยใช้ Anti-ADAM12 เป็น antibody ที่จำเพาะ

M คือ Molecular weight marker, ตัวเลขต่าง ๆ คือหมายเลขของ fraction

10. นำซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท้องน้ำดีมาทดสอบกับ inhibitor (EDTA) และพืชผักสมุนไพร 25 ชนิดแล้วตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM 12 ด้วยวิธี zymography แล้ววัดความเข้มของ clear zone บนแผ่น zymography โดยใช้โปรแกรม Image J และคำนวณ % inhibition ของพืชผักสมุนไพรต่อการทำงานของ ADAM 12 ให้ผลการทดสอบดังรูปที่ 9 สำหรับพืชที่มี gelatinase activity ในบริเวณกว้างจะไม่นำมาคำนวณ % inhibition เช่น รัก ฟักทะลายโจร ผักนึ่งทะเล เป็นต้น

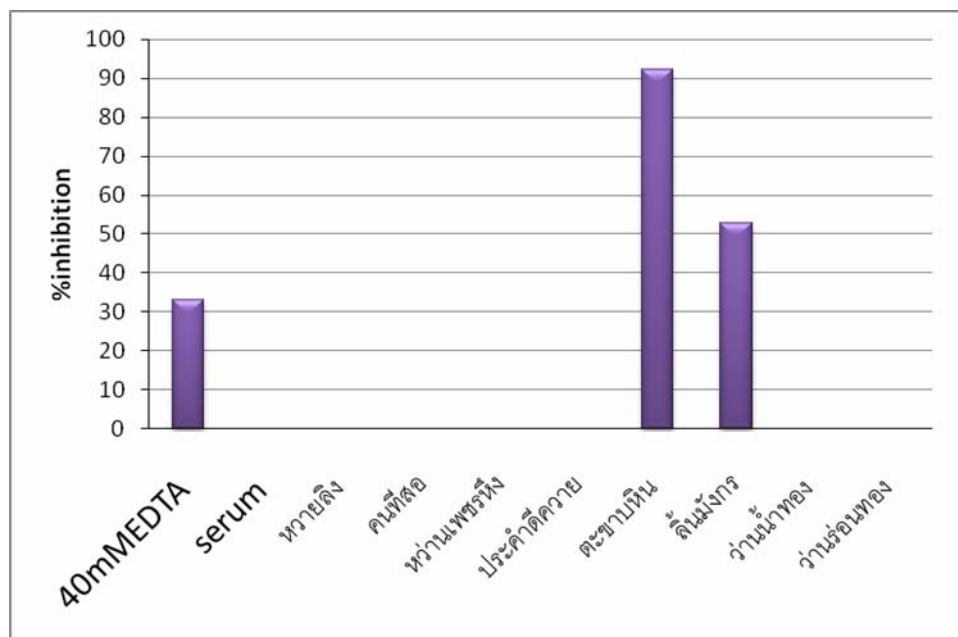
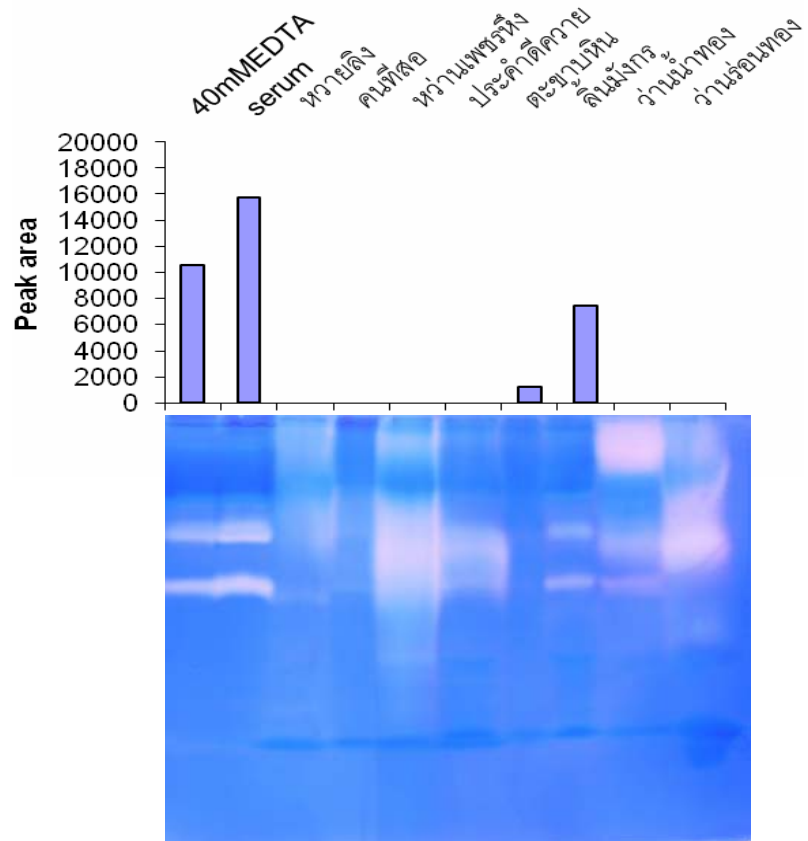


