

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุด
(*Garcinia mangostana*) ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

พฤษภาคม 2555

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุด
(*Garcinia mangostana*) ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

พฤษภาคม 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุด
(*Garcinia mangostana*) ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

พฤษภาคม 2555

แสงสิริ อยู่อำไพ .(2555). *ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุด (Garcinia mangostana) ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma*.ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (ตจวิทยา) . กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ . คณะกรรมการควบคุม : รองศาสตราจารย์นายแพทย์ มนต์รี อุดมเพทายกุล , รองศาสตราจารย์ ดร. รมิดา วัฒนโกคาสิน

ภูมิหลัง : มะเร็งผิวหนังเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในประชากรผิวขาว เปลือกมังคุดมีสารสำคัญหลายชนิด และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ ยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma (A 431)

วัตถุประสงค์ : ศึกษาความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma(A431)

วิธีการวิจัย : ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง ด้วยวิธี MTT assay เพื่อหาค่า IC₅₀ ศึกษาการเกิด apoptosis ของเซลล์โดยการย้อมสี Hoechst 33342 และใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหาชิ้นส่วนการแตกหักของ DNA

ผลการทดลอง : สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นและเวลา มีค่า IC₅₀ 19.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบลักษณะของการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง ได้แก่ การรวมตัวของโครมาติน ศึกษาการแตกหักของ DNA โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ไม่พบการแตกหักของ DNA

สรุป : สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีความเป็นพิษ และสามารถเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ได้ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma(A431)

คำสำคัญ : ความเป็นพิษ, กลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis, เปลือกมังคุด, *Garcinia mangostana* เซลล์มะเร็งผิวหนัง, human epidermoid carcinoma, A431cells.

CYTOTOXICITY AND APOPTOTIC INDUCTION MECHANISM BY MANGOSTEEN EXTRACT

(*GARCINIA MANGOSTANA*) IN HUMAN EPIDERMOID CARCINOMA



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Dermatology

At Srinakharinwirot University

May 2012

Saengsiri Yu-ampai. (2012). *Cytotoxicity and apoptotic induction mechanism by mangosteen extract (Garcinia mangostana) in human epidermoid carcinoma*. Master thesis, M. S. (Dermatology). Bangkok : Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Montree Udompataikul , Assoc. Prof. Dr. Ramida Watanapokasin

Background : Skin cancer is the most common type of cancer in white populations. The pericarp of mangosteen is rich in various active ingredients that are known to possess biological activities. The effect of crude extracts of *Garcinia mangostana* in inhibiting proliferation and inducing apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells has not been reported.

Objective: To find the efficacy of crude extracts of *Garcinia mangostana* in inhibiting proliferation and inducing apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells.

Material and Method : The cells were treated with the mangosteen extracts at increasing concentrations to find the IC₅₀, adopting MTT ([3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) assay. Hoechst 33342 staining was adopted to assess the apoptosis. Agarose gel electrophoresis assay was used to examine DNA fragmentation.

Results : Crude extracts of *Garcinia mangostana* were cytotoxic to the human epidermoid carcinoma A431 cells in dose- and duration-dependent manner with IC₅₀ at 19.3 µg/ml. The cells that responded to the treatments revealed typical apoptotic features. Early features of apoptosis, chromatin condensation, was observed in the treated cells, and agarose gel electrophoresis assay revealed no DNA fragmentation.

Conclusion : Crude extracts of *Garcinia mangostana* inhibit proliferation and induce death in human epidermoid carcinoma A431 cells , by apoptosis.

Keyword : cytotoxicity, apoptotic induction, mangosteen extract, *Garcinia mangostana*, human epidermoid carcinoma, A431 cells

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุด
(*Garcinia mangostana*) ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด human epidermoid carcinoma

ของ

แสงสิริ อยู่อำไพ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่ 31 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2555

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า



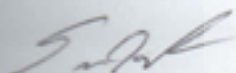
ประธาน



ประธาน

(รองศาสตราจารย์ นพ.มนตรี อุดมแพทยกุล)

(รองศาสตราจารย์ ดร.รมิดา วัฒนโกศาติน)



กรรมการ



กรรมการ

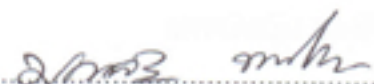
(รองศาสตราจารย์ ดร.รมิดา วัฒนโกศาติน)

(รองศาสตราจารย์ นพ.มนตรี อุดมแพทยกุล)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ.สุวิรากร โอภาสวงศ์)



กรรมการ

(ดร.มาลัย ทวีโชติภัทร์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาบัตรฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์มนตรี อุดมเพทายกุลประธานควบคุมปริญญาบัตร รองศาสตราจารย์ ดร.รณิดา วัฒนโกศาติน กรรมการควบคุมปริญญาบัตรที่ให้คำปรึกษาชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัยและแนะนำแนวทางการอภิปรายและสรุป รวมถึงแนะนำข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงสุวิภากร โอภาสวงศ์และขอกราบขอบพระคุณ

ดร.มาลัย ทวีโชติภัทร์ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์และแนะนำแนวทางการวิเคราะห์ อภิปรายและสรุปผลตลอดจนให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณดร.ประเสริฐ พัฒนาประทีป หัวหน้าภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้คำแนะนำแนวทางและความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาบัตรฉบับนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนในภาควิชาชีวเคมีที่ให้คำแนะนำปรึกษาและช่วยเหลือผู้วิจัยโดยตลอด และทำยนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและเป็นกำลังใจสำคัญแก่ผู้วิจัยโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

คุณค่าและประโยชน์ใดๆ ที่เกิดขึ้นจากปริญญาบัตรฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแต่บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

แพทย์หญิง แสงสิริ อยู่อำไพ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
มะเร็งผิวหนัง.....	6
วัฏจักรเซลล์.....	35
การตายของเซลล์.....	52
การเจริญของเซลล์และมะเร็ง.....	59
มังคุด.....	68
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	70
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	72
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	72
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	72
วิธีดำเนินการทดลอง.....	72
การเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งผิวหนัง.....	72
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthoneที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็ง ผิวหนังด้วยวิธีMTT.....	73
การทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่มxanthoneจากเปลือก มังคุดในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง.....	73
การศึกษาการเกิดApoptosisในเซลล์มะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthoneจากเปลือกมังคุด.....	74

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง.....	76
ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง	76
ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนังของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด.....	77
การศึกษาการเกิดapoptosisในเซลล์มะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthoneจากเปลือกมังคุด	78
การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส.....	78
การตรวจสอบการแตกหักของ DNA	81
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	82
บรรณานุกรม.....	84
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	99



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 Nodular basal cell carcinoma.....	14
2 Rodent ulcer with central necrosis.....	14
3 Superficial basal cell carcinoma.....	14
4 Pigmented basal cell carcinoma.....	15
5 Morpheaform basal cell carcinoma.....	15
6 Basal cell carcinoma.....	17
7 Papular squamous cell carcinoma of the ear.....	21
8 Ulcerative squamous cell carcinoma of the jaw.....	21
9 Nodular squamous cell carcinoma of the forehead.....	21
10 Preauricular mass resulting from cutaneous squamous cell carcinoma.....	22
11 Squamous cell carcinoma of the lower lip.....	22
12 Perianal squamous cell carcinoma.....	23
13 Oral florid papillomatosis.....	24
14 Epithelioma cuniculatum.....	24
15 Squamous cell carcinoma.....	25
16 Squamous cell carcinoma.....	26
17 Superficial spreading melanoma.....	31
18 Lentigo maligna melanoma.....	31
19 Nodular melanoma.....	32
20 Acral lentiginous melanoma.....	32
21 การแบ่งเซลล์ให้ได้เซลล์ใหม่ (daughter cells) ในวัฏจักรเซลล์.....	35
22 การแบ่งเซลล์ให้ได้เซลล์ใหม่ (daughter cells) ในวัฏจักรเซลล์.....	36
23 ระยะ interphase	36
24 เซลล์ออกจาก cell cycle อยู่ในระยะ G0 เซลล์ที่อยู่ในระยะนี้เรียกว่า quiescence.....	37
25 ลักษณะของเซลล์ในระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส.....	40
26 การประเมินจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆของวัฏจักรเซลล์โดยเทียบสัดส่วน DNA ต่อเซลล์.....	41
27 การควบคุมวัฏจักรเซลล์ที่จุดตรวจสอบ G1/S G2/M และ metaphase checkpoint.....	42
28 การรวมตัวกันของ cyclin-Cdk complex ในวัฏจักรเซลล์.....	43
29 กลไกการกระตุ้นการทำงานของ Cdk โดย Cyclin รวมเป็น cyclin-Cdk complex.....	44

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
30 การควบคุมการทำงานของ cyclin-Cdk complex activity.....	45
31 สรุปการควบคุมการทำงานของ cyclin-Cdk complex activity.....	46
32 การควบคุม cyclin-Cdk activity โดยกระบวนการ ubiquitination.....	47
33 Anaphase promoting complex ควบคุมการสลายตัวของ M-cyclin.....	48
34 การควบคุมการดำเนินไปในระยะ G1 phase เพื่อเข้าสู่ระยะ S phase.....	49
35 การกระตุ้นของโปรตีน p53 หลังจาก DNA ได้รับความเสียหาย.....	50
36 โครงสร้างของ initiator caspase และ effector caspase.....	55
37 กลไกการตายแบบอะพอพโทสิสระดับโมเลกุล.....	57
38 ลักษณะที่สำคัญของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง.....	59
39 การแพร่กระจายของมะเร็งจากอวัยวะหนึ่งไปยังอีกอวัยวะหนึ่ง.....	62
40 โปรตีนจากยีนมะเร็งและสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ..	67
41 กราฟแสดงผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ในการฆ่าเซลล์ มะเร็งผิวหนัง A431 ด้วยวิธี MTT (MTT assay).....	76
42 กราฟแสดงผลการทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่ามะเร็งผิวหนัง A431 ด้วย สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ณ ช่วงเวลาต่างๆ.....	77
43 การศึกษาการเกิด apoptosis โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งผิวหนัง.....	79
44 การศึกษาการเกิด apoptosis โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งผิวหนัง....	80
45 การตรวจสอบความแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431.....	81

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma และ non melanoma (basal and squamous cell carcinoma) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในประชากรผิวขาว มะเร็งทั้งสองชนิดมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั่วโลก⁽¹⁻⁷⁾

มะเร็งชนิด non melanoma มีมากกว่าหนึ่งในสามของมะเร็งทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา อุบัติการณ์การเกิดโรคมักกว่า 600,000 รายต่อปี โดยเป็น basal cell carcinoma (BCC) 500,000 ราย squamous cell carcinoma (SCC) 100,000 – 150,000 ราย⁽¹⁾ อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งชนิด non melanoma สูงกว่า malignant melanoma ถึง 18-20 เท่า^(8, 9) อัตราเสี่ยงในการเป็นโรค (lifetime risk) คือ 28% - 33% ใน BCC และ 7%-11% ใน SCC

Nonmelanoma skin cancer พบบ่อยในประชากรผิวขาวและอุบัติการณ์การเกิดโรคเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ อุบัติการณ์ของ non melanoma แตกต่างกันตามภูมิศาสตร์ โดยมีอุบัติการณ์การเกิดสูงสุดที่ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ในสหรัฐอเมริกา มีรายงานพบผู้ป่วย BCC 800,000 ราย และผู้ป่วย SCC 200,000 ราย ในปี ค.ศ. 2000^(9, 15) มะเร็งชนิด non melanoma มักพบในผู้ป่วยอายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป มีการศึกษาพบว่า อุบัติการณ์การเกิด BCC และ SCC แตกต่างกันในชนชาติคอเคเซียนในยุโรปและออสเตรเลียเป็น 50 เท่า และ 100 เท่าตามลำดับ^(14, 16) มีการศึกษารายงานอุบัติการณ์ของ non melanoma skin cancer ในออสเตรเลีย พบว่า อุบัติการณ์เป็น 38.5%^(14, 17) กล่าวคือ อุบัติการณ์ของ BCC ในชายคือ 1,445 คน ต่อ 100,000 คน ในผู้หญิงพบ 943 คน ต่อ 100,000 คน อุบัติการณ์ของ SCC ในชายคือ 805 คน ต่อ 100,000 คน ในผู้หญิง 424 คน ต่อ 100,000 คน^(14, 17)

Basal cell carcinoma (BCC) เป็นมะเร็งผิวหนังที่พบบ่อยทั่วโลก อุบัติการณ์การเกิดโรค BCC เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การศึกษาปี 1977 – 1978 และปี 1998 – 1999 ในสหรัฐอเมริกา พบอุบัติการณ์ของ BCC เพิ่ม 50% ในชายและ 20% ในหญิง ขณะที่อุบัติการณ์การเกิด SCC เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในทั้งชายและหญิง⁽¹⁸⁾

Squamous cell carcinoma (SCC) สัมพันธ์กับอายุมาก ค่าเฉลี่ยอายุคือ 70 ปี อุบัติการณ์การเกิดโรคในสหรัฐอเมริกา ในปี 1998 – 1999 ในประชากรชายคือ 356 คน ต่อ 100,000 คน อุบัติการณ์การเกิดโรคในสหรัฐอเมริกา ในปี 1998 – 1999 ในประชากรหญิงคือ 150

คน ต่อ 100,000 คน ในออสเตรเลีย อุบัติการณ์ในประชากรชาย คือ 1332 คน ต่อ 100,000 คน ในประชากรหญิงคือ 755 คน ต่อ 100,000 คน^(18, 19) มะเร็งชนิด melanoma มีอุบัติการณ์ต่ำกว่า มะเร็งชนิด non melanoma แต่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในประชากรผิวขาวทั่วโลกในหลายทศวรรษ^(20, 21) อุบัติการณ์การเกิดโรคอยู่ระหว่าง 3% ถึง 7% อุบัติการณ์การเกิดโรคในคนผิวดำคือ 1 ต่อ 100,000 คนต่อปี และคนผิวขาวคือ 50 ต่อ 100,000 คนต่อปี⁽²²⁾ อัตราเสี่ยงในการเป็นโรค (lifetime risk) สำหรับ melanoma คือ 1:25 ในออสเตรเลีย และ 1:75 ในสหรัฐอเมริกา⁽²³⁾ อัตราการเสียชีวิตของ melanoma คงที่ในประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลียและยุโรป⁽²⁴⁾ อุบัติการณ์การเกิดโรค melanoma เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา⁽²⁵⁻²⁷⁾ อุบัติการณ์การเกิด melanoma ในสหรัฐอเมริกา ในผู้ชายคือ 8 ถึง 22 ต่อ 100,000 คน ในผู้หญิงคือ 7 ถึง 15 ต่อ 100,000 คนในช่วงปี ค.ศ. 1975 – 2000^(3, 28) อุบัติการณ์การเกิดโรคสูงสุดพบที่ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์คือ 30 – 60 คน ต่อ 100,000 คนต่อปี^(22, 29-31) ส่วนในยุโรป อุบัติการณ์เกิดโรคสูงสุดพบที่ประเทศกลุ่มสแกนดิเนเวีย อุบัติการณ์เกิดโรคที่ต่ำสุดอยู่ที่ประเทศกลุ่มเมดิเตอร์เรเนียน^(6, 26, 32-35)

การรักษา มะเร็งผิวหนังชนิด non melanoma ในปัจจุบัน ได้แก่ surgical excision, curettage with electrodesiccation, Mohs micrographic surgery, radiation therapy, cryosurgery^(36, 37) สำหรับ มะเร็งผิวหนังชนิด non melanoma ที่มีการกระจายของโรคไปยังอวัยวะต่าง ๆ (metastatic disease) ต้องได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) จากแพทย์เฉพาะทางด้านมะเร็งวิทยา (oncologist)

ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นที่มุ่งเน้นถึงการใช้ยารักษามะเร็งที่พัฒนา จากสารสกัดจากธรรมชาติและเนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพ มีสมุนไพรไทยหลายชนิดมีแนวโน้มว่าจะสามารถนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง จึงเป็นที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูง โดยผลงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีพืชที่มีสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ในระดับดี เช่น curcumin ที่สกัดจากขมิ้นชันมีความสามารถในการต้านมะเร็งได้⁽³⁸⁻⁴⁰⁾, สารสกัด allicin ที่ได้จากกระเทียมก็พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้⁽⁴¹⁻⁵⁰⁾, สารสกัดจาก pomegranate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้⁽⁵¹⁾

