

# การยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดหูหนูขาวโดย Tamoxifen และ Oestradiol (Inhibition of Rat Myometrial Contraction by Tamoxifen and Oestradiol)

ดร.อมรา วจิณานันท์\*

\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## Abstract

The antioestrogen tamoxifen, widely used in the treatment of breast cancer, and oestradiol rapidly inhibited contraction of isolated rat myometrium induced by many kinds of spasmogens eg. oxytocin, acetylcholine, potassium and cold contracture showed that the inhibition probably involved a common pathway. The inhibition was too rapid in onset (~ 3 min) to be via the classical oestrogen receptor pathway followed by changes in RNA transcription and protein synthesis. Moreover, the finding that oestradiol which has higher affinity to its own receptor than tamoxifen could not prevent or even reduce inhibition effect of tamoxifen but the interaction was additive supported the above conclusion. Rapid and complete recovery from oestradiol inhibition and generally good recovery, after a certain time, from tamoxifen inhibition indicated that the effect was not due to cytotoxicity.

## บทคัดย่อ

สาร antioestrogen ชื่อ tamoxifen ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม และ oestradiol มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดหูหนูขาว ใน organ bath จากการกระตุ้นของ oxytocin, acetylcholine, potassium และ cold contracture แสดงว่าสารยับยั้งไม่ได้มีผลเฉพาะเจาะจงต่อวิธีการใดวิธีการหนึ่งที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัว การยับยั้งเกิดเร็วมากเห็นผลภายใน 3 นาทีแรก หลังการให้สาร รวมทั้งพบว่า oestradiol ซึ่งสามารถ

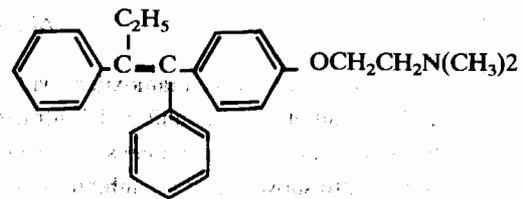
ร่วมกับ oestrogen receptor ได้เร็วและแน่นกว่า tamoxifen ไม่สามารถป้องกันหรือลดการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดหูหนูขาวโดย tamoxifen ได้ ยิ่งกว่านั้นกลับทำให้ผลการยับยั้งมากกว่าการใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว ซึ่งให้เห็นว่าสารทั้งสองมีผลผ่าน pathway ง่าย ๆ ที่ไม่สัมพันธ์กันมากที่ จะผ่านการรวมตัวกับ oestrogen receptor แล้วทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการสร้าง mRNA และโปรตีน รวมทั้งการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อหลอดหูหนูขาวจากการหยุดให้สาร แสดงว่าผลของสารทั้งสองไม่ได้เกิดจากความ เป็นพิษของสารต่อเซลล์กล้ามเนื้อ

## บทนำ

จากสถิติของผู้หญิงตะวันตกที่ตายด้วยโรคมะเร็ง พบว่ามะเร็งในเต้านม เป็นสาเหตุการตายที่พบบ่อยที่สุด ในรอบหลายสิบปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างมากรวมถึงสารที่อาจใช้บำบัดโรคมะเร็งนี้ได้ บริษัท ICI Pharmaceuticals แห่งประเทศอังกฤษได้สังเคราะห์สารชนิดหนึ่งชื่อ tamoxifen (หรือ Nolvadex) (รูปที่ 1) ซึ่งแต่เดิมใช้เป็นยาคุมกำเนิดในสตรี เนื่องจากพบว่าสามารถป้องกันการฝังตัวของตัวอ่อนในหนูขาว (rat) ได้ (Harper & Walpole, 1967) ต่อมา มีผู้พิสูจน์ว่าสามารถใช้รักษามะเร็งในเต้านมได้ เนื่องจากมีฤทธิ์ต่อต้านฮอร์โมน oestrogen (Cole et al, 1971) และความจริงที่ว่า oestrogen เป็นฮอร์โมนที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งในเต้านม ถูกค้นพบโดยบังเอิญจากผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งในเต้านม ซึ่งถูกผ่าตัดเอารังไข่ออกโดยความจำเป็นอื่น อันมีผลโดยตรงทำให้ oestrogen ในกระแสโลหิตลดลงอย่างมากและพบว่าอาการป่วยด้วยโรคมะเร็งของผู้ป่วยทุเลาลงมาก (Burn, 1974)

ในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมซึ่งถูกรักษาด้วย tamoxifen พบว่ามีอาการข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน ปวดหัว และอาการทางประสาทอื่นๆ น้อยมาก (Patterson & Baum, 1978) อย่างไรก็ตามผลการรักษาขึ้นอยู่กับกลุ่มของผู้ป่วย ว่ามีหรือไม่มี receptor protein ที่เป็นตัวรับ oestrogen Patterson et al (1982) ได้ศึกษา รายงานที่ตีพิมพ์จากโรงพยาบาลต่าง ๆ 40 แห่ง สรุปว่า tamoxifen มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม (47%) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี oestrogen receptor และมีประสิทธิภาพต่ำ (10%) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มี oestrogen receptor โดยทั่วไป

เชื่อว่า tamoxifen มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยการแย่ง oestrogen จับกับ receptor ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม (Nicholson & Griffiths, 1980) สำหรับ oestrogen นั้นเชื่อว่าเมื่อจับกับ receptor ของมันแล้ว complex ที่ได้จะผ่านเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ แล้วมีผลต่อการสร้าง mRNA โยเอสโตรเจนที่จำเป็นต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ (Jensen et al, 1974) ถ้าสมมุติฐานนี้เป็นจริงก็เป็นที่น่าสงสัยว่าทำไมกว่า 50% ของผู้ป่วยกลุ่มที่มี oestrogen receptor จึงไม่ตอบสนองต่อ tamoxifen ขณะที่ 10% ของกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีจึงตอบสนองเป็นอย่างดีต่อสารนี้



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ tamoxifen (trans-1-(4-B-dimethylamino-ethoxyphenyl)-1,2-diphenylbut-1-ene)

Martin (1981) รายงานว่ามดลูกของหนูขาวที่ได้รับ tamoxifen คู่อ่อนและคลายตัว (flaccid) ตลอดเวลา น่าจะเป็นอิทธิพลบางประการของ tamoxifen หลังจากการสังเกตนี้ไม่นาน Martin, Lipton และผู้รายงาน (Lipton et al, 1984) ได้ศึกษาผลของ tamoxifen และ oestradiol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกใน organ bath เพื่อเป็นอีก model หนึ่งที่จะศึกษาการทำงานของ tamoxifen พบว่าสารทั้งสองมีผลยับยั้งปัสในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่ถูกกระตุ้นด้วย oxytocin และเมื่อให้ทั้ง tamoxifen และ oestradiol ในเวลาเดียวกันพบว่านอกจาก oestradiol จะไม่ป้องกันหรือลดการทำงานของ tamoxifen แล้ว มันยังส่งเสริมการทำงานของ

tamoxifen โดยทำให้ผลการยับยั้งเพิ่มขึ้นอย่างมาก เขาสรุปว่าการทำงานของ tamoxifen ไม่ผ่าน oestrogen receptor อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่า การยับยั้งโดยสารทั้งสองอาจกระทำโดยผ่าน receptor ที่เฉพาะเจาะจงกับ oxytocin ก็ได้ จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาผลของ tamoxifen ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อคดลูกโดยสารกระตุ้นกล้ามเนื้อ ชนิดอื่น ๆ เช่น acetylcholine, potassium และ cold contracture ซึ่งมีวิธีการที่แตกต่างกันในการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัว

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศเมียพันธุ์ Wistar น้ำหนักประมาณ 150 กรัม หลังผ่าตัดรังไข่ออกอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ฉีด  $17\beta$ -oestradiol valerate (Primogyn depot, Schering, Berlin) ที่ละลายด้วย arachis oil ในปริมาณ  $20 \mu\text{g}/\text{น้ำตักตัว}$  1 กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อเป็นเวลา 1-3 วัน หลังจากนั้นฆ่าสัตว์และพยายามให้เลือดออกจากร่างกายมากที่สุด ตัดเอามดลูกข้างหนึ่งออกมาผ่าตามยาวให้ได้สองชิ้นเท่าๆ กัน แล้วดึงเอา endometrium ออกขณะแช่ใน Krebs solution จะได้กล้ามเนื้อคดลูกสองชิ้น นำไปผูกแขวนใน organ baths (ความจุ 12 มล.) ที่มี Krebs solution อันละหนึ่งชิ้น แล้วโยงเชือกต่อไปยัง Statham UC3-L5 strain gauge เพื่อบันทึกการหดตัวแบบ isometric โดยมีเครื่องบันทึกแสดงเป็นกราฟ (รูปที่ 2) และมี microprocessor ที่ควบคุมการล้าง (rinse) และการเติม medium ใน bath ตลอดจนการคำนวณการหดตัวของกล้ามเนื้อโดยเปลี่ยนจากค่ากรัม tension เป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัว (ดูรายละเอียดใน Lipton et al, 1984)