รูปที่ 9A

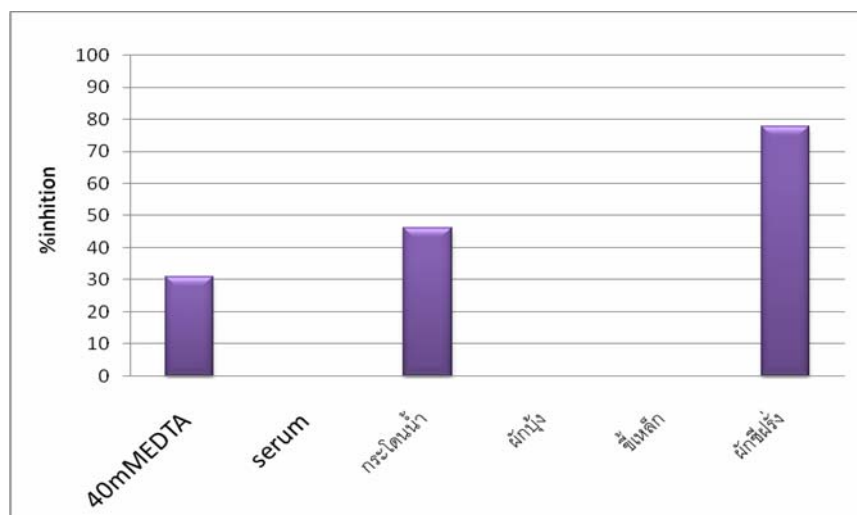
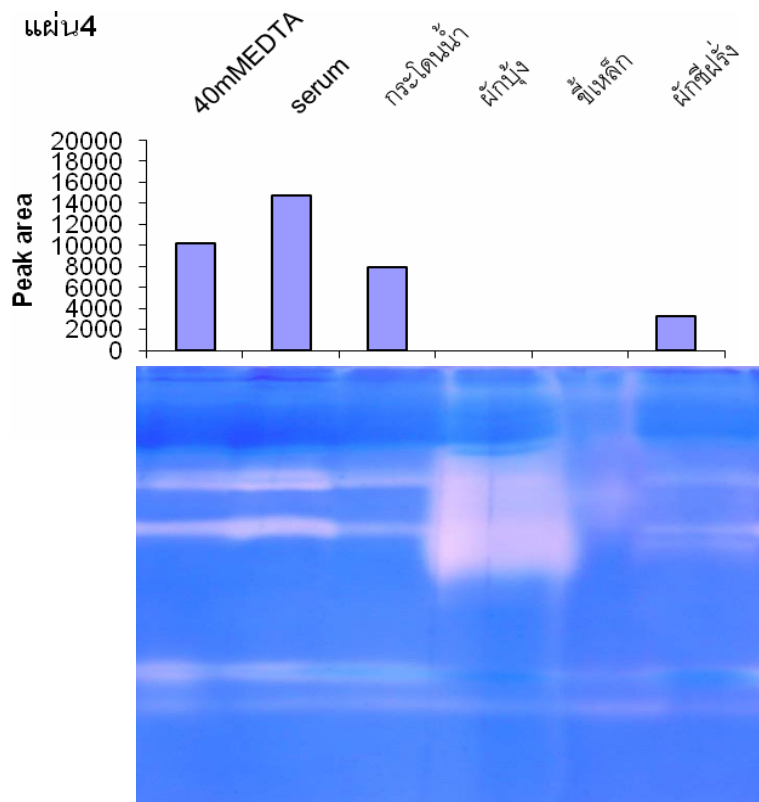