จากงานวิจัยข้างต้น ชี้ให้เห็นว่า พืชสมุนไพรหลายชนิด สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในวงการแพทย์ต่อไป ตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่ได้นำมาใช้ในวงการแพทย์ในปัจจุบัน ได้แก่ vincristine และ vinsblastine ที่สกัดได้จากต้น พวงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*)⁽⁵²⁾ ใช้ในการรักษามะเร็งชนิด Hodgkin's lymphoma และ non

Hodgkin's lymphoma ส่วน Taxol ที่สกัดจากต้นยิว (*Taxus brevifolia*) นำมาใช้เป็นยารักษา มะเร็งปอดและมะเร็งเต้านม เป็นต้น⁽⁵³⁾

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ให้ความสนใจ สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด จากรายงานพบว่า เปลือกมังคุดมีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ xanthones, terpenes, anthocyanins, tannins และ phenols⁽⁵⁴⁾ ซึ่งในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่ม xanthone จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย⁽⁵⁵⁾ ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อไวรัส HIV⁽⁵⁶⁾ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา⁽⁵⁷⁾ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ⁽⁵⁸⁾ ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่⁽⁵⁹⁻⁶²⁾

ดังนั้น จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่า ยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง จึงทำให้เป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ที่จะทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 เนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีผลในการต้านมะเร็ง อื่นๆ ได้ นอกจากที่เคยศึกษา มาแล้ว นอกจากการทดสอบฤทธิ์ในการเป็นยาต้านมะเร็งแล้ว ควรศึกษาต่อไปด้วยว่ากลไกในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้นเป็นรูปแบบใด เนื่องจากเป้าหมายของการพัฒนายาต้านมะเร็งนั้นต้องการให้มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด ดังนั้นกลไกที่ได้รับความนิยม สนใจในปัจจุบันที่ต้องการให้เป็นเป้าหมายของยา คือ การกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตาย ด้วยกระบวนการ apoptosis ซึ่งจะไม่ทำให้เซลล์ข้างเคียงเกิดการอักเสบเหมือนกับที่พบในการตายแบบ necrosis

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในการเป็นสารต้านมะเร็งผิวหนัง รวมทั้งกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งตาย ด้วยกระบวนการ apoptosis โดยเลือกใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ในการทดลอง ซึ่งจะเป็นตัวแทนของมะเร็งกลุ่ม non melanoma ในทางคลินิกต่อไป

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง
2. เพื่อศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

ความสำคัญของงานวิจัย

ผลที่ได้สามารถไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนายาต้านมะเร็งผิวหนังในอนาคต

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง โดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด และหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism
2. ศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยดูจากลักษณะจำเพาะที่เกิดขึ้นกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ nucleus การแตกหักของ DNA (DNA fragmentation)

นิยามศัพท์เฉพาะ

A431

เป็น cell line ของมะเร็งผิวหนังที่พัฒนามาจากเซลล์ของผู้ป่วยหญิงอายุ 85 ปีที่เป็นมะเร็งผิวหนัง (epidermoid carcinoma of vulva) เป็นผลิตภัณฑ์จากสถาบัน ATCC (Cat. No. CRL 1555)

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

เป็นสารหลักที่พบได้ในเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตต ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างและเป็นโครงสร้างแกนหลักของสาร mangostin⁽⁶³⁾

MTT assay

เป็นวิธีที่บอกถึงปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสี (colorimetric assay) จากสีเหลืองของ MTT เป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ mitochondrial reductase ซึ่งจะพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น⁽⁶⁴⁾

50% Inhibitory Concentration (IC_{50})

หมายถึง ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%

Apoptosis ⁽⁶⁵⁾

การตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์เป็นขบวนการฆ่าตัวตายที่อาศัยพลังงานในรูป ATP เนื่องจากต้องมีการแสดงออกของยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ เซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทสิสจะหดตัวและหลุดออก จากการเกาะเกี่ยวของเซลล์เพื่อนบ้าน มีการขดแน่นของโครมาตินมาอยู่บริเวณขอบของนิวเคลียสจนมองดูเหมือนลักษณะของพระจันทร์เสี้ยว ผนังเซลล์ไม่เรียบมีลักษณะเหมือนตุ่มยื่นออกมา (membrane blebbing) DNA จะหักเป็นท่อนตรงช่วงระหว่าง internucleosome apoptotic bodies ที่มีชิ้นส่วนของ DNA จะถูกเซลล์เพื่อนบ้านมากีบกินด้วยวิธี phagocytosis ทั้งนี้จะไม่มีการปล่อย cellular contents ของเซลล์ตายดังกล่าวออกมาสู่ภายนอกทำให้ไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammation) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis อย่างสิ้นเชิง

Autoradiography

เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ขนาดและจำนวนท่อน DNA หลังจากแยกด้วย gel electrophoresis โดยทำให้เกิดเป็นภาพเนกาทีฟ บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ ภาพที่เกิดขึ้นเรียกว่า autoradiogram ⁽⁶⁶⁾

สมมติฐานในการวิจัย

สารสกัดหยาบจากกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังโดยเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ผ่าน mitochondrial pathway หรือ death receptor pathway

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งผิวหนัง⁽⁶⁷⁾

อันตรายที่สำคัญและรุนแรงที่สุดของแสงแดดต่อผิวหนัง คือ การเกิดมะเร็งผิวหนังชนิด non melanoma skin cancer (NMSC)^(68, 69) ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในสหรัฐอเมริกา⁽⁷⁰⁾ ออสเตเรีย และอุบัติการณ์มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี

แสงแดดถูกตั้งข้อสงสัยว่าจะเป็นสาเหตุของมะเร็งผิวหนังตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 โดย Unna และ Dubreuilh ศึกษาคลาสิเรียและคนงานปลุกอุ้งพบว่ามะเร็งผิวหนังเกิดขึ้นบนผิวหนังที่มีผิวหนังขาวจากแสงแดดอย่างรุนแรง

ในปี ค.ศ. 1928 Findlay ได้แสดงให้เห็นว่าการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตจากหลอด mercury arc สามารถทำให้เกิดผิวหนังในหนูทดลอง และในปี ค.ศ. 1939 Ruffo ได้แสดงว่าแสงแดดธรรมชาติทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังของหนูได้ พร้อมกับแสดงว่ากระจกสามารถกรองแสงที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ นั่นคือแสงที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่า 320 nm เป็นสาเหตุของ NMSC

การศึกษาที่จัดว่าเป็นการศึกษาต้นแบบคือ การศึกษาโดย Blum ในปี ค.ศ. 1959 ในหนังสือ carcinogenesis by ultraviolet light แสดงว่าการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพียง 1 ครั้งไม่สามารถทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ การเกิดมะเร็งผิวหนังนั้นมี time-dose reciprocity ยกเว้นปริมาณแสงที่ได้รับต่ำเกินไปจึงจะไม่เกิด⁽⁷¹⁾

Action spectrum ของการเกิดมะเร็งผิวหนัง

การศึกษาโดย Ruffo ในปี ค.ศ. 1939 พบว่า แสงที่ยาวกว่า 320 nm ไม่ทำให้เกิดมะเร็งในหนูทดลอง และปี ค.ศ. 1959 Blum แสดงว่า UVB, UVC เป็นสาเหตุของมะเร็งผิวหนัง ต่อมาในปี ค.ศ. 1992 Sterenborg และ Van Der Leun แสดงว่า UVA สามารถทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้⁽⁶⁹⁾ โดยต้องใช้ปริมาณมากกว่า UVB ถึง 1,000 เท่า รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ ความยาวคลื่น 295 nm (UVB) มีความสามารถสูงสุดในการกระตุ้นมะเร็งผิวหนัง⁽⁷²⁾ ซึ่งตรงกับความสามารถในการทำให้ผิวหนังแดง และความสามารถในการกระตุ้นมะเร็งผิวหนังจะลดลงต่ำสุดที่ความยาวคลื่น 350 nm (UVA) ซึ่งต่ำกว่าความสามารถในการกระตุ้นมะเร็งผิวหนังของแสงความยาวคลื่น 295 nm ถึง 1,000 เท่า

ในกรณีที่มีสารเคมีอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง การเกิดมะเร็งผิวหนังจากแสงจะเปลี่ยนไป เช่น ในกรณี PUVA (Psoralen + UVA) จะพบอุบัติการณ์การเกิด SCC สูงกว่าการได้รับ UVA เพียงอย่าง

เดียวหลายเท่า โดยได้รับการรักษาด้วยรังสี UVA มากกว่า 200 ครั้ง ร่วมกับสาร psoralen จะเพิ่มอุบัติการณ์ของการเกิด SCC อย่างมีนัยสำคัญในคนผิวขาว⁽⁷³⁾

กลไกในการเกิดมะเร็งผิวหนัง

รังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA⁽⁷⁴⁾ ปัจจุบันเชื่อว่า UV กระตุ้น oncogene และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ tumor suppressor gene เช่น p53 โดย gene ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็น gene ซึ่งมีในคนปกติทั่วไป มีหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโต และ differentiation ของเซลล์ แต่ gene เหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อสัมผัสกับสารก่อมะเร็งทั้งหลาย เช่น UV ionizing radiation สารเคมีหรืออายุที่มากขึ้น การศึกษาโดย Brash DE และคณะ ในปี ค.ศ. 1991⁽⁷⁵⁾ ใน invasive SCC พบว่ามีถึงร้อยละ 50 ที่มี p53 suppressor gene mutation และยังมีรายงานพบการเปลี่ยนแปลงนี้ใน Bowen's diseases และ Actinic keratosis (AK)⁽⁷⁶⁾ ด้วย แสดงว่า UV-induced mutation ของ p53 น่าจะเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด NMSC⁽⁷⁷⁾

Photoimmunology

เป็นที่ทราบกันดีว่ามะเร็งผิวหนังที่เกิดในสัตว์ทดลองจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็น highly antigenic⁽⁷⁸⁾ ดังนั้นการที่มะเร็งจะสามารถเติบโตได้ใน host น่าจะต้องมีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันพบว่าทั้ง UVA และ UVB มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันที่ผิวหนัง⁽⁷⁹⁾ และยังพบว่ามะเร็งหรือผู้ป่วยเปลี่ยนอวัยวะมีโอกาสเกิดมะเร็งผิวหนังสูงขึ้น⁽⁸⁰⁾

มะเร็งผิวหนังในมนุษย์

สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ ประเภทที่ 1 non – melanoma skin cancer (NMSC) ประกอบด้วย basal cell carcinoma (BCC) และ squamous cell carcinoma (SCC) และประเภทที่ 2 malignant melanoma (MM)

Non – melanoma skin cancer (NMSC)

มะเร็งผิวหนังประเภทนี้โดยเฉพาะ SCC มีความสัมพันธ์ค่อนข้างชัดเจนกับปริมาณแสงแดดที่ได้รับ โดยมีหลักฐานทางระบาดวิทยาและการศึกษาในสัตว์ทดลองยืนยัน^(21, 81) ได้แก่

บริเวณผิวหนังที่เกิด NMSC

มากกว่าร้อยละ 70 ของ BCC และ SCC จะเกิดบริเวณใบหน้า คอ และศีรษะ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับแสงแดดสูงสุด นอกจากนั้นก็จะพบบริเวณหลังมือหรือแขนด้านนอก ซึ่งได้รับแสงมากเช่นกัน และยังพบอีกว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาของผิวหนังที่อยู่ใต้ ต่อ NMSC มักจะมีลักษณะ severe solar elastosis ด้วย

เชื้อชาติ เพศ และพันธุกรรม

พบได้บ่อยในคนผิวขาวตาสีฟ้าและผมสีทอง ผิวไหม้ง่ายและไม่เกิดสีคล้ำเมื่อถูกแสงแดด เช่น คนอังกฤษ ไอริช และสแกนดิเนเวียอุบัติการณ์ในผู้ชายสูงกว่าผู้หญิง 85:15 เนื่องจากผู้ชายมักจะทำงานกลางแจ้งมากกว่าผู้หญิง

สำหรับคนเอเชียหรือคนผิวดำ NMSC มีอุบัติการณ์ต่ำมากโดยเฉพาะ BCC จะพบน้อยกว่า SCC นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างกันหลายประการในคนผิวขาว เช่น สัดส่วนผู้ชายต่อผู้หญิง 60:40 อายุที่เริ่มเป็นจะเร็วกว่าคือร้อยละ 50 ของ SCC เกิดก่อนอายุ 50 ปี และมีเพียง 1/3 ของ NMSC ที่เกิดบริเวณศีรษะและคอ⁽⁶⁹⁾

การกระจายของ NMSC ทางภูมิศาสตร์

การบันทึกอุบัติการณ์ของ NMSC มักไม่สมบูรณ์เหมือน MM เนื่องจากเป็นมะเร็งผิวหนังที่พบบ่อย การรักษาทำได้ ง่าย และผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่ได้เสียชีวิตจากมะเร็งชนิดนี้ ประเทศที่มีอุบัติการณ์ของ NMSC สูงสุด และมีการบันทึกข้อมูลที่ดีที่สุดคือ ประเทศออสเตรเลีย มีอุบัติการณ์ของ NMSC สูงถึง 977/ 100,000 คน/ปี ในปี ค.ศ. 1993⁽⁸²⁾ มีการเพิ่มขึ้นร้อยละ 19 ในเวลา 5 ปี ระหว่างปี ค.ศ. 1985-1990 และเมื่อเปรียบเทียบอุบัติการณ์ในคนผิวขาวซึ่งอาศัยอยู่ตามสถานที่ต่างๆ จะพบลักษณะ latitude gradient ชัดเจน พบว่าอุบัติการณ์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่าในทุกๆ 10 องศา ของ latitude ที่ลดลง

สำหรับคนผิวดำ เช่น ชาวอินเดีย ออฟริกา แม้จะอาศัยอยู่ในที่มีแสงแดดจัดเช่น เขต Tropic อุบัติการณ์ของ NMSC พบเพียง 1-2/100,000 คน/ปี รวมทั้งคนเอเชียที่มีผิวเหลือง เช่น ญี่ปุ่น ไต้หวัน มีอุบัติการณ์อยู่ต่ำกว่า 1/100,000 คน/ปี เช่นกัน ในประเทศไทยองค์การอนามัยโลก รายงานว่าอุบัติการณ์ของ NMSC ในปี ค.ศ. 1993 คือ 4/100,000 คน/ปี ในผู้ชายและ 3.2/100,000 คน/ปี ในผู้หญิง⁽⁸³⁾

การศึกษาทางระบาดวิทยา ได้มีการพยายามคำนวณ dose-response ของ NMSC และการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตโดย Van Der Leun ในปี ค.ศ. 1995 คำนวณว่าการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพิ่มขึ้นร้อยละ 50 ทุกปีเป็นเวลา 30 ปี ตั้งแต่อายุ 15-45 ปี จะทำให้อุบัติการณ์ของ BCC เพิ่มขึ้นร้อยละ 500 และ SCC เพิ่มขึ้นร้อยละ 700 ในช่วงชีวิตของผู้ได้รับแสงแดด⁽⁶⁹⁾

Malignant Melanoma (MM)

MM เป็นมะเร็งผิวหนังชนิดที่รุนแรงและมีอัตราการตายสูงกว่า NMSC มาก นอกจากนี้อุบัติการณ์ของ MM ยังเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ประมาณร้อยละ 5 ต่อปี ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาอุบัติการณ์สูงที่สุดคือรัฐ Queensland ประเทศออสเตรเลียซึ่งอยู่ในบริเวณที่มีแสงแดดจัด โดดเด่นศูนย์สูตรและมีประชาชนผิวขาว ซึ่งผิวไวต่อแสงอาทิตย์อยู่เป็นจำนวนมากและส่วนมากทำงานกลางแจ้ง ในปี ค.ศ. 1990 ที่ Queensland พบอุบัติการณ์ MM ในผู้ชาย 50.9 ผู้หญิง 42.3 ต่อ 100,000 ⁽⁸⁴⁾

สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกา อุบัติการณ์ในผู้ ป่วยชายเพิ่มจาก 4.4/100,000 เป็น 20.1/100,000 และผู้ป่วยหญิงจาก 4.9 เพิ่มขึ้น 17/100,000 ในเวลา 25 ปี จากปี ค.ศ. 1960-1986 ⁽⁸⁵⁾ ในขณะที่ชาว Hispanic นิโกร อุบัติการณ์ปี ค.ศ. 1991 พบเพียง 2.4 และ 0.8/100,000 ตามลำดับ ⁽⁸⁶⁾ เช่นเดียวกับประเทศแถบเอเชียรวมทั้งอินเดียอุบัติการณ์ในปี ค.ศ. 1989 อยู่ระหว่าง 0.09-0.9/100,000 เท่านั้น สำหรับประเทศไทยอุบัติการณ์ในปี ค.ศ. 1993 คือ 0.4/100,000 ทั้งผู้ชายและผู้หญิง ⁽⁸³⁾ และ MM ชนิดที่พบบ่อยในคนผิวคล้ำเช่น คนไทยคือ acral lentiginous melanoma