### Reagents และ Medium

Tamoxifen (ICI) และ oestradiol (Sigma)

ละลายด้วย ethanol ให้มีความเข้มข้นใน bath ตามระดับที่ต้องการ

Krebs solution (modified) ประกอบด้วย (ตัวเลขในวงเล็บเป็นความเข้มข้นมีหน่วยเป็น mmol/l) : NaCl (120.5),  $\text{NaHCO}_3$  (24.9), KCl (4.7),  $\text{CaCl}_2$  (1.3),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.2),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.2), D-glucose (5.6) ให้ฟองอากาศที่มี  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$  ตลอดเวลา และปรับให้ pH เป็น 7.4 ด้วย bicarbonate- $\text{CO}_2$ -buffer system และให้มีอุณหภูมิ  $35^\circ\text{C}$

สารกระตุ้นกล้ามเนื้อ : มี 4 ชนิด

1. Oxytocin (Syntocinon, Sandoz) ละลายด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นใน bath เท่ากับ  $1.28 \times 10^{-6}$  mol/l

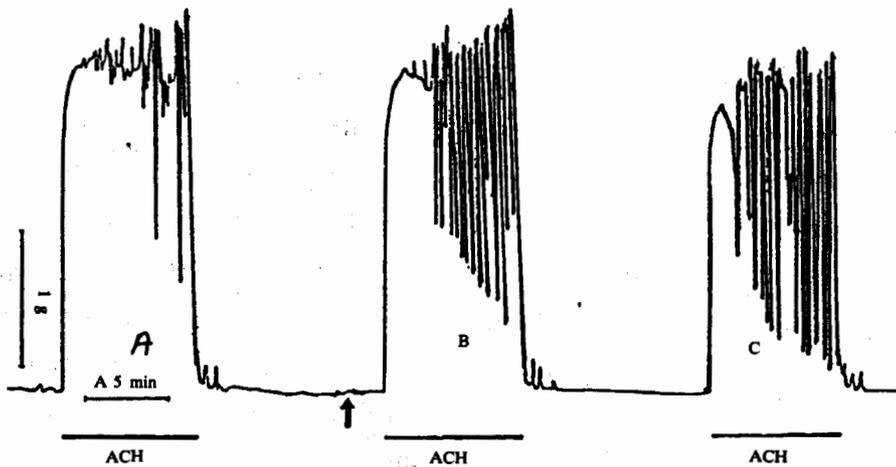
2. Acetylcholine (Sandoz) ละลายด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นใน bath เท่ากับ  $5.5 \times 10^{-5}$  mol/l

3. Potassium Krebs solution ประกอบด้วยทุกอย่างเหมือน Krebs solution ยกเว้นไม่ใส่ NaCl และ  $\text{NaHCO}_3$  และใส่ KCl เป็น 199 mmol/l

4. Cold contracture ใช้ Krebs Solution ตามข้างบน แต่ปรับให้มีอุณหภูมิประมาณ  $7^\circ\text{C}$

### วิธีการทดลอง

หลังจากผูกแขวนชิ้นกล้ามเนื้อคดลูกใน organ bath แล้ว ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วเติม ethanol ให้มีความเข้มข้นใน bath เท่ากับ 0.4% ทิ้งไว้อีก 25 นาที แล้วเติม oxytocin หรือ acetylcholine อันจะทำให้กล้ามเนื้อเริ่มหดตัว ทิ้งไว้ 9 นาที (สำหรับการกระตุ้นด้วย potassium และ cold contracture ให้แทนที่ Krebs solution ปกติด้วย potassium Krebs solution และ cold normal krdbs solution ตามลำดับ) ขณะนี้เครื่องบันทึก