รูปที่ 9B

แผ่น3

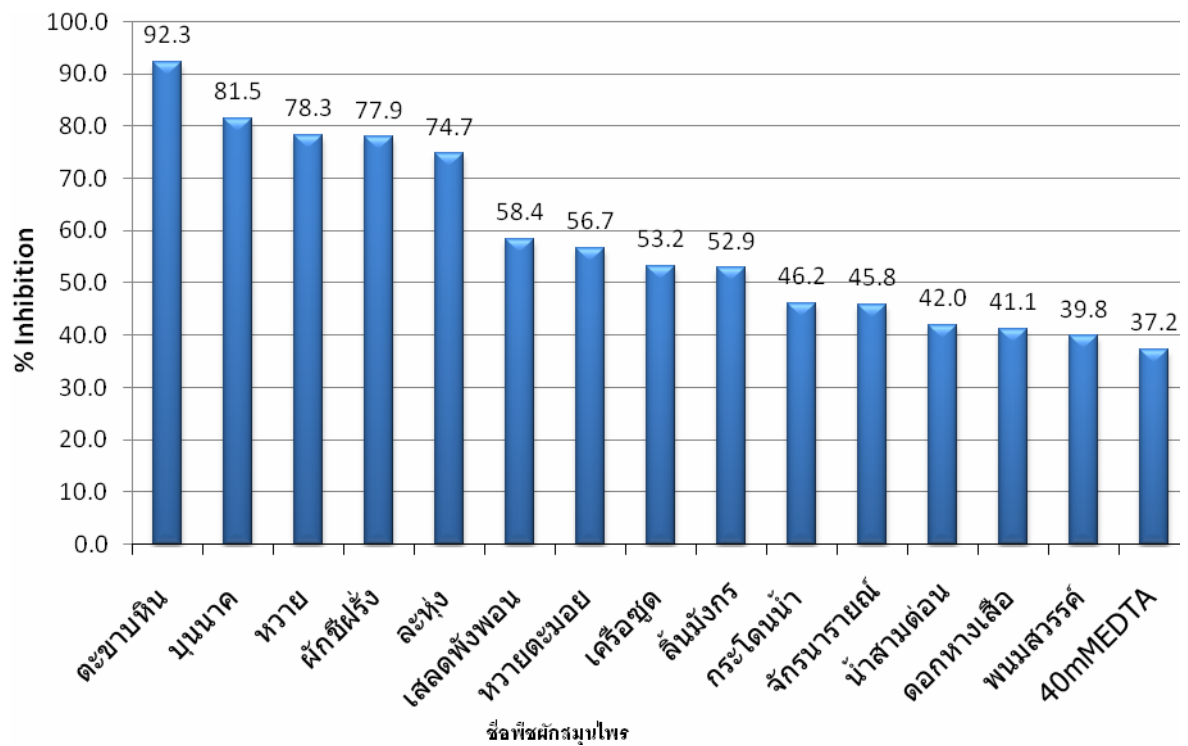


รูปที่ 9C



รูปที่ 9D

รูปที่ 9 แสดงกราฟและแผ่นเจลของการตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ADAM 12 เมื่อทดสอบกับ EDTA และพืชผักสมุนไพร 25 ชนิดด้วยวิธี zymography และกราฟแสดง% inhibition ของพืชผักสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 (9A-9D)



รูปที่ 10 แสดง % inhibition ของพืชผักสมุนไพร 14 ชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 โดยมีการเรียง % inhibition จากมากไปน้อย