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่าง MM และ UV มีความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนกว่าการที่ UVB ทำให้เกิด SCC ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นได้ชัดเจนในสัตว์ทดลองและการเกิด SCC มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณแสงที่ได้รับสะสมรวมทั้งมี latitude gradient ชัดเจน พบในคนทำงานกลางแจ้งมากกว่า รวมทั้งรอยโรคของ NMSC จะเกิดบริเวณผิวหนังที่ได้รับแสงแดดสะสมปริมาณมากด้วย ซึ่งทั้งหมดนี้ไม่พบใน MM

การศึกษาในสัตว์ทดลอง

เนื่องจากหนูทดลองที่ใช้ในการทดสอบ NMSC ทั่วไปไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด MM ได้ ปัจจุบันจึงมีสัตว์ทดลอง 2 ประเภทที่ถูกนำมาฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อทำให้เกิด melanoma ได้ ชนิดแรกคือ South America opossum, *Monodelphis domestica* ภายหลังการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต 280-400 nm 250 J/cm^2 เป็นเวลา 70 สัปดาห์ หนึ่งในสี่ของสัตว์ทดลองเกิด melanocytic tumor และมีเนื้องอกกระจายไปที่อื่น ⁽⁸⁷⁾ ในปี ค.ศ. 1997 ผู้วิจัยทำซ้ำได้ทดลองใช้ UVA ขนาด $2.5 \times 10^3 \text{ J/m}^2$ ฉายสัปดาห์ละ 3 ครั้ง ภายหลัง 81 สัปดาห์พบว่าร้อยละ 22 ของสัตว์ทดลองเกิด melanocyte hyperplasia ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของ MM ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ UVB มีร้อยละ 31 ที่เกิด melanocyte hyperplasia ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ต่างกับการเกิด NMSC กลุ่มที่ได้รับ UVB พบ NMSC สูงถึงร้อยละ 71 แต่หากได้รับ UVA พบ NMSC เพียงร้อยละ 4 ⁽⁸⁸⁾

สัตว์ทดลองอีกประเภทคือปลา ผสมระหว่าง platy fish และ swordtail fish (Xiphophorus) เมื่อได้รับ UVB ตั้งแต่ 5 วันหลังจากคลอดประมาณร้อยละ 20-40 ของปลาเกิด MM⁽⁸⁹⁾ ส่วนการทดลองในปี ค.ศ. 1993 โดยผู้วิจัยรายเดียวกันใช้ monochromator 302, 313, 365, 405, 436 mm พบว่าความยาวคลื่นที่มีความสามารถสูงสุดในการทำให้เกิด MM คือ 365, 405, 436 ทั้งที่ความยาวคลื่นนี้ไม่ได้ถูกดูดซับโดยตรงจาก DNA ก็ตาม⁽⁹⁰⁾

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองหลายการศึกษาข้างต้นแสดงว่า UVA น่าจะมีบทบาทสำคัญในการเกิด MM

การกระจายของ MM ทางภูมิศาสตร์

อุบัติการณ์ของ MM ไม่ได้มีการเพิ่มขึ้นตาม latitude ที่ลดลงเหมือน NMSC^(21, 81) เช่น ในทวีปยุโรปอุบัติการณ์การเกิดสูงอยู่ในกลุ่มประเทศสแกนดิเนเวีย เช่น สวีเดน อุบัติการณ์ในผู้ชายต่อผู้หญิงคือ 10.0/11.6 ต่อแสนคน/ปี นอร์เวย์ 13.0/15.8 ในขณะที่ประเทศยุโรปใต้เช่น อิตาลี 4.5/5.1 หรือ สเปน 2.8/3.0 อาจอธิบายถึงความแตกต่างของประชากรที่อาศัย อยู่ในแถบใกล้ศูนย์สูตรว่าจะมีความเสี่ยงต่อการเกิด MM น้อยกว่า เนื่องจากมีสีผิวที่คล้ำกว่าและเกิดผิวไหม้แดงยากกว่า

การย้ายถิ่นฐาน

การศึกษาในประเทศออสเตรเลีย พบว่าคนผิวขาวที่ย้ายถิ่นฐานมาประเทศออสเตรเลีย หลังอายุ 15 ปี จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด MM น้อยกว่าคนผิวขาวที่เกิดในประเทศออสเตรเลีย 2/3 เท่า และคนผิวขาวที่ย้ายไปประเทศออสเตรเลียก่อนอายุ 10 ปี จะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น 4 เท่าของคนที่ไม่เดินทางมาเมื่ออายุ 15 ปี

บริเวณผิวหนังที่เกิด MM

MM พบได้บ่อยที่สุดบริเวณหลังของผู้ป่วยชายและขาของผู้ป่วยหญิง ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้ไม่ใช่บริเวณที่ได้รับแสงแดดสูงสุด

ลักษณะการถูกแสงแดด

การศึกษาเกือบทุกรายงานพบความสัมพันธ์ของการเกิด MM กับการได้รับแสงแดดปริมาณสูงเป็นช่วงๆ (intermittent exposure) เช่น การพักร้อนในสถานที่ที่มีแสงแดดจัด รวมทั้งการเกิดผิวไหม้แดง (sunburn) ซึ่งจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์

ส่วนการถูกแสงแดดสม่ำเสมอ เช่น การทำงานกลางแจ้ง กลับเป็นปัจจัยที่ลดความเสี่ยงต่อการเกิด MM ความแตกต่างระหว่างการถูกแสงแดดจำนวนมากเป็นช่วงๆ กับการถูกแสงแดดสม่ำเสมอมีหลายประการ เช่น การถูกแสงแดดปริมาณต่ำๆ จะกระตุ้นความสามารถในการป้องกัน

แสงแดดตามธรรมชาติ เช่น สี่ผิวคล้ำขึ้น stratum corneum หนาขึ้น ทำให้ปริมาณของแสงส่องผ่านผิวหนังลดลง มีผลต่อ melanocyte และระบบภูมิคุ้มกันลดลง

การเกิดผิวไหม้แดด (sunburn)

มีหลักฐานจากการศึกษามากกว่า 10 รายงานพบว่าสัมพันธ์กับการเกิด MM โดยมีบางรายงานพบว่า relative risk (RR) เพิ่มขึ้นถึง 7 เท่า และรายงานสถิติคนไข้ ในปี ค.ศ. 2001 พบว่าการเกิดผิวไหม้แดด sunburn ในทุกช่วงอายุสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์ MM โดยเฉพาะช่วงวัยเด็กเท่านั้น⁽⁹¹⁾

การใช้ sunbed

เป็นที่นิยมมากในคนผิวขาว ทุกๆ ปีมีประชากรสหรัฐอเมริกาประมาณ 25 ล้านคนใช้บริการ tanning salon หลอดไฟที่ใช้ในสถานบริการแบบนี้จะให้รังสี UVA เกือบร้อยละ 100 ในผู้ใช้บริการตลอดปีจะได้รับรังสี UVA ต่อปีประมาณ 19,250 kJ/cm² มากกว่าตามธรรมชาติ 1-5 เท่า

การศึกษาของ Westerdahl J และคณะในปี ค.ศ. 2000⁽⁹²⁾ พบว่าเมื่อนำตัวแปรอื่นออกไปแล้ว เช่น สี่ผิวนิย skin type และจำนวนครั้งของการเกิดผิวไหม้แดด พบว่าการใช้ sunbed เพิ่มการเกิด MM โดย odds ratio = 1.8, (95% CI, 1.2-2.7) และจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าเริ่มใช้ sunbed ก่อนอายุ 37 ปี แม้หลอดไฟที่ใช้ใน sunbed จะมีรังสี UVA เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็พบ UVB อยู่ประมาณร้อยละ 0.1-2.1 ดังนั้นการเกิด MM น่าจะมาจากผลของ UVA เป็นส่วนใหญ่

แสงไฟจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

ในปี ค.ศ. 1982 Beral V และคณะ⁽⁹³⁾ ได้ตั้งข้อสงสัยถึงความสัมพันธ์ระหว่างแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมี UVA ปะปนมาเล็กน้อยว่าเป็นสาเหตุของ MM แต่มีอีก 4 รายงานที่ไม่สนับสนุนสมมุติฐานนี้

PUVA

ภายหลังการใช้ PUVA อย่างแพร่หลายตั้งแต่ปี ค.ศ. 1974 ได้มีหลักฐานจากหลายประเทศ และการทำ metaanalysis ว่ามีการเพิ่มอุบัติการณ์ของ SCC ในผู้ป่วยที่ได้รับ PUVA และมี skin type I-III โดยสัมพันธ์กับปริมาณแสงที่สูงกว่า 2,000 J/cm² และการรักษาที่มากกว่า 200 ครั้งแต่สำหรับ MM มีรายงานจากการศึกษาในสหรัฐอเมริกาแบบ prospective ติดตามผู้ป่วย 1,380 คนที่ได้รับ PUVA ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 มาเป็นเวลากว่า 15 ปี พบว่ามีผู้ป่วย 23 รายเกิด MM ทั้งชนิด in situ และ invasive โดยผู้ป่วยทั้งหมดมี skin type I-III⁽⁹⁴⁾ แต่การศึกษาในสวีเดน 2 รายงานที่ติดตามผู้ป่วยเป็นเวลาประมาณ 15 ปีเช่นกัน ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ MM โดยการศึกษาแรกผู้ป่วยได้รับ PUVA Bath⁽⁹⁵⁾ และการศึกษาที่สองมีผู้ป่วย 4,799 คน⁽⁹⁶⁾

โดยสรุป หลักฐานในปัจจุบันชี้ว่า UVA น่าจะเป็นบทบาทสำคัญในการเกิด MM และการเกิด MM ไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณแสงสะสมที่ผู้ป่วยได้รับ แต่จะสัมพันธ์กับการได้รับแสงแดดจัดในวัยเด็ก หรือการเกิดผิวไหม้แดงจากแดดในทุกช่วงอายุ

ความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งผิวหนัง

โดยสรุปปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ 2 ประการของการเกิดมะเร็งผิวหนังคือ ปริมาณแสงสะสมที่ได้รับ และเชื้อชาติซึ่งเป็นปัจจัยกำหนดสีผิว ตาและผม สำหรับคนไทยมีผิวคล้ำ ผมและตาดำ จัดเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ ประกอบกับค่านิยมทางสังคมที่ไม่นิยมสีผิวคล้ำจึงไม่นิยมการอาบแดด ทำให้ความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งผิวหนังต่ำมาก ยกเว้นกลุ่มบุคคลที่ทำงานกลางแจ้ง จึงจะเห็นว่าอัตราการเกิดทั้ง NMSC และ MM ในประเทศไทยต่ำมากเมื่อเทียบกับประเทศสหรัฐอเมริกาและออสเตรเลีย

มะเร็งผิวหนัง⁽⁹⁷⁾

ในปัจจุบันมะเร็งผิวหนังได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากอุบัติการณ์ของมะเร็งผิวหนังทุกชนิดเพิ่มมากขึ้น สาเหตุจากสภาวะแวดล้อมของโลกที่เปลี่ยนแปลงไปในหลายด้านเชื้ออำนวยการให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้มากขึ้น เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ลงมาถึงผิวโลกมากขึ้น ประชากรอายุยืนขึ้น มีโอกาสได้รับสารก่อมะเร็งหลายชนิดมากขึ้น และจำนวนประชากรที่มีภูมิคุ้มกันลดลงเพิ่มมากขึ้น เป็นต้น

มะเร็งของผิวหนังมีมากมายหลายชนิด เกิดได้จากเซลล์ทุกชนิดที่เป็นส่วนประกอบของผิวหนัง เช่น จากเซลล์หนังกำพร้า เซลล์จากชุมชน ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ เซลล์สร้างเม็ดสีผิว เป็นต้น หรืออาจเป็นมะเร็งที่แพร่กระจายมาจากอวัยวะอื่น มะเร็งผิวหนังที่พบบ่อยที่สุด คือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์ในชั้นฐานของหนังกำพร้า (basal cell epithelioma) รองลงมาคือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์ในชั้นหนังกำพร้า (squamous cell carcinoma) ส่วนมะเร็งที่พบบ่อยน้อยแต่มีความร้ายแรงที่สุดทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต คือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์สร้างเม็ดสีผิว (malignant melanoma)

Basal cell epithelioma (BCE) ⁽⁹⁷⁾

BCE เป็นมะเร็งผิวหนังที่พบบ่อยที่สุด เจริญมาจากเซลล์ชั้นฐานของหนังกำพร้าและต่อมต่าง ๆ พบในคนผิวขาวมากกว่าคนผิวดำ มักเกิดในบริเวณผิวหนังที่ถูกแสงแดดมาก อายุผู้ป่วยที่พบมักเกิน 40 ปีขึ้นไป พบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง อาจเนื่องจากผู้ชายต้องออกไปทำงานนอกร้านและถูกแสงแดดมากกว่า แต่ความแตกต่างของอุบัติการณ์นี้กำลังลดน้อยลงไป จากการเปลี่ยนแปลงวิถีชีวิตที่ผู้หญิงออกไปทำงานนอกร้านมากขึ้น ตำแหน่งที่พบบ่อยคือ ที่หนังตา inner canthus หลังหู ที่พบน้อยคือ ที่หลังมือ แขน ฝ่ามือ ฝ่าเท้า และริมฝีปาก จะเห็นว่าไม่สัมพันธ์กับปริมาณแสงที่ได้รับ ซึ่งต่างกับใน squamous cell carcinoma เข้าใจว่าจำนวน pilosebaceous คงมีส่วนในการกำหนดตำแหน่งการเกิดด้วย

สาเหตุร่วมอื่น ๆ ของ BCE เช่น arsenic compound ซึ่งเป็นส่วนผสมใน Fowler's solution ใช้รักษาโรคหลายชนิดในอดีต เช่น psoriasis, asthma หรือเป็นส่วนประกอบในยาฆ่าแมลง และยังพบในน้ำใต้ดินในพื้นที่บางแห่งของโลก รวมทั้งในภาคใต้ของไทยด้วย โรคพันธุกรรมบางชนิดมีโอกาสเกิด BCE มากขึ้น เช่น albinism, xeroderma pigmentosum, basal cell nevus syndrome เป็นต้น รวมทั้งผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

ลักษณะทางคลินิก ⁽⁹⁷⁾

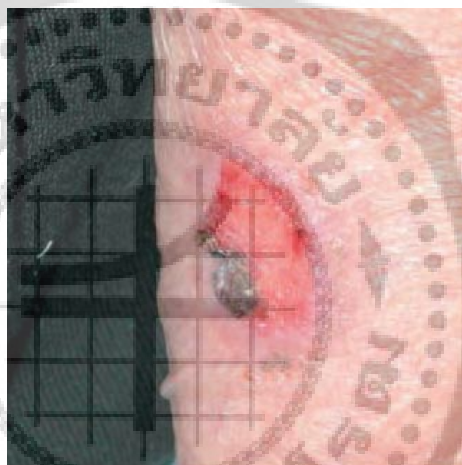
ลักษณะทางคลินิกที่พบบ่อยมี 5 ชนิด คือ noduloulcerative BCE, superficial BCE, sclerosing BCE, pigmented BCE และ cystic BCE

BCE ส่วนใหญ่พบที่บริเวณใบหน้า ยกเว้น superficial BCE ที่พบบริเวณลำตัวมากกว่า แต่ที่จริงแล้ว BCE พบบริเวณใดก็ได้แต่อุบัติการณ์น้อยกว่า นอกจากนี้อาจพบ BCE บริเวณรอยสัก แผลเรื้อรัง burn, chickenpox, vaccination scar และ colostomy sites เป็นต้น

1. **Noduloulcerative BCE** เริ่มจากเป็นตุ่มผิวเรียบเป็นมัน แล ะมักมีหลอดเลือดขยายตัวเห็นจากผิวบน ตุ่มขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ ตรงกลางมักนูนลงไปและแตกเป็นแผล ขอบยกนูนขึ้นและม้วนเข้า นานเข้าแผลจะกว้างและลึกลงคล้ายแผลหนูแทะ อาจมีสีผิวหรือมีสีน้ำตาลก็ได้