รูปที่ 2 กราฟที่ได้จากการบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อคอกหนูขาว จากการกระตุ้นโดย acetylcholine (ACH), A เป็น control response เมื่อมี 0.4% ethanol ใน medium B และ C เป็นการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดลงเมื่อเทียบกับ A หลังจากเติม  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen (ลูกศร) ลงใน medium เวลานอกเส้นมาร์กที่มี ACH อยู่ข้างใต้เป็นระยะพักของกล้ามเนื้อเมื่อส่ง ACH ออกไป

กราฟ และ microprocessor จะเริ่มทำงาน วัดการหดตัวของกล้ามเนื้อซึ่งขณะนี้เรียก "initial control response" แล้วล้างสารที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวออกไป และให้กล้ามเนื้อพัก ซึ่งจะกินเวลาอีก 16 นาที รวมเป็น 25 นาที ต่อหนึ่งรอบ แล้วทำเช่นนี้อีกครั้งในรอบที่สอง (หรือสาม, ถ้าจำเป็น) จะได้ค่า "initial control response" เท่าๆ กันทั้ง 2-3 ครั้ง หากค่าเฉลี่ยและกำหนดให้เท่ากับ 100% จากนั้นเริ่มรอบต่อไปอีกโดยใส่สารยับยั้ง (tamoxifen และ/หรือ oestradiol) ใน bath ด้วย กำหนดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อโดยเทียบกับค่า 100% ของ "initial control response" ซึ่งหลังจากการให้สารยับยั้งกล้ามเนื้อจะหดตัวด้วยความแรงน้อยลงจะได้ค่าน้อยกว่า 100% สมมุติเป็นค่า x จากนั้นเอาค่า x ลบจาก 100% จะได้ค่า % inhibition ทำการทดลองในรอบต่อไป จนกระทั่งถึงจุดสมดุลซึ่งได้ค่า % inhibition ใน 2-3 รอบสุดท้าย

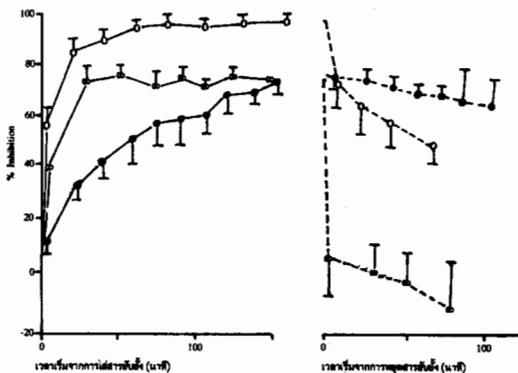
ประมาณค่าใกล้เคียงกัน ( $\pm 5\%$ ) หรือเมื่อกล้ามเนื้อได้รับสารยับยั้งประมาณ 2 ชั่วโมง ก็หยุดสารและเติม ethanol แทนและทำรอบต่อๆ ไปอีก และคำนวณค่าแบบเดิม เพื่อศึกษาว่ากล้ามเนื้อฟื้นตัว (recovery) จากสารยับยั้งหรือไม่

ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการหดตัวของกล้ามเนื้อจากการกระตุ้นโดย acetylcholine แสดงไว้ในรูปที่ 2 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่ถูกกระตุ้นโดย oxytocin (Lipton et al, 1984)

### การวิเคราะห์ผลการทดลอง

หาค่าเฉลี่ยของ % inhibition จากการทดลองที่เหมือนกันและในรอบเดียวกัน โดยนับเริ่มจากการให้สารยับยั้ง แสดงผลการทดลองเป็นกราฟและคำนวณหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี ANOVA เมื่อเหมาะสม

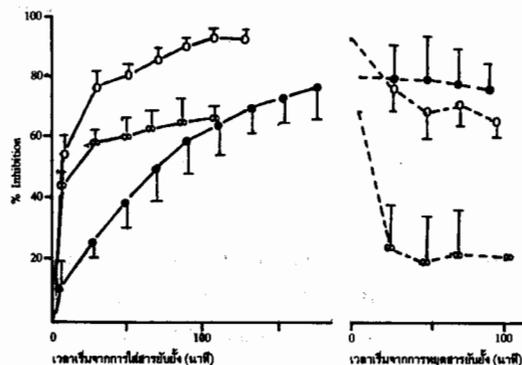
### ผลการทดลอง



รูปที่ 3 กราฟแสดงผลการยับยั้งของ  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen (●—●, n=7),  $10^{-5}$  mol/l oestradiol (○—○, n=3) และทั้งสองร่วมกัน (○—○, n=4) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกหนูขาวจากการกระตุ้นโดย oxytocin ผลแสดงเป็นค่า % inhibition  $\pm$  SEM เส้นทึบแสดงเวลาการยับยั้ง (inhibitory period) และเส้นประแสดงเวลาการฟื้นตัว (recovery period)