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้ gelatinase activity เพื่อตรวจกรองเพื่อแยกความแตกต่างของการทำงานของโปรตีน ADAM ระหว่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและคนปกตินั้นอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่อย่างไรก็ตามอาจใช้เทคนิคนี้ได้ในกรณีที่ใช้ตรวจสอบว่าเอนไซม์กลุ่ม disintegrin/metalloprotease ยังมีแอกติวิตีอยู่หรือไม่

จากการตรวจทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้ anti ADAM 9 และ 12 นั้น จะพบแต่โปรตีน ADAM 12 ในซีรัมตัวอย่างทุกราย ในขณะที่ตรวจไม่พบ ADAM 9 เลย นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ ADAM 12 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีความเข้มข้นมากกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตาม histological type พบว่าระดับของ ADAM 12 ในกระแสเลือดมีแนวโน้มสูงเมื่อความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นถึงแม้ว่าผลการทดสอบทางสถิติจะไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม จากนั้นทำการทดสอบหาค่า diagnostic values ณ จุด cut-off ที่ 3380 พบว่า % Sensitivity = 84, % Specificity = 70, % Positive predictive value = 87 และ % Negative predictive value = 64 ดังนั้นหากจะนำ ADAM 12 ในซีรัมมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอาจต้องใช้ตรวจควบคู่ไปกับการตรวจตามมาตรฐานทางคลินิก หรือการตรวจอย่างอื่นร่วมด้วย

จากการตรวจกรอง ADAM 12 ด้วย rabbit anti- human ADAM 12 (primary antibody) และ Goat anti-rabbit IgG conjugated Alkalinephosphatase (secondary antibody) โดยวิธี Western Blot ผลการตรวจพบว่าให้ผลบวกร้อยละ 100 ในการตรวจพบโปรตีน ADAM12

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีน ADAM 12 ได้โดยใช้เทคนิค HPLC ด้วย anion exchange chromatography ด้วยการผ่าน Q-FF (Fast Flow) ซึ่งเป็นแบบ strong anion exchange chromatography แล้ว elute ด้วย 0-0.4 M NaCl in 50 mM Tris buffer pH 7.5 และสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ADAM 12 ได้โดยวิธี SDS-PAGE

จากการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 ด้วย EDTA และพีชสมุนไพรรจำนวน 25 ชนิดโดยวิธี zymography ผลการทดลองพบว่า ตะขบหินมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 92.3 นอกจากนี้ยังพบว่า พีชสมุนไพรรตัวอื่นที่น่าสนใจ คือ บุนนาค หวาย ผักชีฝรั่ง และละหุ่ง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 ที่สูง (มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 มากกว่า ร้อยละ 70) คิดเป็นร้อยละ 81.5, 78.3, 77.9 และ 74.7 ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการทดสอบ

จากการรายงานพบปริมาณของ ADAM mRNA เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งตับ [4] มะเร็งเต้านม [5] มะเร็งกระเพาะอาหาร [6] เป็นต้น โดยเฉพาะมะเร็งตับจะมี mRNA ของ ADAM ชนิด 12 เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า โดยมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงของโรค [4] นอกจากนี้ ยังพบโปรตีน ADAM 12 หลุดออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ซึ่งปริมาณของโปรตีน ADAM 12 ในปัสสาวะจะแปรผันโดยตรงกับความรุนแรงของโรค ถ้าเป็นมะเร็งระยะลุกลามจะพบระดับสูงกว่าระยะเริ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [7] โปรตีน ADAM 12 มี 2 รูปแบบ คือ L และ S [18] (L = membrane- anchored long form, S = shorter secreted form) ซึ่งในการศึกษาโปรตีน ADAM 12 หลุดออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมโดยการทำให้ western blot จะพบว่าโปรตีนที่ตรวจสอบได้มีขนาดโมเลกุล ~ 68 KDa ซึ่งเป็น shorter secreted form สามารถหลุดออกมาในปัสสาวะได้ ซึ่งแตกต่างกับการวิจัยในครั้งนี้ซึ่งทำการศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยในการศึกษาได้มีการทำ western blot พบว่าโปรตีนที่ตรวจสอบได้มีขนาดโมเลกุล ~ 92 KDa ซึ่งเป็น membrane- anchored long form ของโปรตีน ADAM12