ภาพประกอบ 1 Nodular basal cell carcinoma ⁽⁹⁸⁾



ภาพประกอบ 2 Rodent ulcer with central necrosis ⁽⁹⁸⁾

2. Superficial BCE มีลักษณะเป็น plaque แบน โดยมีขอบยกบาง ๆ เป็นมัน ซึ่งเป็นจุดที่ชี้แยกจาก Bowen's disease หรือ psoriasis บริเวณกลางผื่นมักมี atrophy เล็กน้อย อาจมีลักษณะเป็น crust หรือแตกเป็นแผล ผื่นขยายออกและมีก้อนเนื้อเกิดขึ้นบนผื่นได้ พบบ่อยบริเวณลำตัว ซึ่งถ้าพบหลายจุดต้องนึกถึง basal cell nevus syndrome ด้วย



ภาพประกอบ 3 Superficial basal cell carcinoma ⁽⁹⁸⁾

3. Pigmented BCE เป็นเนื้องอกที่มีสีเข้มคล้าย melanoma โดยมีลักษณะการเกิดเหมือน noduloulcerative BCE หรืออาจเหมือน cystic BCE บางครั้งอาจเกิดที่ฐานเล็บทำให้เกิดลักษณะ longitudinal melanonychia ได้⁽⁹⁹⁾



ภาพประกอบ 4 Pigmented basal cell carcinoma⁽⁹⁸⁾

4. Sclerosing BCE มักพบบริเวณใบหน้า ลักษณะเป็น infiltrating plaque ผิวเรียบเป็นมัน แข็ง ขอบเขตไม่ชัดเจน ดูคล้าย morphea ไม่แตกเป็นแผล พบในคนอายุน้อยและไม่ค่อยมีอาการ จึงมักทำให้มารับการรักษาเมื่อเวลาผ่านไปนาน จนเนื้องอกกินลึกลงไปมาก



ภาพประกอบ 5 Morpheaform basal cell carcinoma⁽⁹⁸⁾

5. Cystic BCE เป็นชนิดที่พบได้น้อย อาจมีลักษณะเหมือนซิสต์เล็ก ๆ สีน้ำเงินเทา ดูคล้าย apocrine hidrocystoma หรืออาจเป็นซิสต์ใหญ่ ดูเหมือน benign cyst อย่างอื่นได้

นอกจากนี้ยังมี BCE ที่เกิดร่วมกับโรคทางพันธุกรรมหรือความผิดปกติที่มีมาแต่กำเนิด บางชนิด ดังนี้

1. Basal cell nevus syndrome
2. Linear basal cell nevus
3. Bazex syndrome (follicular atrophoderma and BCE)
4. Torre's syndrome
5. Xeroderma pigmentosum
6. Nevus sebaceous with BCE formation

1. Basal cell nevus syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดแบบ autosomal dominant โรคนี้ประกอบด้วยอาการและอาการแสดง ดังนี้

- ก. มี BCE หลายตำแหน่ง
- ข. มีประวัติครอบครัว
- ค. มี keratinous cyst ที่คาง
- ง. มี epidermal cyst
- จ. มี hamartoma ในอวัยวะภายใน เช่น ovarian fibroma, gastric polyp
- ฉ. มีมะเร็งของอวัยวะภายใน เช่น ovarian fibrosarcoma, colon cancer
- ช. Palmar และ/หรือ plantar pits
- ซ. ความผิดปกติของกระดูก และมี frontal bossing
- ณ. ความผิดปกติทางระบบประสาท เช่น epilepsy, meningioma

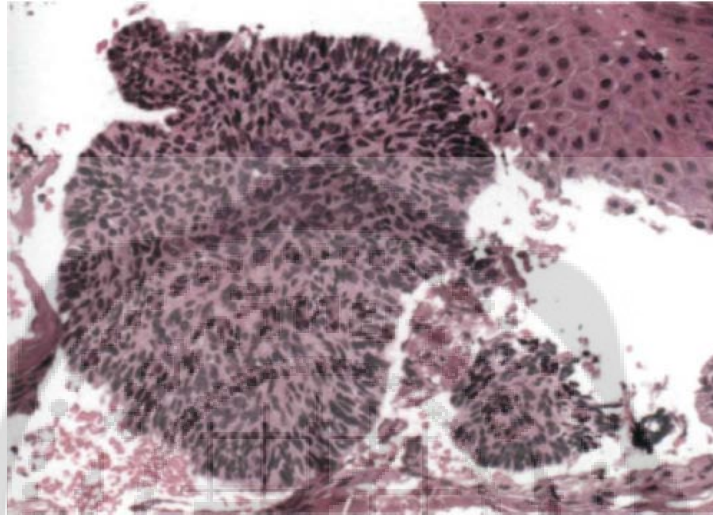
2. Linear basal cell nevus ประกอบด้วย BCE เรียงกันเป็นแถวอาจร่วมกับ comedones, epidermal inclusion cyst

3. Bazex syndrome ประกอบด้วย follicular atrophoderma , pigmented BCE , hypohidrosis และ hypotrichosis

4. Torre's syndrome ประกอบด้วย sebaceous neoplasm , keratoacanthoma มะเร็งของอวัยวะภายในและ BCE

จุลพยาธิวิทยา ⁽⁹⁷⁾

พบกลุ่มเซลล์ในชั้นหนังแท้ เซลล์ที่อยู่รอบ ๆ เรียงตัวกันเป็นแถว โดยที่ไม่มี atypia หรือมีก็น้อยมาก อาจแบ่งลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเป็น 2 ประเภท ใหญ่ ๆ คือ แบบ solid หรือ undifferentiated และแบบ differentiated ส่วนใหญ่เป็นแบบแรก แบบที่ 2 นั้น กลุ่มเซลล์แสดงลักษณะของการเจริญเติบโตไปเป็นเส้นผม ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ หรือต่อม apocrine



ภาพประกอบ 6 Basal cell carcinoma แสดง nest of basaloid cell, peripheral palisading และ retraction artifact ⁽¹⁰⁰⁾

การวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค ⁽⁹⁷⁾

1. Nodular BCE มีลักษณะทางคลินิกค่อนข้างจำเพาะ การวินิจฉัยจึงไม่ยากนัก แต่ในระยะแรก ๆ ที่มีขนาดเล็กต้องแยกจากไฟ molluscum contagiosum หรือ sebaceous hyperplasia ถ้ามี scale หรือ crust ต้องแยกจากหูด keratoacanthoma และ squamous cell carcinoma
 2. Pigmented BCE ต้องแยกจาก malignant melanoma โดยดูจากขอบและหลอดเลือดที่ขยายตัว BCE เป็นสีน้ำตาลดำ ไม่มี halo รอบ ๆ ส่วน melanoma มักมีหลายสีปนกัน
 3. Superficial BCE เป็นแบบที่แยกยาก อาจมีลักษณะคล้าย eczema, psoriasis หรือ Bowen's disease ถ้าขูด scale ออกจะเห็นลักษณะขอบของ BCE ได้ชัดเจน
 4. Sclerosing BCE ดูคล้าย morphea แต่ขอบเขตของเนื้องอกไม่ชัดเจน และการดำเนินโรคช้ากว่า
- อย่างไรก็ตาม การให้การวินิจฉัยมะเร็งทุกชนิดต้องยืนยันโดยผลการตรวจชิ้นเนื้อ

Squamous cell carcinoma (SCC)

นิยาม ⁽¹⁰¹⁾

Squamous cell carcinoma (SCCs) เป็นเนื้องอกที่เจริญมาจาก suprabasal epidermal keratinocytes ทั้ง squamous cell carcinoma และ basal cell cancer เป็นมะเร็งผิวหนังในกลุ่ม non – melanoma ที่พบมากที่สุด ในมะเร็งของมนุษย์ SCC พัฒนามาจากรอยโรคก่อนมะเร็ง เช่น actinic keratosis (AK) และ Bowen disease (SCC in situ)

อุบัติการณ์ ⁽⁹⁷⁾

อุบัติการณ์ที่แน่นอนของผู้ป่วย SCC นั้นค่อนข้างรวบรวมยาก เนื่องจากผู้ป่วยอาจได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลเอกชนหรือตามคลินิก และอาจได้รับการรักษาโดยการจี้ด้วยไฟฟ้าหรือความเย็น โดยที่ไม่ได้ส่งตรวจชิ้นเนื้อก็ได้ อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปอุบัติการณ์ของ SCC ขึ้นกับองค์ประกอบสำคัญ 2 อย่าง คือ ปริมาณแสงแดดสะสมที่ผู้ป่วยได้รับ และปริมาณเม็ดสีผิวของผู้ป่วย ดังนั้น อุบัติการณ์จึงแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ขึ้นกับระดับเส้นรุ้ง เส้นแวงที่ประเทศนั้นตั้งอยู่ สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน กลุ่มอาชีพที่แตกต่างกัน พบมากในคนผิวขาว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบที่มีแสงแดดจัด เช่น Queensland หรือ Texas พบน้อยในคนผิวดำ ช่วงอายุที่พบบ่อยคือตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป พบน้อยในผู้ที่อายุน้อยกว่านี้ นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีโรคทางพันธุกรรมบางชนิดที่มีโอกาสเกิดมะเร็งของผิวหนังมากกว่าคนปกติ ตัวเลขล่าสุดของอุบัติการณ์ของ SCC ในประเทศออสเตรเลีย ⁽¹⁰²⁾ เท่ากับ 160 : 100,000 และในประเทศแคนาดา ⁽¹⁰³⁾ เท่ากับ 39 : 100,000 ผู้ชายต่อผู้หญิงเท่ากับ 3 : 1 (รวมทั้งประเทศแคนาดาและออสเตรเลีย)

สาเหตุและพยาธิกำเนิด ⁽¹⁰¹⁾

มีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังชนิด squamous cell carcinoma

Precursor lesions

SCC ส่วนมากเจริญพัฒนามาจากรอยโรคก่อนมะเร็ง เช่น actinic keratosis หรือ Bowen disease

Ultraviolet radiation exposure

รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิด SCC มีความสัมพันธ์ระหว่างอุบัติการณ์การเกิด SCC กับการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต อุบัติการณ์ของ SCC เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าทุก 8-10 องศาแลตติจูดที่ลดลง ⁽¹⁰⁴⁾ การได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีความสัมพันธ์ในการเกิด SCC มากกว่า BCC ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย PUVA เป็นระยะเวลาสั้น จะเพิ่มโอกาสในการเป็นมะเร็งชนิด non – melanoma โดยเฉพาะ SCC ถึง 30 เท่า ⁽¹⁰⁵⁾

Ionizing radiation

มีความสัมพันธ์ระหว่าง SCC กับการได้รับการฉายรังสี

Environmental carcinogens

ปัจจัยที่ทำให้เกิด SCC ได้แก่ arsenic และ aromatic hydrocarbons นอกจากนี้ยาฆ่าแมลงและยากำจัดวัชพืชก็มีความสัมพันธ์กับ SCC นอกจากนี้การสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์มีความสัมพันธ์กับการเกิด SCC ที่บริเวณช่องปาก

Immunosuppression

การมีภาวะภูมิคุ้มกันลดลง (Chronic immunosuppression) ทำให้เพิ่มอุบัติการณ์ SCC โดยเฉพาะตำแหน่งที่ได้รับแสง⁽¹⁰⁶⁾ ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไต อุบัติการณ์ SCC เพิ่มขึ้น 18 เท่า⁽¹⁰⁷⁾ การได้รับยากดภูมิคุ้มกันระยะยาว , การได้ยาสเตียรอยด์ , azathioprine, cyclosporine มีความสัมพันธ์กับการเกิด SCC เช่นกัน ผู้ป่วยลิวคีเมียและليمโฟมา มีอุบัติการณ์ SCC สูงขึ้น⁽¹⁰⁸⁾

Scar and underlying diseases

SCC มีความสัมพันธ์กับ chronic infection ต่าง ๆ เช่น perianal pyoderma, osteomyelitis chromomycosis, hyalohyphomycosis, granuloma inguinale, lupus vul garis, leprosy นอกจากนี้ SCC มีความสัมพันธ์กับ chronic inflammatory process ต่าง ๆ เช่น venous ulcer, snakebite ulcer, discoid lupus erythematosus, oral lichen planus, morphea, lichen sclerosus, pilonidal cyst, acne conglobata, hidradenitis suppurativa, Hailey – Hailey disease, dissecting folliculitis of the scalp, necrobiosis lipoidica SCC ยังพบว่ามี ความสัมพันธ์กับผิวหนังที่ได้รับการปลูกถ่าย (transplanted skin), epidermal cyst, dental cyst และ dermoid cyst

Thermal factors

การได้รับความร้อนนานเป็นสาเหตุของ SCC ได้ อุบัติการณ์ของ SCC สูงขึ้นในคนที่มีการสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์ และผิวหนังที่มีลักษณะเป็น erythema ab igne

Human papillomavirus infection

มีความสัมพันธ์ระหว่าง human papilloma virus (HPV) กับมะเร็ง SCC บางประเภท verrucous carcinoma มีความสัมพันธ์กับ HPV หลายชนิด กล่าวคือ epithelioma cuniculatum สัมพันธ์กับ HPV type 6, 11, 16, 18 และ oral verrucous carcinoma สัมพันธ์กับ HPV type 11 SCC ที่บริเวณศีรษะและลำคอ , SCC ที่บริเวณ periungual มีความสัมพันธ์กับ HPV type 16

Genodermatoses

โรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมบางประเภทเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิด SCC มากขึ้น เช่น oculocutaneous albinism, xeroderma pigmentosum, porokeratosis ชนิด Mibelli disseminated superficial actinic, Palmaris et plantaris disseminata, dyskeratosis congenita และ dystrophic form ของ epidermolysis bullosa

ลักษณะทางคลินิก⁽¹⁰¹⁾

ในประชากรผิวขาว ตำแหน่งของ SCC มักพบที่ตำแหน่งถูกแสงแดด (sun-exposed areas) เช่น ศีรษะ ลำคอ หลังมือ SCC ที่ขาสองข้างพบบ่อยในผู้หญิง⁽¹⁰⁹⁾ ในทางตรงกันข้าม ประชากรผิวดำ SCC พบเท่ากันทั้งบริเวณถูกแสงแดดและไม่ถูกแสงแดด⁽¹¹⁰⁾ SCC มักเป็นรอยโรคเดี่ยว ยกเว้นในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunosuppressed) สามารถพบ SCC จำนวนมากได้ (eruptive SCC)

การเจริญพัฒนาของมะเร็งผิวหนังชนิด squamous cell carcinoma จากรอยโรคก่อนมะเร็ง⁽¹⁰¹⁾

Actinic keratosis เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากขนาดเล็ก ๆ จนถึงขนาดมากกว่า 2 เซนติเมตร ขอบเขต ไม่ชัดเจน ขุยสีขาวที่ติดอยู่ทำให้มีลักษณะหยาบ รอยโรคของ Bowen disease คือเป็นรอยโรคเดี่ยว ขอบเขตชัดเจน มีขุย บ่อยครั้งมักวินิจฉัยผิดพลาดเป็นผื่นผิวหนังอักเสบ (eczema) , งินสะเก็ด lichen simplex Bowen disease อาจมีลักษณะแบบ noneczematous ได้ ยกตัวอย่างเช่น ที่บริเวณก้น เปลือกตา รอยโรคมีลักษณะคล้ายหูดได้หรือที่บริเวณซอกพับ , เล็บ , (intertriginous areas) รอยโรคมีลักษณะเป็นแผ่นสีเข้ม (dark patch) ได้ รอยโรคก่อนมะเร็งทั้ง actinic keratosis และ Bowen disease จะไม่มีอาการ (asymptomatic) การที่มีอาการเจ็บ (tenderness) คลำได้เป็นลำแข็ง (induration) มีรอยถลอก (erosion) มีขุย (scale) รอยโรคมีขนาดใหญ่ขึ้น จะต้องคิดถึง SCC เสมอ

ลักษณะทางคลินิกของ squamous cell carcinoma⁽¹⁰¹⁾

ลักษณะที่พบบ่อยที่สุดคือ ตุ่มนูน แข็ง สีแดง หรือสีเนื้อ (firm, flesh – colored or erythematous keratotic papule or plaque) ลักษณะอื่น ๆ คือ เป็นแผล (ulcer), smooth nodule, thick cutaneous horn, verrucous หรือ abscess บริเวณศีรษะและลำคอ การคลำได้ ต่อมน้ำเหลือง อาจบ่งบอกถึงการแพร่กระจายของมะเร็ง (tumor metastasis)