รูปที่ 3 แสดงการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูก โดย  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen และ/หรือ  $10^{-5}$  mol/l oestradiol เมื่อถูกกระตุ้นโดย oxytocin พบว่าสารทั้งสอง สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกได้โดยที่ oestradiol มีผลเฉียบพลันกว่า tamoxifen แต่เมื่อเวลา 2 ชั่วโมงผ่านไป การยับยั้งของทั้งสองมีค่าเท่าๆ กัน และเมื่อให้สารยับยั้งทั้งสองในเวลาเดียวกัน พบว่าจะให้ผลการยับยั้งที่สูงกว่าเมื่อให้สารใดสารหนึ่งเพียงอย่างเดียวย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) เมื่อเอาสารยับยั้งออกไปพบว่าในระยะการฟื้นตัว (recovery period) treatment ที่ได้รับ oestradiol อย่างเดียวมีการฟื้นตัวสมบูรณ์มาก กล้ามเนื้อสามารถหดตัวได้แรงกว่าค่า "initial control response" เสียอีก สำหรับ treatment ที่ได้รับสารทั้งสองในเวลาเดียวกันมีการฟื้นตัวดีกว่า treatment ที่ได้รับ tamoxifen อย่างเดียวย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

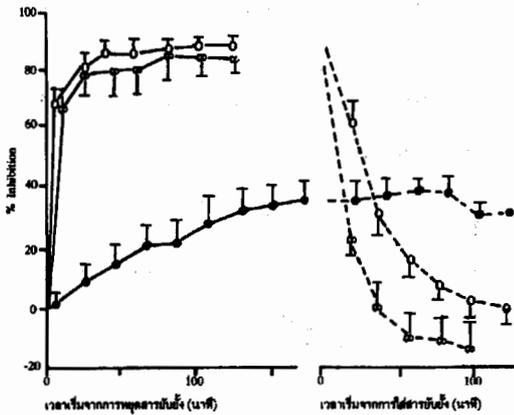
เพื่อพิสูจน์ว่าทั้ง tamoxifen และ oestradiol ไม่ได้มีผลเฉพาะเจาะจงต่อ oxytocin จึงได้ศึกษาต่อไปโดยใช้สารกระตุ้นกล้ามเนื้อชนิดอื่น ๆ เช่น acetylcholine, potassium และ cold contracture



รูปที่ 4 กราฟแสดงผลการยับยั้งของ  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen (●—●, n=3),  $10^{-5}$  mol/l oestradiol (○—○, n=4) และทั้งสองร่วมกัน (○—○, n=4) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกหนูขาวจากการกระตุ้นโดย acetylcholine ผลแสดงเป็นค่า % inhibition  $\pm$  SEM เส้นทึบแสดงเวลาการยับยั้ง และเส้นประแสดงเวลาการฟื้นตัว

รูปที่ 4 แสดงการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกที่ถูกกระตุ้นให้หดตัวโดย acetylcholine การทดลองได้ผลเช่นเดียวกับการให้ oxytocin นั่นคือในช่วงต้นพบว่า การยับยั้งโดย  $10^{-5}$  mol/l oestradiol ได้ผลเร็วกว่า  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen แม้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 100 นาที การยับยั้งโดยสารทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับการยับยั้งเมื่อให้สารทั้งสองในเวลาเดียวให้ผลสูงกว่าอีกสอง treatment ( $P < 0.05$ ) สำหรับในเวลาของการฟื้นตัวพบว่า treatment ที่ได้รับ oestradiol อย่างเดียว การฟื้นตัวสูงกว่าอีกสอง treatment อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ )

รูปที่ 5 แสดงการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกโดย tamoxifen และ/หรือ oestradiol ในความเข้มข้นข้างบนเมื่อกกล้ามเนื้อถูก