ในการแยกบริสุทธิ์โปรตีน ADAM12ด้วยเทคนิค anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง Mini HPLC รุ่น ÄKTAprime™ plus สามารถทำการแยกบริสุทธิ์ได้แต่ปริมาณโปรตีน ADAM 12 ที่ทำการแยกบริสุทธิ์ได้มีปริมาณน้อย ทำให้ไม่สามารถนำมาทดสอบกับสารยับยั้งชนิดต่างๆได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่ได้ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาทำการทดสอบกับพืชผักสมุนไพรจำนวน 25 ชนิดเพื่อทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน ADAM 12

จากรายงานพบว่าโปรตีน ADAMs มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับโปรตีนในพิษงู (Snake venom metalloproteases; SVMPs) และจากภูมิปัญญาพื้นบ้านไทยที่ได้มีการใช้สมุนไพรในการรักษาผู้ที่ถูกงูพิษกัดสืบทอดกันมา ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาพืชผักสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้ในการรักษาผู้ที่ถูกงูพิษกัดรวมทั้งสมุนไพรพื้นบ้านอื่นๆที่ใช้ในการรักษาแผลจากแมลงสัตว์กัดต่อย ซึ่งสมุนไพรดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 และอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษา และควบคุมการลุกลามแพร่กระจายของมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จากการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 โดยใช้พืชสมุนไพรจำนวน 25 ชนิดพบว่า พืชจำนวน 14 ชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ADAM 12 ได้โดยพบว่า ตะขบหินมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 92.3 นอกจากนี้ บุนนาค หวาย ผักชีฝรั่ง ละหุ่ง เสดดพังพอน ก็พบว่าฤทธิ์ยับยั้งที่สูง คิดเป็นร้อยละ 81.5, 78.3, 77.9, 74.7, 58.4 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดสอบหาว่าในน้ำสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเจลาติน (Gelatinase activity) หรือไม่ ดังนั้นควรเพิ่มการทดสอบ zymography ในน้ำสกัดผักทุกชนิดที่นำมาทดสอบด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Wang J and Chen S. Screening and identification of gastric adenocarcinoma metastasis-related genes using cDNA microarray coupled to FDD-PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128(10): 547-53.
2. Crawford HC and Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 1994; 14(1-6): 234-45.
3. Duffy MJ, Lynn DJ, Lloyd AT, O'Shea CM. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost* 2003; 89(4): 622-31.
4. Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, Coutand A, Musso O, Baffet G, Clement B, Theret N. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. *Hepatology* 2003; 37(5): 1056-66.
5. Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H, Rocken C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131(1): 41-8.
6. Yoshimura T, Tomita T, Dixon MF, Axon AT, Robinson PA, Crabtree JE. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *J Infect Dis* 2002; 185(3): 332-40.
7. Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE, Moses MA. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J Biol Chem* 2004; 279(49): 51323-30.
8. Chinsri P, Buransan Y. Promoter hypermethylation of *p73* in cholangiocarcinoma.
9. Khuntikao. Current Concept in Management of Cholangiocarcinoma. *J Srinagarined Med* 2005; 20(3).
10. Thamavit W, Bhamarapavati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1978; 38(12): 4634-9.
11. Elkins DB, Haswell-Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P, Sithithaworn P, Kaewkes S, Bhudhisawasdi V, Uttaravichien T. A high frequency of hepatobiliary disease and suspected cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small community in north-east Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(5): 715-9.
12. Elkins DB, Mairiang E, Sithithaworn P, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Haswell-Elkins MR. Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor

- conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(3): 295-301.
13. Haswell-Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Sithithaworn P, Elkins DB. Cross-sectional study of *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand. *Int J Cancer* 1994; 59(4): 505-9.
 14. Ohshima H, Bandaletova TY, Brouet I, Bartsch H, Kirby G, Ogunbiyi F, Vatanasapt V, Pipitgool V. Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Carcinogenesis* 1994; 15(2): 271-5.
 15. Shirabe K, Shimada M, Harimoto N, Sugimachi K, Yamashita Y, Tsujita E, Aishima S. Intrahepatic cholangiocarcinoma: its mode of spreading and therapeutic modalities. *Surgery* 2002; 131(1 Suppl): S159-64.
 16. Seals DF and Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003; 17(1): 7-30.
 17. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 1998; 273(43): 27765-7.
 18. Chubinskaya S, Mikhail R, Deutsch A, Tindal MH. ADAM-10 protein is present in human articular cartilage primarily in the membrane-bound form and is upregulated in osteoarthritis and in response to IL-1alpha in bovine nasal cartilage. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(9): 1165-76.
 19. Chang C and Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001; 11(11): S37-43.
 20. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin B, Frohlich C, Loechel F, Zolkiewska A, Ishiguro K, Kojima T, Liu W, Langford JK, Sanderson RD, Brakebusch C, Fassler R, Wewer UM. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 2000; 149(5): 1143-56.
 21. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* 1999; 154(5): 1489-501.
 22. Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, Kamijo K, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 1995; 377(6550): 652-6.

23. Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem J* 1998; 334 (Pt 1): 93-8.
24. Cerretti DP, DuBose RF, Black RA, Nelson N. Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(3): 810-5.
25. Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273(1): 157-66.

ภาคผนวก

ตารางที่ 6 ชื่อพืชผักสมุนไพรและสรรพคุณทางยา

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ
1	จักรนารายณ์	<i>Gynura sarmentosa(L.) DC.</i>	ASTERACEAE	ใบ	แก้อาการอักเสบ ปวดบวม ผื่นคัน แก้พิษแมลงกัดต่อย และโรคริม
2	นุนนาค	<i>Mesua ferrea</i> Linn.	GUITTIFERAE	ดอกแห้ง เนื้อใน เมล็ด	บำรุงหัวใจ เป็นยาขับเสมหะ ตำพอกแผล
3	รัก	<i>Calotropis gigantea</i> L. Dryandr ex W.T.Aiton	ASCLEPIADACEAE	-	-
4	ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.) Wall. ex Nees	ACANTHACEAE	ดอก	เป็นยาแก้เจ็บคอ แก้ท้องเสีย แก้ไข้
5	เสลดพังพอน	<i>Barleria lupulina</i> Lindl.	ACANTHACEAE	ใบ ราก	พอกฝี แก้ช้ำบวม ทั้งต้น แก้พิษงู แก้ ปวดฟัน ฝนกับสุรา ทาถอนพิษงู ตะขาบ แมลง ป่อง ผึ้ง
6	เครือชูด	<i>Parameria laevigata</i> (Juss.) Moldenke	APOCYNACEAE	เปลือก	-
7	พนมสวรรค์	<i>Clerodendrum paniculatum</i> Linn.	VERBENACEAE	ราก ต้น ใบ	ใช้เป็นยาถ่าย ใช้แก้พิษตะขาบ หรือแมลงป่องต่อย ใช้แก้ลมในทรวงอก หรือนำมาตำพอก ลดอาการปวดข้อ
8	ดอกหางเสือ	-	-	-	-
9	ผักบุ้งทะเล	<i>Ipomoea pes-caprae</i> (Linn.) Sweet	CONVOLVULACEAE	ใบ ต้น เมล็ด ราก	ใช้ทาภายนอก แก้แผลเรื้อรัง แก้อา การจุกเสียด แก้พิษจากแมลงกะพรุน ใช้เป็นยาถอนพิษลมเพลมพัด ใช้ทาแก้ พิษแมลงกะพรุนไฟ ต้มอาบแก้อาการ คันตามผิวหนัง ใช้เป็นยาแก้ปวดท้อง แก้ตะคริว แก้โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ
10	ละหุ่ง	<i>Ricinus communis</i> L.	EUPHORBIACEAE	ใบ ราก	เป็นยาขับน้ำนม แก้ไข้ร้ว (อาการคลื่น ปัสสาวะไม่อยู่) ใช้เป็นยาแก้พิษ แก้ไข้เชื่องซึม