ภาพประกอบ 7 Papular squamous cell carcinoma of the ear ⁽¹⁰¹⁾



ภาพประกอบ 8 Ulcerative squamous cell carcinoma of the jaw ⁽¹⁰¹⁾



ภาพประกอบ 9 Nodular squamous cell carcinoma of the forehead ⁽¹⁰¹⁾



ภาพประกอบ 10 Preauricular mass resulting from cutaneous squamous cell carcinoma (101)

Oral Squamous Cell Carcinoma ⁽¹⁰¹⁾

SCC ของบริเวณช่องปาก มักพบในผู้ป่วยที่มีประวัติสูบบุหรี่ เคี้ยวยาสูบหรือดื่มสุรา ภาวะนี้พบบ่อยในเพศชาย ตำแหน่งที่พบบ่อยคือ เพดานปากและลิ้น

SCC ที่บริเวณช่องปาก มักเจริญพัฒนามาจากรอยโรคชนิด erythroplakia และมักไม่มีอาการลักษณะของ SCC ที่บริเวณช่องปาก คือ เป็นแผ่นสีแดงหยาบ (rough red patch) หรือเป็นแผ่นสีแดงคล้ายกำมะหยี่ (granular velvety red plaque) และในที่สุดกลายเป็นตุ่มนูน แข็ง (firm and nodular) ตำแหน่งที่พบ SCC ได้คือ floor of the mouth ventrolateral tongue และ soft palate

Lower Lip Squamous Cell Carcinoma ⁽¹⁰¹⁾

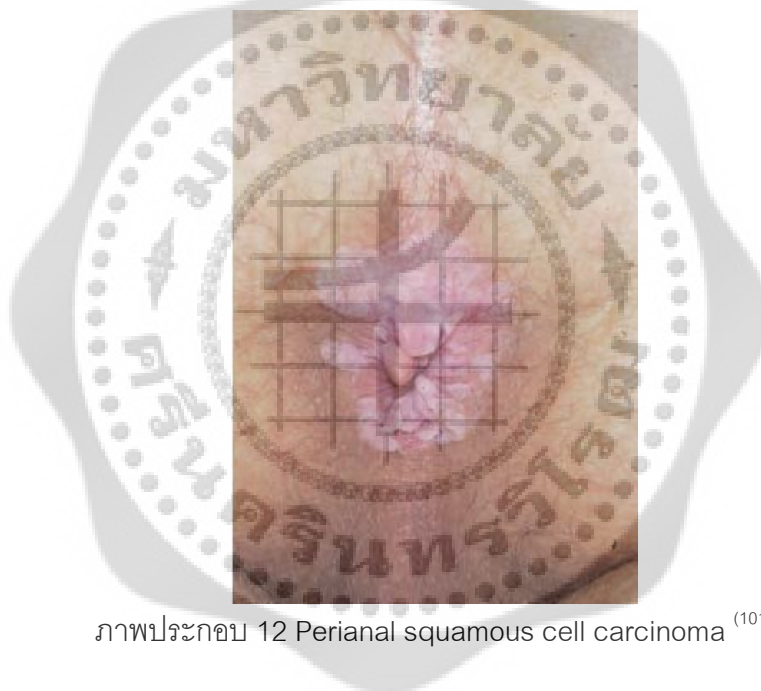
SCC ที่บริเวณริมฝีปากล่าง มีลักษณะเป็น actinic cheilitis หรือ scaly leukoplakia และพัฒนาเป็นก้อนมะเร็ง ลักษณะสำคัญที่สัมพันธ์กับ SCC คือ การมีริมฝีปากแตกปรินาน ๆ มีขุยบริเวณ vermilion zone มีลักษณะ red and white blotchy vermilion border มีลักษณะคดเคี้ยว (wandering) ภายในบริเวณของ actinic cheilitis มี fissure หรือ ulceration



ภาพประกอบ 11 Squamous cell carcinoma of the lower lip ⁽¹⁰¹⁾

Genital Squamous Cell Carcinoma ⁽¹⁰¹⁾

SCC ที่บริเวณอวัยวะเพศพบบ่อยที่บริเวณ anterior labia majora ลักษณะสำคัญคือ เป็น small warty nodule หรือ erosive erythematous plaque รอยโรคอาจไม่มีอาการหรือมีอาการคันและเลือดออกได้ lichen sclerosus เป็นรอยโรค precursor ของ SCC บริเวณอวัยวะเพศที่พบบ่อย SCC ที่บริเวณปากมดลูกมีความสัมพันธ์กับไวรัส HPV ชนิดที่ 16 SCC ที่บริเวณถุงหุ้มอัณฑะ มีลักษณะเป็น small pruritic verrucous lesion รอยโรคที่เป็น precursor ของ SCC บริเวณอวัยวะเพศชายคือ erythroplasia of Queyrat SCC ที่บริเวณอวัยวะเพศชายมีความสัมพันธ์กับการไม่ขลิบอวัยวะเพศ การมีประวัติ, condyloma, phimosis และ lichen sclerosus et atrophicus, ประวัติได้รับการฉายแสง UVA และ PUVA



ภาพประกอบ 12 Perianal squamous cell carcinoma ⁽¹⁰¹⁾

Scar Squamous Cell Carcinoma ⁽¹⁰¹⁾

พบบ่อยที่ตำแหน่งขาที่บริเวณ chronic pyogenic หรือ venous stasis ulcers มักพบร่วมกับอาการปวดหรือมีเลือดออก

Keratoacanthoma ⁽¹⁰¹⁾

ตำแหน่งที่พบบ่อยคือ sun - exposed area โดยเฉพาะที่ขา ลักษณะของ keratoacanthoma คือ ตุ่มนูนคล้ายโดม มีลักษณะคล้ายหูด และมี central keratotic crater

Verrucous Carcinoma ⁽¹⁰¹⁾

Verrucous Carcinoma มีลักษณะคือ เป็นก้อนเนื้อออกโตช้า มีลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำ (Cauliflower – like appearance) มี 4 ชนิด

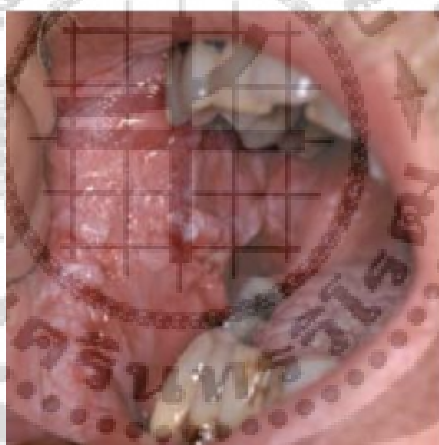
ชนิดที่ 1 เป็นก้อนเนื้อออกที่เกิดบนกระพุ้งแก้มของผู้ป่วยที่เคี้ยวยาสูบ เรียกว่า oral florid papillomatosis เนื้อออกชนิดนี้มักพบที่กระพุ้งแก้ม ลิ้น เหงือก ฐานของช่องปาก

ชนิดที่ 2 anogenital type เกิดขึ้นที่ glans penis, ถุงหุ้มอัณฑะ , รอบทวาร

ชนิดที่ 3 epithelioma cuniculatum เป็นเนื้อออกที่พบที่ฝ่าเท้า บริเวณ first metatarsal head และสร้าง draining sinus ได้

ชนิดที่ 4 เกิดขึ้นที่ตำแหน่งอื่น ๆ ได้แก่ หนังศีรษะ ลำตัว แขน ขา

การตรวจพบ HPV type 6, 11, 16, 18 ใน epithelioma cuniculatum และ HPV type 11 ใน oral verrucous carcinoma ทำให้เชื่อว่า เนื้อออกประเภทนี้เจริญพัฒนามาจาก verruca vulgaris



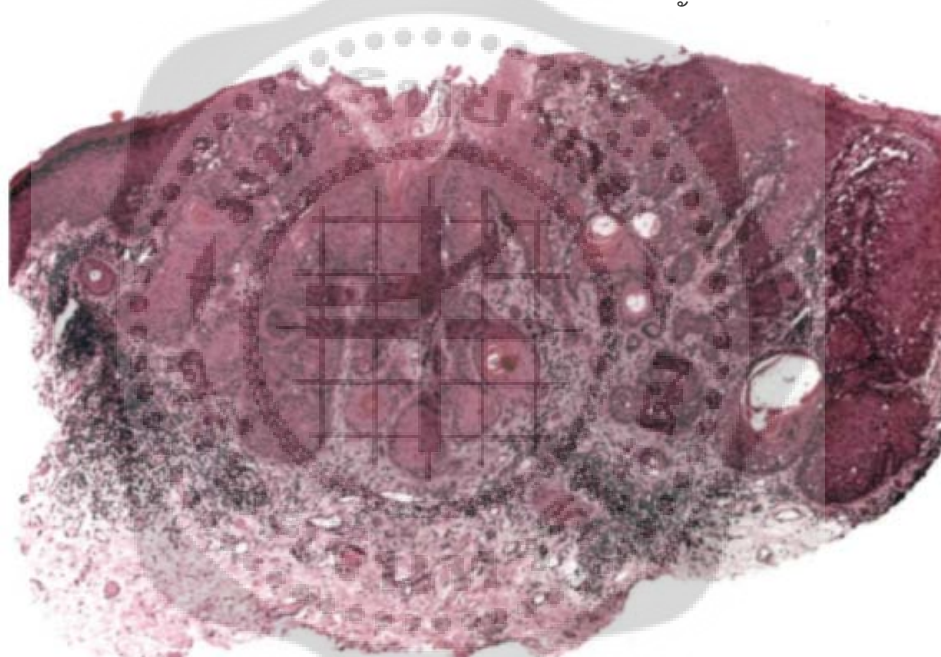
ภาพประกอบ 13 Oral florid papillomatosis ⁽¹⁰¹⁾



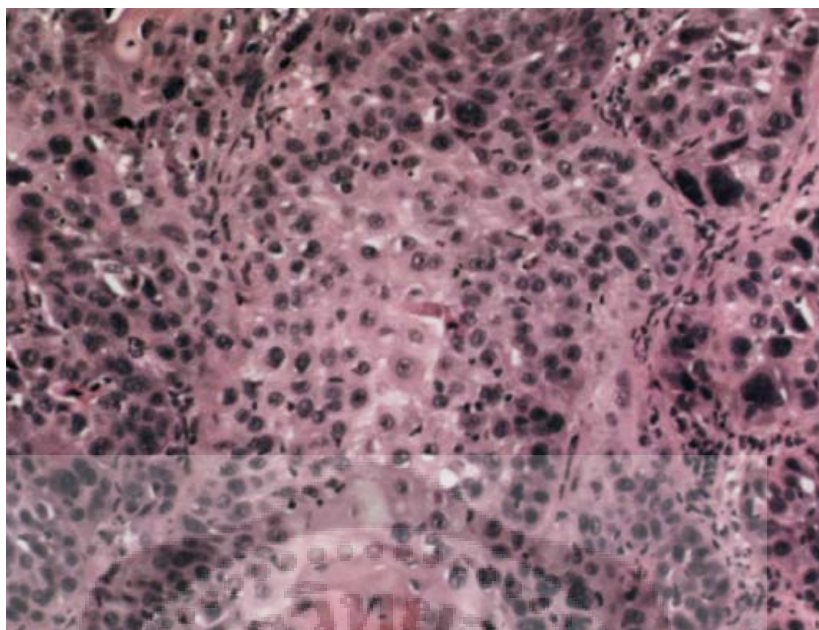
ภาพประกอบ 14 Epithelioma cuniculatum ⁽¹⁰¹⁾

จุลพยาธิวิทยา ⁽⁹⁷⁾

พบความผิดปกติของเซลล์หนังกำพร้า เป็นเซลล์ที่มีขนาดของนิวเคลียสใหญ่ขึ้น หรือมีหลายนิวเคลียสในเซลล์เดียว ติดสีเข้มมีการแบ่งตัวมากขึ้น แต่มีการลดลงของ tonofilament และ intercellular bridge ใน in situ SCC พบเซลล์ที่ผิดปกติเฉพาะในชั้นหนังกำพร้า แต่ถ้าเป็น invasive SCC พบเซลล์เหล่านี้รุกรานเข้าไปในชั้นหนังแท้ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่มก็ได้ ระดับ differentiation ของเซลล์ที่ผิดปกตินี้ดูได้จากความสามารถของการสร้างเคอราติน และ atypism ของเซลล์นั้น Broders แบ่ง SCC ออกเป็น grade 1, 2, 3 และ 4 ตามจำนวนของ undifferentiated cell คือน้อยกว่าร้อยละ 25, 50, 75 และมากกว่าร้อยละ 75 ตามลำดับ ซึ่งระดับของ differentiation ความลึกและความหนาของมะเร็งมีความสำคัญในการพยากรณ์โรค



ภาพประกอบ 15 Squamous cell carcinoma แสดง extension of atypical keratinocytes beyond the basement membrane and into the dermis, atypical squamous cell characterized by increased mitoses, aberrant mitotic figures, nuclear hyperchromasia, loss of intercellular bridges and horn pearls ⁽¹⁰⁰⁾



ภาพประกอบ 16 Squamous cell carcinoma ⁽¹⁰⁰⁾

การวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค ⁽⁹⁷⁾

การวินิจฉัย SCC ทำเช่นเดียวกับมะเร็งทุกชนิด ต้องอาศัยผลการตรวจชิ้นเนื้อ แต่ก็ต้องเริ่มจากการนึกถึงและส่งตรวจชิ้นเนื้อก่อน

ลักษณะทางคลินิกของ SCC ที่มีผิวขรุขระต้องแยกจาก verrucous carcinoma หูดที่มีขนาดใหญ่ giant seborrheic keratosis, verrucous melanoma, giant keratoacanthoma นอกจากนี้ยังมี deep fungal infection, pyogenic granuloma, eccrine poroma, BCE, melanocytic nevi, Bowen's disease และ cutaneous Hodgkin's disease

จุลพยาธิวิทยา ⁽⁹⁷⁾ ต้องแยกจากโรคที่มี pseudoepitheliomatous hyperplasia เช่น viral wart, blastomycosis, coccidioidomycosis, chronic mechanical trauma แยกจากเนื้องอกอื่น เช่น dermatofibroma, granular cell myoblastoma แยกจากการแพ้ยาบางอย่าง เช่น bromoderma, iododerma, keratoacanthoma ถ้าเซลล์ของ SCC มีรูปร่างกลม หรือ spindle ต้องแยกจาก fibrosarcoma, atypical fibroxanthoma และ Merkel cell carcinoma ในการแยกโรคต้องพยายามหาสิ่งบ่งบอกถึงที่มาของเซลล์มะเร็งว่ามาจากเซลล์ชั้นหนังกำพร้าคือ เคอราติน intercellular bridge และอาจต้องย้อมพิเศษหา epithelial membrane antigen, high molecular weight keratin เป็นต้น ส่วน involucrin เป็น protein precursor ของส่วนที่หุ้มเซลล์หนังกำพร้าใช้แยกระหว่าง SCC กับ keratoacanthoma ⁽¹¹¹⁾

การรักษามะเร็งผิวหนังชนิด nonmelanoma ^(36, 37)

Standard excision

Surgical excision ใช้รักษาในกรณี basal cell carcinoma แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการหายขาด (cure rates) ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ Mohs surgery ในกรณีของ recurrent BCC, infiltrative BCC และ BCC ที่มาจาก high risk anatomic sites กรณี BCC ขนาดน้อยกว่า 2 เซนติเมตร ให้ผ่าตัด BCC ออกจากขอบ 4 มิลลิเมตร ถ้าผ่าตัดห่างจากขอบไม่มากนัก ผลการรักษา มักไม่ได้ผลดี ⁽¹¹²⁾ กรณี high risk SCC เช่น ขนาดมากกว่า 2 เซนติเมตร poor differentiation, มะเร็งเข้าไปในชั้นไขมัน, อยู่ในตำแหน่ง high risk จะผ่าตัดห่างจากขอบรอยโรค 6 มิลลิเมตร

Curettage with electrodesiccation

วิธีนี้ใช้สำหรับรักษา BCC cure rate สูงถึง 97-98% ⁽¹¹³⁾ curettage with electrodesiccation สามารถใช้รักษา SCC in situ และ well – differentiated primary SCC ที่มีขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร ได้ cure rate ประมาณ 99% ⁽¹¹⁴⁾

Curettage alone

การใช้ electrodesiccation ในการรักษา อาจทำให้เกิด hypertrophic scar Barlow และคณะ ⁽¹¹⁵⁾ รายงานผู้ป่วย BCC 302 ราย รักษาโดย curettage อย่างเดียวมีอัตราการรอดชีวิต 5 ปี 96%