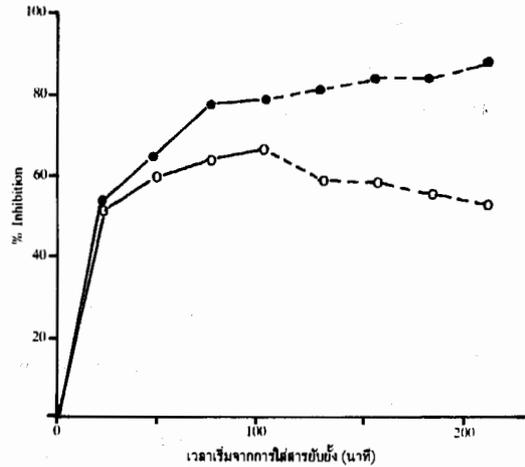


รูปที่ 5 กราฟแสดงผลการยับยั้งของ  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen (●—●, n=3),  $10^{-5}$  mol/l oestradiol (○—○, n=3) และทั้งสองร่วมกัน (○—○, n=3) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกหนูขาวจากการกระตุ้นโดย potassium Krebs solution ผลแสดงเป็นค่า % inhibition  $\pm$  SEM เส้นทึบแสดงเวลาการยับยั้ง และเส้นประแสดงเวลาการฟื้นตัว

กระตุ้นโดย potassium Krebs solution พบว่าในช่วงต้นและเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง การยับยั้งโดย oestradiol ไม่ว่าจะใช้ข้อเดียว หรือเมื่อใช้ร่วมกับ tamoxifen ให้ผลเร็วกว่าเมื่อใช้ tamoxifen อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) การฟื้นตัวของ treatment ที่ได้รับ oestradiol ไม่ว่าจะใช้ข้อเดียวหรือใช้ร่วมกับ tamoxifen เกิดเร็วมาก ขณะที่ treatment ที่ได้รับ tamoxifen อย่างเดียวมีการฟื้นตัวช้ากว่ามาก

สำหรับการกระตุ้นกล้ามเนื้อคลูกด้วย cold Krebs solution ผลงานในชิ้นต้น (n=1) ได้ใช้ tamoxifen และ oestradiol ในระดับเดียวกันคือ  $10^{-5}$  mol/l พบว่า (รูปที่ 6) ในระยะแรก (20 นาทีแรก) ผลการยับยั้งของทั้งสองสารมีค่าเท่ากัน หลังจากนั้น tamoxifen ให้มีผลการยับยั้งสูงกว่า oestradiol และในระยะการฟื้นตัวพบว่า หลังจาก 3 ชั่วโมงของการเอาสารยับยั้งออกไม่พบการฟื้น

จากของกล้ามเนื้อที่ได้รับ tamoxifen ขณะที่กล้ามเนื้อที่ได้รับ oestradiol ฟื้นตัวช้ามาก



รูปที่ 6 กราฟแสดงผลการยับยั้งของ  $10^{-5}$  mol/l tamoxifen (●—●, n=1), และ  $10^{-5}$  mol/l oestradiol (○—○, n=1) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกหนูขาวจากการกระตุ้นโดย cold Krebs solution ผลแสดงเป็นค่า % inhibition เส้นทึบแสดงเวลาการยับยั้ง เส้นประแสดงเวลาการฟื้นตัว

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า tamoxifen ในระดับใกล้เคียงกับที่พบในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่ได้รับการรักษาโดยสารชนิดนี้ สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกได้ การยับยั้งเกิดอย่างเฉียบพลันเห็นผลภายในเวลา 3 นาที ซึ่งเร็วเกินไปที่จะสรุปว่าเป็นผลจากการรวมตัวกับ oestrogen receptor และติดตามด้วยการเปลี่ยนแปลงการสร้าง mRNA และโปรตีนของเซลล์ oestradiol เองนอกจากจะสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลูกได้แล้ว พบว่าเมื่อใช้ร่วมกับ tamoxifen ไม่สามารถไปป้องกันหรือลดการทำงานของสาร antioestrogen นี้ได้ ทั้งยังไปเพิ่มผลการยับยั้งให้มากขึ้นไปอีก

การยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลาย โดย tamoxifen และ oestradiol ไม่ได้มีผลเฉพาะเจาะจงต่อวิธีการกระตุ้นโดยสารกระตุ้นกล้ามเนื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง จากผลการทดลองเป็นที่ชัดเจนว่าทั้ง tamoxifen และ oestradiol สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อโดยการกระตุ้นของทุกสารกระตุ้นกล้ามเนื้อที่ศึกษา ซึ่งเป็นที่แน่ชัดว่าทั้ง oxytocin และ acetylcholine รวมตัวกับ receptor ที่ต่างกันก่อนทำให้กล้ามเนื้อ depolarize (Soloff, 1975; Balton, 1979) ขณะที่ potassium Krebs solution ไม่มี receptor แม้ว่าจะทำให้เซลล์กล้ามเนื้อ depolarize ก่อนการหดตัว (Evans et al, 1958) และ cold Krebs solution มีผลโดยตรงต่อการหลั่ง  $Ca^{+2}$  สุโขโทพลาซึม โดยไม่ทำให้เซลล์ depolarize (Endo, 1977) ผลการทดลองนี้ชี้ว่าทั้ง tamoxifen และ oestradiol ไม่เฉพาะเจาะจงต่อวิธีการใดวิธีการหนึ่งที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัว

ผลการทดลองที่แสดงว่า tamoxifen ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลายหนูขาวในครั้งนี้อยู่สอดคล้องกับผลงานของคนอื่นซึ่งใช้สาร anti-oestrogen ชนิดอื่น เช่น CI 628 ซึ่งทดลองกับกล้ามเนื้อคลายหนูขาวเช่นกัน (Marshall & O'Brien, 1967) หรือทดลองกับท่อหน้าไข่กระต่าย (Callantine et al, 1969) แต่ในกรณีหลังนี้ผู้วิจัยได้สรุปว่า CI 628 มีผลผ่าน oestrogen receptor สำหรับการทดลองครั้งนี้แม้ไม่ได้ให้ข้อสรุปที่แน่นอนว่า tamoxifen และ oestradiol มีผลโดยทางใด แต่อาจจะเป็นไปได้ว่ามีผลผ่านเชื้อหุ้มเซลล์ การมีผลยับยั้งอย่างเฉียบพลันและการฟื้นตัวทันทีของกล้ามเนื้อคลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากการได้รับ oestradiol ชี้ว่าการทำงานของมันไม่ผ่านกระบวนการที่เฉพาะเจาะจง แต่อาจเกิดโดยวิธีง่าย ๆ โดยการละลายผ่านชั้นไขมันของ

เชื้อหุ้มเซลล์ ผลการทดลองของ Lipton et al (1984) ที่แสดงว่ายังความเข้มข้นสูงขึ้น ทั้ง tamoxifen และ oestradiol ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ  $10^{-6}$  และ  $5 \times 10^{-6}$  mol/l ตามลำดับ) ซึ่งยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลายได้มากขึ้นสนับสนุนข้อเสนอดังกล่าว ถ้าสารทั้งสองมีผลผ่าน oestrogen receptor ผลการยับยั้งควรมีข้อจำกัด เนื่องจากมีการอิ่มตัว (saturation) ของ receptor ตามปกติ ซึ่งที่ระดับ  $10^{-6}$  mol/l จำนวนโมเลกุลของ tamoxifen ก็มากเกินไป จำนวน oestrogen receptor ของเซลล์แล้ว (Murphy et al, 1981) ดังนั้นในระดับดังกล่าว tamoxifen น่าจะให้ผลสูงสุดไม่จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นขึ้นไปอีกถึง 10 เท่า และจากผลการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อจาก tamoxifen ซึ่งช้ากว่าจาก oestradiol มากชี้ว่า tamoxifen สามารถจับกับ receptor ได้แน่นกว่า oestradiol ซึ่งข้อบ่งชี้ชัดกับหลักฐานที่ว่า tamoxifen มีผลผ่าน oestrogen receptor เนื่องจาก oestradiol จับกับ receptor ของมันได้แน่นกว่า tamoxifen ถึง 10-100 เท่า (Skidmore et al, 1972)

สุดท้ายการสรุปว่าการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อคลายหนูขาวโดย tamoxifen ไม่ผ่าน oestrogen receptor สนับสนุนโดยผลการทดลองที่ยังไม่ได้รายงานของผู้รายงานที่ว่าสารนี้สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจากอวัยวะอื่น เช่น duodenum ของหนูขาว ileum และ taenia caecae ของหนูตะเภา ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่โดยปกติไม่ใช่เนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue) ของ oestrogen และไม่มี oestrogen receptor หรือมีน้อยมาก อย่างไรก็ตาม tamoxifen ไม่ได้มีผลเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้ออย่างแน่นอน เนื่องจาก Lipton et al (1984) รายงานว่าให้กล้ามเนื้อคลายหนูขาวได้รับ  $10^{-6}$  mol/l tamoxifen เป็น