ลำดับ	ชื่อผักสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ
11	หวาย	<i>Calamus siamensis</i>	PALMACEAE	ยอดอ่อน	สมานแผลในกระเพาะและลำไส้ ขับลม ขับเหงื่อ ช่วยระบายท้อง เป็นอาหารบำรุงธาตุดิน
12	หวายตะมอย	<i>Pothos scandens</i> Linn.	ARACEAE	ใบ	บดผสมกับน้ำเย็น ใช้อาบแก้โรคชัก และโรคลมบ้าหมู ตำพอกท้องเด็ก ทำให้ร้อน เพื่อขับพยาธิในลำไส้ พอกปิดแผลฝีดาษ
13	น้ำสามตอน	-	-	-	-
14	หวายลิง	<i>Flagellaria</i>	FLAGELLARIACEAE	-	-
15	คนทีสอ	<i>Vertex trilolic</i> Linn.	VERBENACEAE	ผล	แก้ริดสีดวงทวาร, แก้ไอหืด
16	ว่านเพชรหึง	<i>Grammatophyllum speciosum</i>	GRAMMATOPHYLLUM	-	-
17	ประคำดีควาย	<i>Sapindus emarginatus</i> Wall.	SAPINDACEAE	ดอก เมล็ด ต้น เปลือกต้น	แก้พิษผดผื่นคัน แก้โรคผิวหนัง แก้ลมคลื่นเหียน แก้ไข้ แก้พิษ แก้รังแค แก้ชันตุ
18	ตะขาบหิน	<i>Platyciada</i> (F.b. Muell.) Meissn	POLYGONACEAE	ต้นและ ใบ	ตำผสมเหล้าพอกหรือคั้นเอาน้ำทา ถอนพิษแมลงป่องและตะขาบ, แก้ฟกบวม เคล็ดขัดยอก
19	ลิ้นมังกร	<i>Sauropus changiana</i> S.Y.Hu	EUPHORBIACEAE	ใบ ดอก	แก้ไอแห้ง ๆ เจ็บคอ หอบหืด บำรุงปอด ไอเป็นเลือดเสียงแหบ แห้ง แก้ไอเป็นเลือด ใช้ดอกสดต้มน้ำกิน
20	ว่านน้าทอง	<i>Ludisia discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich.	ORCHIDACEAE	ต้น และ ราก ดอก	รักษาเลือดลม หืด ไอ โรคริดสีดวง ท้องมาน กระเพาะอาหารพิการ เส้นประสาทไม่ปกติ แก้ปวดข้อ ปวดกระดูก หรือแก้ท้องอืดเพื่อใช้เป็นยาขับเหงื่อและรักษาโรคปอด
21	ว่านร้อนทอง	<i>Globba malaccensis</i> Ridl.	ZINGIBERACEAE	หัว	ใช้เป็นยารักษาพิษฝี พิษงู พิษตะขาบ พิษแมงป่อง
22	กระโดนน้ำ	<i>Barringtonia Acutangula</i> (Linn.) Gaertn.	BARRINGTONIACEAE	เปลือก ใบ ราก	ใช้ล้างบาดแผล สมานแผลเรื้อรัง แก้ท้องร่วง ใช้เป็นยาระบาย

ลำดับ	ชื่อผักสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ
23	ผักนึ่ง	<i>Ipomoea aquatica</i> <i>Forsk.</i> <i>Ipomoea reptans Poir.</i> (Syn.)	CONVOLVULACEAE	ทั้งต้น	ถอนพิษเบื่อเมา
24	ขี้เหล็ก	<i>Cassia siamea Britt.</i>	LEGUMINOSAE	ดอก ใบอ่อน ใบ	เป็นยานอนหลับ ลดความดันโลหิต เป็นยาระบาย แก้ระดูขาว แก้ไข้ ขับปัสสาวะ
25	ผักชีฝรั่ง	<i>Petroselinum</i> <i>crispum (Mill.) A.W.</i> <i>Hill</i>	UMBELLIFERAE	ใบ ทั้งต้น ใบและ ดอก	-เอามาตำเป็นยาทาแก้แผลเรื้อรัง และ แก้บวม -แก้แมลงสัตว์กัดต่อย แก้ปวดศีรษะ อาหารเป็นพิษ -ช่วยลดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลม ในกระเพาะอาหาร