Mohs micrographic surgery

Mohs surgery ให้ผลการรักษาที่สมบูรณ์ (complete removal) และสามารถรักษาเนื้อเยื่อที่ปกติได้ (maximum conservation of tissue) Rowe และคณะ รายงาน recurrence rate ของ BCC หลังได้รับการรักษาด้วย Mohs surgery เท่ากับ 1% ในเวลา 5 ปี วิธีนี้ให้ผลการรักษาที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับวิธีอื่น excision recurrence rate 10%, curettage and desiccation 7.7% , radiation therapy 8.7% , cryotherapy 7.5% Mohs surgery เป็นวิธีการรักษาสำหรับ morpheaform BCC, poorly delineated BCC, high risk BCC, incompletely removed BCC ที่อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการ tissue conservation รวมถึงใช้การรักษา primary SCC และ recurrent SCC ด้วย

Radiation Therapy

การฉายแสงใช้สำหรับรักษา BCC และ SCC ที่ไม่สามารถรักษาด้วยวิธีผ่าตัดได้ ข้อเสียคือ ไม่สามารถควบคุมและกำหนดขอบของรอยโรคได้ (lack of margin control) ได้ผลการรักษาที่ไม่สวยงาม (poor cosmesis), ระยะเวลาการรักษานาน, เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งผิวหนังได้ในอนาคต, การฉายแสงใน BCC ทำให้เกิด high recurrence rate สูงกว่าการผ่าตัด⁽¹¹⁶⁾, แผลเป็นจากการฉายแสง การฉายแสงมักใช้เป็นการรักษาเสริม (adjuvant modality) กับการรักษาอื่น ในกรณี aggressive SCC, high-risk SCC, มี perineural involvement⁽¹¹⁷⁾

Cryosurgery

Cryosurgery สามารถใช้รักษา nonmelanoma skin cancer ได้ ข้อดีคือใช้เวลาสั้นในการรักษาและผู้ป่วยที่ไม่ต้องการผ่าตัด ภาวะแทรกซ้อนจากการรักษาด้วย cryosurgery ได้แก่ hypertrophic scar, post inflammatory pigmentary changes

Photodynamic therapy

Photodynamic therapy ใช้สำหรับรักษา actinic keratosis และมะเร็งผิวหนังขนาดเล็ก มีรายงาน high recurrent rates^(118, 119) วิธีนี้ใช้รักษา nonmelanoma skin cancer เมื่อไม่สามารถรักษาด้วยวิธีอื่นได้

Medical treatment

การรักษาด้วยยาใช้สำหรับ actinic keratosis และ superficial nonmelanoma skin cancer Topical 5- fluorouracil ใช้สำหรับรักษา actinic keratosis , superficial BCC และ SCC in situ⁽¹²⁰⁾ Topical diclofenac ใช้สำหรับรักษา actinic keratosis⁽¹²¹⁾ Imiquimod cream ใช้รักษา actinic keratosis และ low-risk nonmelanoma skin cancer⁽¹²²⁾ cure rate สำหรับ nodular BCC คือ 53% - 75% และ cure rate สูงมากขึ้นใน superficial BCC⁽¹²³⁾ นอกจากนี้ Topical imiquimod cream ยังสามารถรักษา SCC in situ ได้มีประสิทธิภาพ⁽¹²⁴⁾

การฉีด interferon - α - 2b เข้าที่รอยโรค สามารถใช้รักษา BCC ได้⁽¹²⁵⁾ การฉีด fluorouracil และ methotrexate เข้ารอยโรค สามารถใช้รักษา actinic keratosis, BCC และ SCC ได้

Combination therapy

การรักษาหลายวิธีร่วมกัน เพิ่มโอกาสการหายขาดจากโรคและลดภาวะแทรกซ้อนจากการรักษา การให้ยาทา 5-fluorouracil หรือ 5% imiquimod ก่อนการรักษา BCC ด้วย Mohs surgery จะลดขนาดของรอยโรคได้⁽¹²⁶⁾ นอกจากนี้สามารถใช้ imiquimod cream ร่วมกับ topical fluorouracil สำหรับรักษา SCC in situ ได้

Metastatic nonmelanoma skin cancer

SCC ที่บริเวณศีรษะและลำคอ สามารถแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง parotid และ cervical lymph node ได้⁽¹²⁷⁾ กรณีนี้ต้องรักษาโดยการผ่าตัดมะเร็ง, ผ่าตัดต่อมน้ำเหลือง และฉายแสงร่วมกัน กรณีที่มะเร็งมีการแพร่กระจายจำเป็นต้องได้รับยาเคมีบำบัดและควบคุมดูแลโดยแพทย์มะเร็งวิทยา (oncologists)

Retinoid prophylaxis

เรตินอยด์ใช้ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในผู้ป่วยที่มี keratoacanthoma, nevoid basal cell carcinoma syndrome และ nonmelanoma skin cancer จากการศึกษาแนะนำการใช้ acitretin มากกว่า isotretinoin เนื่องจากผลข้างเคียงน้อยกว่า การใช้ retinoid สามารถลดการเกิด SCC ได้⁽¹²⁸⁾ ควรตรวจระดับไตรกลีเซอไรด์และการทำงานของตับด้วย⁽¹²⁹⁾

Malignant melanoma (MM)⁽⁹⁷⁾

MM เป็นมะเร็งของผิวหนังที่พบน้อย แต่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างมาก เนื่องจากมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นมากกว่ามะเร็งผิวหนังชนิดอื่น ถ้าให้การวินิจฉัยที่ถูกต้องในระยะเริ่มแรกและทำการผ่าตัดจะหายได้เกือบทุกราย แต่ในรายที่เป็นมากแล้วรักษาไม่ค่อยได้ผล เพราะฉะนั้นความหวังที่จะลดอัตราการตายที่เกิดจาก MM คือ การให้การวินิจฉัยในระยะแรกเริ่ม

นิยาม

MM เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งของ melanocyte ซึ่งพบได้ในชั้นหนังกำพวด หนังกั้น เยื่อเมือก หรือแม้แต่อวัยวะภายในหรือจาก nevus cell ใน congenital หรือ dysplastic nevi

อุบัติการณ์

อุบัติการณ์ของ MM พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะหลังนี้ ประมาณกันว่าอุบัติการณ์ของ MM เพิ่มขึ้น 1 เท่าในทุก 10 ปี⁽¹³⁰⁾ ซึ่งอุบัติการณ์ของ MM ยังสูงกว่ามะเร็ง สมอง Hodgkin's disease มะเร็งของกล่องเสียง และรัยรอยด์เสียอีก แต่โชคดีที่ถึงแม้อุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้น แต่อัตราตายกลับลดลง คงเนื่องจากการให้การวินิจฉัยได้เร็วขึ้นและให้การรักษาที่ถูกต้อง ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า five year survival rate เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 49 ในปี พ.ศ. 2499 มาเป็นร้อยละ 80 ในปี พ.ศ. 2527 และสูงถึงร้อยละ 90 ในผู้ป่วยระยะที่ 1 ข้อมูลจากการศึกษารายอื่น ๆ ก็ได้ผลทำนองเดียวกัน

MM มักเกิดในวัยกลางคน อับัติการณ์สูงสุดในช่วงอายุ 20 – 60 ปี พบได้น้อยในเด็ก และถ้าเกิดมักเกิดในเด็กที่มี congenital nevocellular nevi, lentigo maligna melanoma เกิดในช่วง

อายุที่มากกว่า ตำแหน่งที่พบบ่อยที่สุดในผู้หญิงคือที่บริเวณหลังและขา ในผู้ชายมักเป็นที่บริเวณหน้าอก ท้อง และแขน

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิด MM ได้แก่

1. สีผิว ฝรั่งตาสีฟ้า ผมสีบลอนด์หรือแดง ผิวขาว
2. การตอบสนองต่อแสงแดด ผิดปกติและถูกแดดเผาได้ง่าย โดยที่ไม่เปลี่ยนเป็นสี tan (skin type I-II) จะมีความเสี่ยงมาก พบว่าการถูกแสงแดด บ่อย ๆ อย่างสม่ำเสมอมีความเสี่ยงต่อ MM น้อยกว่าการถูกแสงแดดนาน ๆ ครั้งแต่ปริมาณมาก⁽¹³¹⁾
3. มีฐานะดี
4. มีประวัติเป็น MM ในครอบครัว
5. ใฝ่มีจำนวนมากขึ้น หรือมีใฝ่ที่มีรูปร่างผิดปกติ เช่น ขนาดใหญ่ขึ้น ขอบไม่สม่ำเสมอ มีการเปลี่ยนแปลงของสี หรือมีวงขาวล้อมรอบใฝ่ (halo phenomenon)
6. มี congenital nevi หรือ dysplastic nevi

พยาธิกำเนิด

ในระยะแรกมีการแบ่งตัวของ melanocyte ในชั้น basal layer โดยอาจมีเซลล์ใดเซลล์หนึ่งที่เริ่มมีความผิดปกติเป็น MM และแบ่งตัวขยายออกในชั้นหนังกำพวดไปตาม horizontal เรียกว่า melanoma in situ ต่อไปก็เริ่มขยายลงข้างล่างไปในชั้น papillary dermis และมี lymphocyte เข้ามา ซึ่งถือว่าอยู่ใน horizontal growth phase เพราะยังไม่แพร่ กระจายไป จนกระทั่งเมื่อมีการแบ่งตัวของเซลล์ลงลึกมากขึ้นและภูมิคุ้มกันต้านทานลดลงเป็น vertical growth phase ก็จะเริ่มแพร่กระจายไปที่ lymph node และอวัยวะอื่น ๆ

ลักษณะทางคลินิก

ในปี พ.ศ. 2510 Clark ได้แบ่งชนิดของ MM ออกเป็น 3 ชนิดคือ superficial spreading melanoma, nodular malignant melanoma และ lentigo maligna melanoma ต่อมา Reed และคณะ ได้เพิ่มชนิดที่ 4 อีกคือ acral lentiginous malignant melanoma ความถี่ของการเกิด MM ทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นร้อยละ 70, 15, 5 และ 8 ตามลำดับ และมี unclassifiable อีกร้อยละ 2⁽¹³²⁾ ต่อมาพบ MM ชนิดใหม่เรียกว่า desmoplastic melanoma เป็น melanoma ที่ stroma มีลักษณะเหมือน neural หรือ fibrous tumor

1. Superficial spreading malignant melanoma พบบ่อยที่สุดในบริเวณหลังและขา มักมีลักษณะนูนเล็กน้อยกลมหรือรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 – 3 ซม. มักมีลักษณะเป็น polycyclic และมี finger – like projections ที่สำคัญคือลักษณะสีของผื่นมักมีพื้นเป็นสีน้ำตาลอ่อนขอบเข้มจนเกือบดำ เป็นบริเวณที่มีการแบ่งตัวของเนื้อออก โดยมีบริเวณสีแดง หรือชมพู ซึ่ง

เป็นบริเวณที่มีการอักเสบและมีบริเวณสีขาหรือเทาซึ่งเป็นบริเวณที่มี regression ฝิ่นมีการขยายของด้านข้างกว้างขึ้นอย่างช้า ๆ ระยะเวลาเป็นเดือน หรือหลายปีก่อนที่ตุ่มนูนเกิดขึ้น แสดงถึงว่ามี การแบ่งตัวของเซลล์ทางด้านลึก ก่อนเนื้องอกนี้อาจหายเองได้ หรืออาจเป็นแบบ amelanotic ซึ่ง เป็นการยากที่จะให้การวินิจฉัยได้ นอกจากอาศัยผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา



ภาพประกอบ 17 Superficial spreading melanoma ⁽¹³³⁾

2. Lentigo maligna melanoma เป็น melanoma ที่เกิดบนรอยโรคของ lentigo maligna เกิดในผู้สูงอายุ (เฉลี่ย 65 ปี) มักเกิดบริเวณที่ถูกแสงแดด (134) ลักษณะรอยโรคเป็นฝิ่น สีน้ำตาลแบบกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 – 6 ซม. ขอบไม่เรียบ และมีก้อนเนื้องอกสีเข้ม เกิดขึ้นบนฝิ่นดังกล่าว ทำให้ surface markings ของผิวหนังบริเวณนี้หายไป มักมีบริเวณสีขาเกิดขึ้นอันเป็นบริเวณที่เนื้องอกหายไป และเนื่องจาก MM ชนิดนี้โตช้ากว่าชนิดอื่น การพยากรณ์โรคจึงดีกว่า



ภาพประกอบ 18 Lentigo maligna melanoma ⁽¹³³⁾

3. Nodular melanoma เป็น MM ที่ร้ายแรงที่สุด เกิดได้ทุกบริเวณของร่างกาย รวมทั้ง acral area และที่ใบหน้า มีลักษณะเป็นก้อนเนื้อเกิดขึ้น และโตเร็วมากเพียงในระยะ 2 – 3 เดือน มีสีเข้มขอบชัดเจนเป็นก้อนยื่นออกมา ผิวอาจเรียบ ขรุขระ หรือแตกเป็นแผลมีเลือดออก ซึ่งบ่งบอกถึงพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และอาจมีชนิด amelanotic โดยเป็นก้อนเนื้อสีผิวธรรมดา หรือสีชมพูก็ได้



ภาพประกอบ 19 Nodular melanoma (133)

4. Acral lentiginous melanoma เป็น MM ที่เกิดที่ฝ่ามือ ฝ่าเท้า ฐานเล็บ บริเวณเย็บหู ในช่องปากและอวัยวะเพศ คนเอเชีย นิโกร หรืออเมริกัน อินเดียจะเป็น melanoma แบบนี้บ่อยที่สุด รอยโรคมีลักษณะเป็นผื่นสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ขอบไม่เรียบ โตช้า และเมื่อมีการโตทางด้านลึก จะเป็นตุ่มแตกเป็นแผลเกิดขึ้น พบได้บ่อยที่บริเวณฐานเล็บหรือตัวสร้างเล็บของนิ้วโป้งมือและเท้า โดยมักพบเป็นปื้นยาวสีน้ำตาลแดงหรือเทาที่เล็บ และมีลักษณะเฉพาะคือมีผื่นดำบริเวณ proximal nail fold เรียกว่า Hutchinson's sign และถ้าบริเวณนี้มีก้อนเนื้อดำเกิดขึ้นจะเรียกว่า Hutchinson's melanotic whitlow MM บริเวณเย็บหูเห็นเป็นผื่นสีเทาหรือน้ำตาล และในที่สุดจึงมีก้อนเนื้อเกิดขึ้น การพยากรณ์โรคของ MM ที่เย็บหูไม่ดี



ภาพประกอบ 20 Acral lentiginous melanoma (133)

5. Desmoplastic malignant melanoma เป็น melanoma ที่มี spindle shaped cells จำนวนมากในชั้นหนังแท้ เกิดได้กับทั้ง 4 ชนิดของ MM

การวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค

การให้การวินิจฉัยต้องอาศัย

1. ลักษณะทางคลินิกดังได้กล่าวมาแล้ว
2. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา
3. ผลทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ คือ immunohistochemistry ได้แก่ S-100 protein⁽¹³⁵⁾ ได้ผลบวกใน MM, melanocytic nevi แต่ก็ให้ผลบวกในมะเร็งอื่นอีกหลายชนิด จึงไม่ค่อยมีความจำเพาะนัก HMB 45⁽¹³⁶⁾ มีความจำเพาะสูงต่อ MM จะให้ผลลบได้ใน spindle cell และ desmoplastic melanoma เท่านั้น โดยปกติแล้วมักจะต้องตรวจร่วมกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ tumor markers อื่น เช่น cytokeratin, vimentin, leukocyte common antigen

การวินิจฉัยรอยโรคที่มีสีเข้มต้องตอบคำถามที่สำคัญ 3 ข้อคือ รอยโรคเป็น melanocytic lesion หรือไม่ รอยโรคเป็นไฟหรือ malignant melanoma และผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเกิด malignant melanoma หรือไม่

1. ในการพิจารณาว่ารอยโรคเป็น melanocytic lesion หรือไม่นั้น ไม่ยากนัก อาศัยรายละเอียดดังนี้

ก. รอยโรคถูกขูดออกได้ง่ายหรือไม่ ถ้าง่ายก็น่าจะเป็น seborrheic keratosis และถึงแม้ว่าอาจมีรอยโรคหลายรอยอยู่ใกล้กัน และบางรายดูเหมือนผดผื่นก็อาจเป็น irritated seborrheic keratosis หรือ melanoacanthoma

ข. รอยโรคจางลงเมื่อกดดูหรือไม่ ถ้าใช่ก็น่าจะเป็นรอยโรคของหลอดเลือด

ค. ลองบีบด้านข้าง ของรอยโรคดูว่านุ่มลงหรือไม่ ถ้าอยู่ที่ขา ขอบไม่ชัด และแข็งก็น่าจะเป็น dermatofibroma