เวลา 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างกล้ามเนื้อบ่อยๆ ด้วย Krebs Solution ที่มี 0.4% ethanol เป็นเวลา 7 ชั่วโมง พบว่ากล้ามเนื้อฟื้นตัวได้เกือบสมบูรณ์ สามารถหดตัวได้ค่ามากกว่า 80% ของ "initial control response"

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้รายงานขอขอบคุณ Dr.A. Lipton และ Dr.L. Martin ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำพร้อมกับการสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ และ Department of Physiology & Pharmacology, University of Queensland ที่ให้โอกาสผู้รายงานดำเนินการวิจัย สุดท้ายขอขอบคุณ J. Kelly และ G. Hartl ผู้ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการเตรียมน้ำยาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

### เอกสารอ้างอิง

- Balton, T.B. 1979. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. *Brit. Med. Bull.* 35(3) : 275-83.
- Burn, J.I. 1974. In : *The Treatment of Breast Cancer*, H. Atkins (ed). Baltimore : University Press
- Callentine, M.R., Clemens, L.E. & Shih, Y.H. 1969. Displacement of  $17\beta$ -estradiol from the rabbit fallopian tube. *Am. J. Physiol.* 216(5) : 1241-5.
- Cole, M.P., Jones, C.T.A. & Todd, I.D.H. 1971. A new antioestrogen agent in late breast cancer : An early clinical appraisal of ICI 46, 474. *Brit. J. Cancer* 25 : 270-5.
- Endo, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev.* 57 : 71-108.
- Evans, D.H.L., Schild, H.O. & Thesleff, S. 1958. Effects of drugs on depolarized plain muscle. *J. Physiol. (London)* 143 : 475-85.
- Harper, M.J.K. & Walpole, A.L. 1967. A new derivative of triphenylethylene : Effect on implantation and mode of action on rats. *J. Reprod. Fert.* 13 : 101-19.
- Jensen, E.V., Mohla, S., Gorell, T.A. & DeSombre, E.R. 1974. The role of estrophilin in estrogen action. *Vitam. Horm.* 32 : 89-127.
- Lipton, A., Vinijsanun, A & Martin, L. 1984. Acute inhibition of rat myometrial responses to oxytocin by tamoxifen stereoisomers and oestradiol. *J. Endocr.* 103 : 383-8.
- Marshall, J.M. & O'Brien, O.P. 1967. Action of an estrogen antagonist on the electrical and mechanical properties of the rat uterus in vitro. *Endocrinology* 80 : 748-53.
- Martin, L. 1981. Effects of anti-oestrogen on cell proliferation in the rodent reproductive tract. In : *Non-Steroidal Anti-oestrogens*. R.L. Sutherland & V.C. Jordan (eds). Sydney : Academic Press. pp. 145-63.
- Murphy, L.C., Foo, M.S., Green, M.D., Milthorpe, B.K., Whybourne, A.M., Krozowaki, Z.S. & Sutherland, R.L. 1981. Binding of nonsteroidal anti-estrogens to saturable binding sites distinct from the estrogen receptor in normal and neoplastic tissues. In : *Non-Steroidal Anti-oestrogens*. R.L. Sutherland & V.C. Jordan (eds). Sydney : Academic Press. pp. 317-36.
- Nicholson, R.I. & Griffiths, K. 1980. The biochemistry of Tamoxifen action. In : *Advances in Sex Hormone Research*. Vol.4. J.A. Thomas & R.L. Singhal (eds). Baltimore-Munich : Urgan-Schwarzenberg. pp. 119-52.
- Patterson, J.S. & Baum, M. 1978. Safety of tamoxifen. *Lancet* 8055 : 105.
- Patterson, J.S., Furr, B., Wakeling, A. & Battersby, L. 1982. The biology and physiology of "Novaldex" (tamoxifen) in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2 : 363-74.
- Skidmore, J., Walpole, A.L. & Woodburn, J. 1972. Effect of some triphenylethylenes on estrogen binding in vitro to macromolecules from uterus and anterior pituitary. *J. Endocr.* 52 : 289-98.
- Soloff, M.S. 1975. Uterine receptor for oxytocin : Effect of estrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65 : 205-12.