ง. มีประวัติถูกกระแทกหรือไม่ ถ้ามีอาจเกิดจากมีเลือดออกหรือเป็น accidental tattooing

จ. เชื้อชาติก็มีความสำคัญ เช่น ในชนชาติตาสีฟ้าให้คิดถึง pigmented basal cell carcinoma น้อยกว่า แต่จะกลับกันในชนชาตินิโกรหรือ Hispanic

นอกจากนี้ มีหลายโรคที่ต้องแยกกันโดยใช้ผลชิ้นเนื้อ เช่น แยก seborrheic keratosis กับ pigmented actinic keratosis และ freckles จาก melanocytic lesion ในบริเวณที่ถูกแสงแดดมาก ๆ หรือแยก congenital melanocytic nevus จาก café au lait macules เป็นต้น

2. ในการแยกระหว่างไฝกับ malignant melanoma อาศัยกฎ ABCD ดังนี้

- A = asymmetry
- B = border (irregular border)
- C = color (irregular color)
- D = diameter (> 6 mm)

3. ในผู้ป่วยบางโรค เช่น xeroderma pigmentosum ต้องแนะนำผู้ป่วยเรื่องการระวังแสงแดด และสิ่งแวดล้อม การใช้ยากันแดดตั้งแต่เด็ก หรือผู้ป่วย dysplastic nevus syndrome จะต้องดูแลผู้ป่วยใกล้ชิด เป็นต้น

การรักษาและการพยากรณ์โรค

การวางแผนการรักษา MM ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การ staging ของผู้ป่วย การพยากรณ์โรคของผู้ป่วยขึ้นกับหลายปัจจัยด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยระยะที่ 1 นั้น ความหนาของเนื้องอกมีส่วนสำคัญมาก Clark⁽¹³⁷⁾ ได้แบ่ง level ของเนื้องอกไว้ดังนี้

Level I เซลล์เนื้องอกอยู่เฉพาะในชั้นหนังกำพร้าเรียกว่า melanoma in situ

Level II เซลล์เนื้องอกขยายลงมาในชั้น papillary dermis แต่ยังไม่เต็ม

Level III เซลล์เนื้องอกแบ่งตัวขยายจนเต็มชั้น papillary dermis แต่ยังไม่เข้า reticular dermis

Level IV เซลล์เนื้องอกแบ่งตัวเข้าไปใน reticular dermis

Level V เซลล์เนื้องอกแบ่งตัวจนเต็มชั้นหนังแท้และเข้าไปใน subcutaneous fat

ปัญหาของ Clark's level คือบางครั้งเป็นการยากที่จะแบ่ง เช่น เป็นการยากที่จะแบ่ง papillary กับ reticular dermis และที่สำคัญคือ จุดที่มีการเปลี่ยนแปลงจาก horizontal มาเป็น vertical growth นั้น Clark ไม่ได้นิยามไว้ ซึ่งน่าจะอยู่ในระหว่าง level II และ III

Breslowได้แนะนำให้ใช้ความหนาของเนื้องอกในการช่วยบอกการพยากรณ์โรคไว้ในปี พ.ศ. 2522 เขาวัดความหนาของเนื้องอกโดยใช้ ocular micrometer วัดเป็นมิลลิเมตรจากชั้น granular layer จนถึงจุดที่ลึกที่สุดของเนื้องอก เนื้องอกที่มีความหนาน้อยกว่า 0.75 มม. survival rate เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความหนาของก้อนเนื้องอกมีความสำคัญมากที่สุดในการบอกพยากรณ์โรคของผู้ป่วย MM ระยะที่ 1⁽¹³⁸⁾

วัฏจักรเซลล์ (Cell Cycle) ⁽¹³⁹⁾

วัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) เป็นวงจรที่ประกอบด้วยระยะต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงผ่านระยะเหล่านั้นจากการแบ่งเซลล์ครั้งหนึ่ง แล้วเคลื่อนผ่านไปยังการแบ่งเซลล์ครั้งถัดไป ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ถ้ามีความผิดปกติในการควบคุม หรือสูญเสียการควบคุมวัฏจักรเซลล์ ทำให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ผิดปกติไป หรือเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมต่าง ๆ รวมทั้งโรคมะเร็ง

ระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรเซลล์ (Phases of cell cycle)

การแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) เป็นกระบวนการที่ทำให้ได้เซลล์ใหม่จากการแบ่งตัวของเซลล์ที่มีอยู่เดิม เซลล์เดิมที่ดำเนินการแบ่งเซลล์จะมีการเตรียมความพร้อมโดยการตรวจสอบสภาพเซลล์ และจำลอง chromosome ขึ้นมาอีกชุด เรียกเซลล์เดิมก่อนการแบ่งเซลล์นี้ว่า mother cells หรือ parent cells เซลล์ใหม่ที่ได้จากการแบ่งตัวของเซลล์ เรียก daughter cells โดยเซลล์ใหม่ทั้ง 2 เซลล์นี้มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

Cell cycle สามารถแบ่งออกได้เป็นระยะ M phase และ interphase

- M phase ประกอบด้วย mitosis และ cytokinesis

Mitosis เป็นกระบวนการจำลองสังเคราะห์ DNA ของ chromosome เพื่อทำการแบ่งให้ได้ 2 nuclei ซึ่งมีลักษณะเป็น diploid ($2n$)

Cytokinesis เป็นกระบวนการที่เซลล์เดิม (2 nuclei) แบ่งตัวให้ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ เซลล์ใหม่ที่ได้นี้มี 1 นิวเคลียส และ organelles ที่เหมือนกันกับเซลล์เดิม

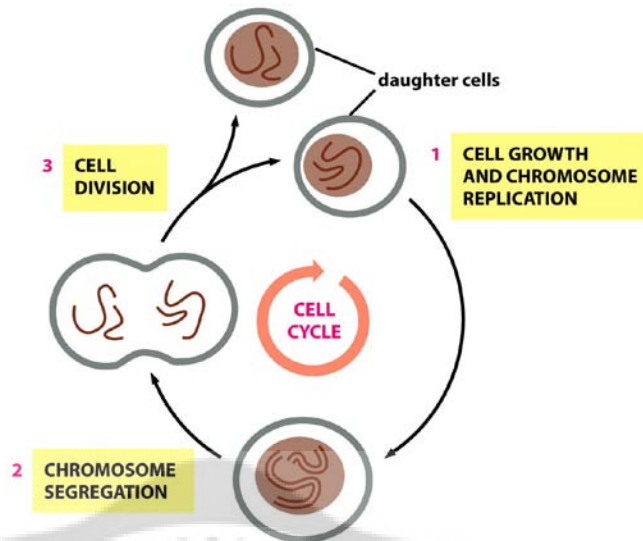


Figure 17-1 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 21 การแบ่งเซลล์ให้ได้เซลล์ใหม่ในวัฏจักรเซลล์ ⁽¹⁴⁰⁾

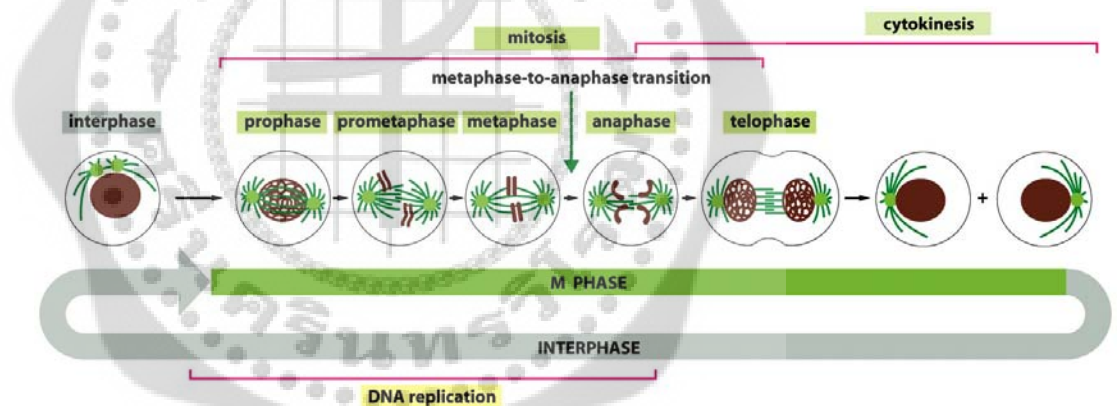


Figure 17-3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 22 การแบ่งเซลล์ให้ได้เซลล์ใหม่ในวัฏจักรเซลล์ ⁽¹⁴⁰⁾

- Interphase ประกอบด้วยระยะ G1 ระยะ S และระยะ G2 โดยสรุป cell cycle แบ่งออกได้เป็น 4 phase
 1. G1 phase (GAP 1) ระยะเตรียมการก่อนสังเคราะห์ DNA และสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการแบ่งตัวของเซลล์
 2. S phase (Synthesis) ระยะการสังเคราะห์ DNA และสร้างสารที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ทำให้ได้ sister chromatids
 3. G 2 phase (GAP 2) ระยะเตรียมการก่อนที่จะเข้าสู่ระยะ mitosis

4. M phase (Mitosis) ระยะเวลา mitosis มีการแบ่งตัวเกิดขึ้น คือ มีการแบ่ง nucleus และแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 เซลล์

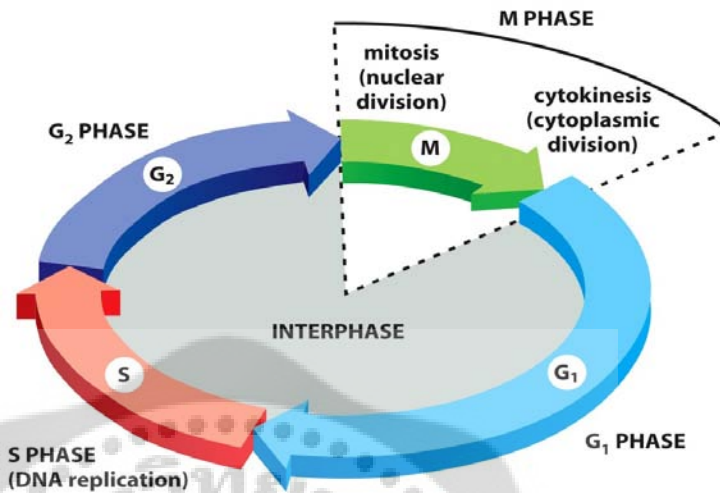
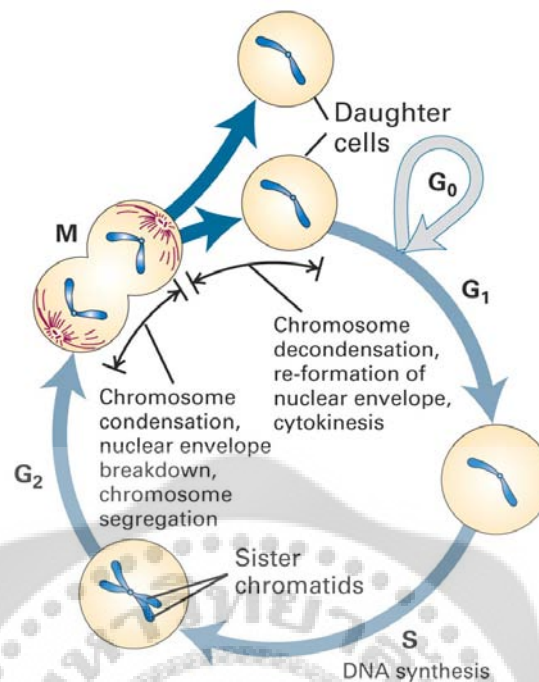


Figure 17-4 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 23 ระยะเวลา interphase ประกอบด้วย ระยะเวลา G₁ ระยะเวลา S และระยะเวลา G₂ ⁽¹⁴⁰⁾

ระยะเวลาทั้ง 4 phase เกิดขึ้นตามลำดับ และต้องเกิดขึ้นทุกระยะจนครบวงจร ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวน ในที่สุด ในบางสภาวะหรือเซลล์บางชนิด เซลล์ไม่มีการแบ่งตัว นั่นคือ เซลล์ออกจาก cell cycle แล้วเข้าอยู่ในระยะ G₀ phase หรือเรียกว่า quiescence (นิ่ง , เงียบสงบ) เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเซลล์ตัวแก่บางประเภทอยู่ในระยะ G₀ และไม่กลับเข้ามาใน cell cycle อีก โดยดำเนินหน้าที่ของเซลล์จนกระทั่งตายไป เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte บางครั้งอยู่ในระยะ G₀ เซลล์เหล่านี้เมื่อไปพบและจับกับ antigen ที่เหมาะสมก็สามารถกลับเข้ามาสู่ cell cycle ได้อีก



ภาพประกอบ 24 เซลล์ออกจาก cell cycle อยู่ในระยะ G₀ เซลล์ที่อยู่ในระยะนี้เรียกว่า quiescence ⁽¹⁴¹⁾

การแบ่งตัวของเซลล์ มีความสำคัญในการทดแทนเซลล์ที่สูญเสียหรือถูกทำลายไป และมีความสำคัญในการดำรงสืบทอดเผ่าพันธุ์ รวมทั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้ากล่าวถึงความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ประเภทหลัก

1. เซลล์ที่ได้เจริญเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเซลล์ปลายทาง ซึ่งทำหน้าที่เฉพาะ (highly specialized cell) และสูญเสียความสามารถ ในการแบ่งตัว เช่น เซลล์ระบบประสาท เซลล์กล้ามเนื้อบางชนิด เซลล์เม็ดเลือดแดง
2. เซลล์ที่ปกติไม่แบ่งตัว แต่สามารถถูกชักนำให้สังเคราะห์ DNA และแบ่งตัวได้เมื่อถูกกระตุ้น เช่น เซลล์ตับ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte
3. เซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวในระดับสูงเมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์อื่น เช่น เซลล์ในระบบสืบพันธุ์ (gonial cell) เซลล์ตั้งต้นในระบบเลือด (hematopoietic stem cell) ในไขกระดูกเซลล์มีการสร้างเม็ดเลือดและแบ่งตัวตลอดเวลา

สรุป phase ต่าง ๆ ใน cell cycle ⁽¹³⁹⁾

G0	เซลล์นิ่งสงบ “quiescence” เซลล์ไม่มีการแบ่งตัวหรือเพิ่มจำนวน	
G1	เซลล์เจริญและดำเนินเมแทบอลิซึมปกติ มีการเตรียมการจำลอง organelles ต่าง ๆ	
S	มีการสังเคราะห์ DNA และจำลอง chromosome ขึ้นมาอีก 1 ชุด พบ sister chromatids	
G2	เซลล์เจริญและเตรียมกระบวนการ mitosis Chromosome ขดตัว รวมตัวกันแน่น	
M	เซลล์มีการแบ่งสารพันธุกรรมในนิวเคลียส ระยะเวลาแบ่งย่อยได้เป็น 5 ระยะเวลา Prophase, prometaphase, metaphase, anaphase, telophase เซลล์มีการแบ่งนิวเคลียสออกเป็น 2 (karyokinesis) และแบ่งเซลล์ได้ 2 daughter cells (cytokinesis)	5

การแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (Phases of mitosis)

สามารถจำแนกออกเป็น phase ต่าง ๆ ตามลักษณะของเซลล์ทางชีววิทยาที่สังเกตเห็น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ดังนี้

1. Interphase เป็นช่วงระยะระหว่างที่เซลล์มีการแบ่งตัวในแต่ละครั้ง เซลล์ใช้เวลาส่วนใหญ่ของ Cell cycle อยู่ในระยะนี้ นั่นคือรวม G1 S และ G2 ทั้งหมดใน interphase ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์พบเซลล์มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เห็นขอบเขตนิวเคลียสชัดเจน เนื่องจากเยื่อหุ้มนิวเคลียสติดสีเข้ม พบ nucleolus ชัด โครโมโซมกระจัดกระจายไม่ขดรวมตัวกัน ในไซโตพลาซึม พบว่ามีการจำลองตัวของ centrosome ออกเป็น 2 centrioles

2. Prophase โครโมโซมเส้นบางและยาวใน early prophase จะหนาขึ้นพร้อมกับสั้นลง ยังคพบเยื่อหุ้มนิวเคลียสสมบูรณ์ดี centrosome ทั้งสองแยกออกจากกัน และมีการรวมตัวสร้างเส้นใย spindle fiber ออกมาจากศูนย์กลางทั้งสองของ centrosome (MTOC, microtubule organizing center)

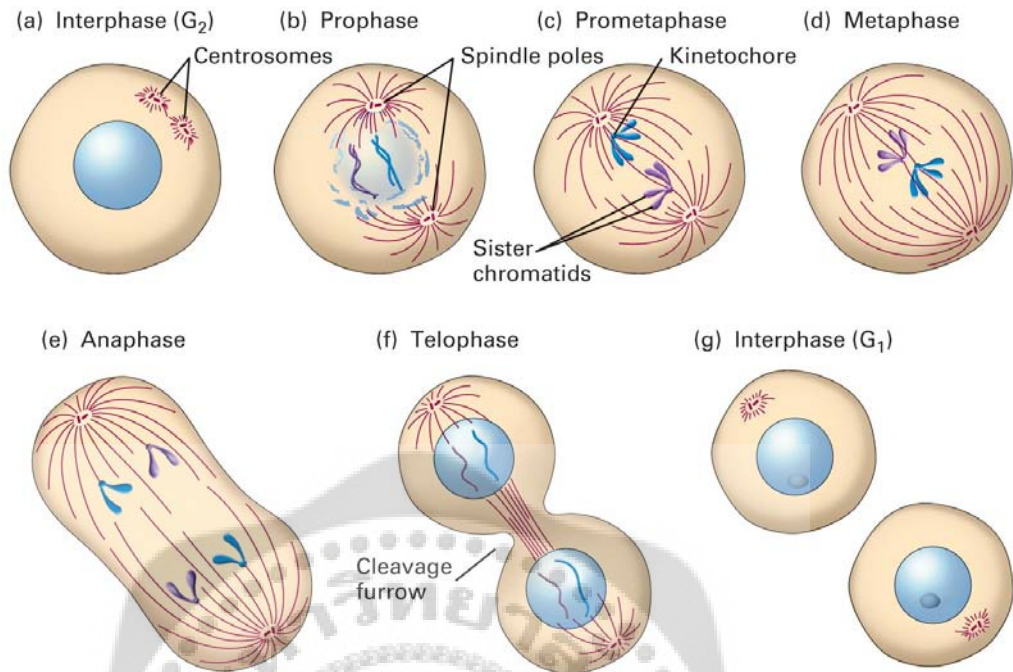
3. Prometaphase ระยะเวลาที่เยื่อหุ้มนิวเคลียสค่อย ๆ สลายตัวเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ดึงเส้นใย mitotic spindle (ที่เกิดจากการรวมตัวกับขั้วของ microtubule ออกมาจาก centrosome สองขั้วที่อยู่ตรงข้ามกัน) เข้ายึดจับโครโมโซม (ซึ่งหดสั้นและหนาตัวขึ้น) ที่บริเวณ kinetochore

4. Metaphase เยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายตัวอย่างสมบูรณ์ โครโมโซมจัดเรียงตัวอยู่ในแนวกึ่งกลางระหว่างขั้วของ spindle ระยะเวลาเห็น spindle fiber ชัดเจน โครโมโซมหนาและสั้นชัดเจน จึงเหมาะต่อการศึกษาโครโมโซม โดยทำ karyotype ระยะเวลาเส้นใย spindle fiber ที่เข้าจับโครโมโซมบริเวณ kinetochore (kinetochore microtubule) ยึดจับ sister chromatids เพื่อเตรียมแยก chromatid ออกไปยังขั้วตรงข้าม

5. Anaphase ระยะเวลา sister chromatid แยกตัวออกจากกันไปยังขั้วของเส้นใย spindle ทำให้ได้สอง daughter chromosomes เส้นใย kinetochore microtubule หดสั้นลงเพื่อดีง daughter chromosomes ออกจากกัน

6. Telophase เป็นระยะสุดท้ายของการแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis โดย daughter chromosomes มาอยู่ที่ขั้วทั้งสองข้างของเส้นใย spindle และเริ่มมีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสรวมกันชัดขึ้น โครโมโซมยึดตัวคลายออก แล้วเริ่มมีการสร้างเป็นวงของ contractile ring บนเยื่อหุ้มเซลล์ ระยะเวลาที่มีการสร้างจำลอง organelle ภายในไซโตพลาซึม เช่น golgi complex และ endoplasmic reticulum ขึ้นด้วย

- Cytokinesis เป็นกระบวนการต่อจากนั้นในขั้นสุดท้าย เซลล์ก็จะดำเนินการแบ่งตัวอย่างสมบูรณ์ โดยมีการแบ่งไซโตพลาซึม ซึ่งมี microfilament มาเกาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ บริเวณนิวเคลียสทั้งสองตรง contractile ring เมื่อ microfilament หดตัว จะดึงให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นร่องรอบ ๆ กึ่งกลางเซลล์ เรียกว่า cleavage furrow เกิดเป็นรอยคอดค่อย ๆ มาขึ้นแล้วขาดจนเกิดเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ใหม่ในที่สุด



ภาพประกอบ 25 ลักษณะของเซลล์ในระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ⁽¹⁴¹⁾

- วัฏจักรเซลล์สามารถวัดตรวจสอบได้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์

การดำเนินไปใน cell cycle ตรวจสอบได้โดยวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) ขั้นตอนประกอบด้วย การย้อมด้วยสีย้อม fluorescence โดยเข้าจับกับ DNA ดังนั้น ปริมาณของแสง fluorescence เป็นสัดส่วนกับปริมาณของ DNA แล้วทำการแปลผลด้วยการเขียนกราฟระหว่างสัดส่วนปริมาณเปรียบเทียบของ DNA ต่อเซลล์ (แกน X) ซึ่งทราบได้จากความเข้มข้นของแสง fluorescence ที่วัดได้ แกน Y แสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่นับได้ว่ามีมากน้อยเท่าไร

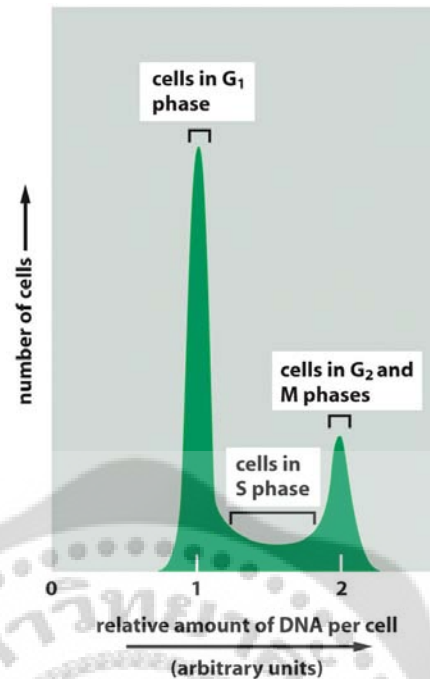


Figure 17-13 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 26 การประเมินจำนวนเซลล์ในระยะเวลาต่างๆของวัฏจักรของเซลล์โดยเทียบสัดส่วน DNA ต่อเซลล์⁽¹⁴¹⁾

เซลล์ที่อยู่ในระยะ G₁ ซึ่งยังไม่มีการสังเคราะห์ DNA วัดสัดส่วน DNA (ความเข้มแสง fluorescence) ได้เท่ากับ 1 (n) ในขณะที่เซลล์ระยะ G₂ และ M ซึ่งมีการสังเคราะห์ DNA เสร็จแล้วมีปริมาณสัดส่วน DNA เป็น 2 เท่า (2n) ส่วนเซลล์ระยะ S ขณะดำเนินการสังเคราะห์ DNA อยู่ระหว่าง G₁ กับ G₂ จึงมีปริมาณ DNA มากกว่าเดิมแต่น้อยกว่า 2 เท่า

การควบคุมวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle control)

ระบบควบคุมวัฏจักรของเซลล์มีหน้าที่ตรวจสอบขั้นตอนหลักของ Cell cycle ในการสังเคราะห์ DNA การรวมตัวสร้างเส้นใย mitotic spindle การแบ่งตัวแบบ mitosis และการแบ่งตัวเซลล์ออกเป็นสองเซลล์ ดังนั้น การที่เซลล์ดำเนินไปครบวงจรได้ จำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบเพื่อป้องกันและกำจัดเซลล์ที่ไม่พร้อม เซลล์ที่เสียหายหรือมีความผิดปกติของสารพันธุกรรม ไม่ให้เข้าสู่ขั้นตอนต่างๆของ Cell cycle เรียกรวมการควบคุมและตรวจสอบนี้ว่า cell cycle control หรือ checkpoint ระบบควบคุมตรวจสอบดังกล่าวนี้สามารถหยุด (arrest) เซลล์ที่ผิดปกติไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของ cell cycle จนกระทั่งได้รับการซ่อมแซมแก้ไขสารพันธุกรรมหรือสภาวะให้เป็นปกติก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ระยะถัดไปแล้วแบ่งเซลล์ในที่สุด ถ้าความผิดปกติหรือ

ความเสียหายของเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมแก้ไขได้ ก็จะถูกนำเข้าไปสู่กระบวนการ program cell death หรือ apoptosis

Cell cycle control ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณจุดระยะต่อของแต่ละระยะดังนี้

G1/S checkpoint

G2/M checkpoint

Metaphase checkpoint

ตัวอย่างของระบบตรวจสอบ checkpoint เช่น เมื่อ DNA ถูกทำลายเสียหายไป ระบบ checkpoint นี้คอยป้องกันมิให้เซลล์ในระยะ G1 ผ่านเข้าสู่ระยะ S และป้องกันมิให้เซลล์ในระยะ G2 เข้าสู่ระยะ M (G1 และ G2 arrest) จนกระทั่งความเสียหายนั้นได้รับการแก้ไข cell cycle จึงจะดำเนินต่อไปได้ ถ้าเซลล์ที่ไม่มีการสังเคราะห์จำลอง DNA ก็จะไม่สามารถเข้าสู่ระยะ mitosis (G2/M checkpoint) หรือ ถ้ามีความบกพร่องในการรวม ตัวสร้างเส้นใย spindle fiber ทำให้ spindle fiber ไม่สามารถจับกับโครโมโซมได้ ก็จะไปมีผลยับยั้งการเข้าสู่ระยะ anaphase (metaphase checkpoint)

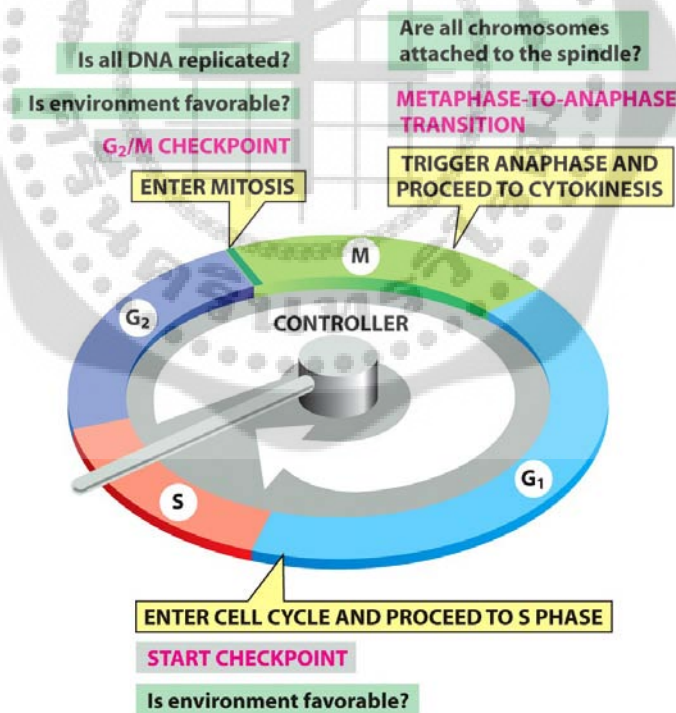


Figure 17-14 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 27 การควบคุมวัฏจักรเซลล์ที่จุดตรวจสอบ G₁/S G₂/M และ metaphase checkpoint ⁽¹⁴⁰⁾

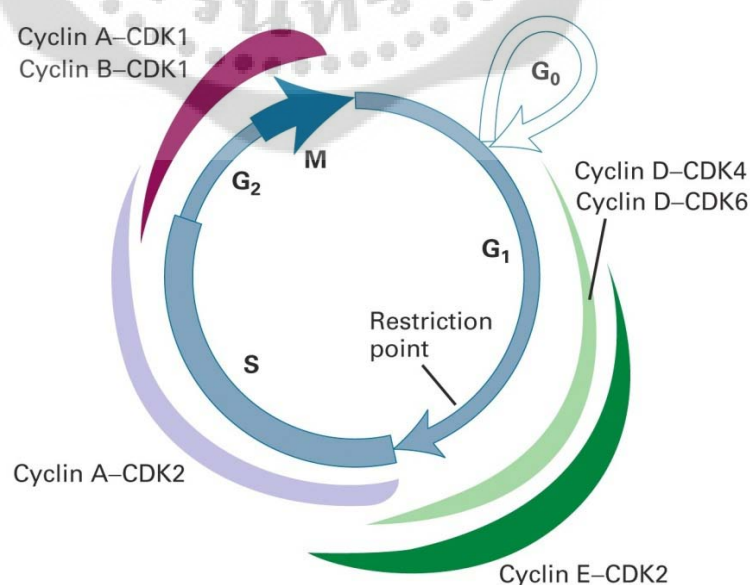
การเคลื่อนที่ผ่านระยะต่าง ๆ ใน cell cycle นั้นดำเนินไปได้ด้วยกลไกการทำงานของ โปรตีน 2 หน่วยย่อย (subunit) ที่ต่างกันรวมกันเป็นสารเชิงซ้อนในไซโตพลาซึมของเซลล์ (heterodimeric protein complexes) โปรตีน 2 หน่วยย่อยนั้น คือ cyclin และ Cdk

1. Cyclin เป็นโปรตีนหน่วยย่อยคอยควบคุมการดำเนินไปในระยะต่าง ๆ ของ cell cycle จึงเรียกว่าเป็น regulatory subunit ระดับของ cyclin ขึ้น / ลง ในแต่ละระยะของ cell cycle มีผลต่อการทำงานของ kinase activity กล่าวคือ ถ้าระดับของ cyclin ต่ำ มีผลทำให้ kinase activity ไม่ถูกกระตุ้น แต่ถ้าระดับของ cyclin สูงขึ้น ยังผลทำให้ไปกระตุ้น kinase activity ในที่สุด เซลล์สามารถเคลื่อนเข้าสู่ M phase

2. Cyclin – dependent kinases (Cdk) เป็นโปรตีนหน่วยย่อยสำหรับเร่งปฏิกิริยาใน cell cycle โดยต้องอาศัย cyclin จึงจะทำงานได้ และเนื่องจากเป็นโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ phosphate ให้กับสารตั้งต้น (substrate) ดังนั้นจึงได้ชื่อตามหน้าที่ของโปรตีนว่าเป็น cyclin - dependent kinases

การเปลี่ยนแปลงเป็นวงจรของ cyclin โดยการรวมตัวกันระหว่าง cyclin กับ cdk ชนิดต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนเชิงซ้อน 2 หน่วยย่อยของ cyclin – cdk complexes ซึ่งไปมีผลทำให้เกิดเหตุการณ์ต่าง ๆ ในแต่ละระยะของ cell cycle

โปรตีน cyclins ประกอบด้วย cyclin D , cyclin E , cyclin A และ cyclin B ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญ โดย cyclin D , cyclin E พบมากใน G₁ phase ส่วน cyclin A พบมากใน S phase ในขณะที่ cyclin B พบมากใน G₂ และ M phase



ภาพประกอบ 28 การรวมตัวกันของ cyclin-Cdk complex ในวัฏจักรเซลล์⁽¹⁴¹⁾

การควบคุมการทำงานของ Cdk (Regulation of Cdk activity)

Cell cycle จะดำเนินไปได้จนครบวงจรเมื่อ cyclins ต้องจับกับ Cdk เพื่อกระตุ้นเอนไซม์ Cdk ให้อยู่ในสภาพตื่นตัว กลไกควบคุมการทำงานของ Cdk แบ่งออกเป็น การกระตุ้น และการยับยั้ง

1. Activation การกระตุ้นการทำงานของ Cdk ถูกควบคุมโดย cyclin พบว่าการที่ cyclin เข้าจับกับ Cdk มีผลทำให้ Cdk อยู่ในสภาพตื่นตัวเพียงบางส่วนและสามารถตื่นตัวเต็มที่เมื่อมีเอนไซม์ CAK (Cdk - activating kinase) เข้าเติมหมู่ phosphate ให้ cyclin - cdk complexes จึงอยู่ในสภาพถูกกระตุ้นอย่างเต็มที่ในที่สุด

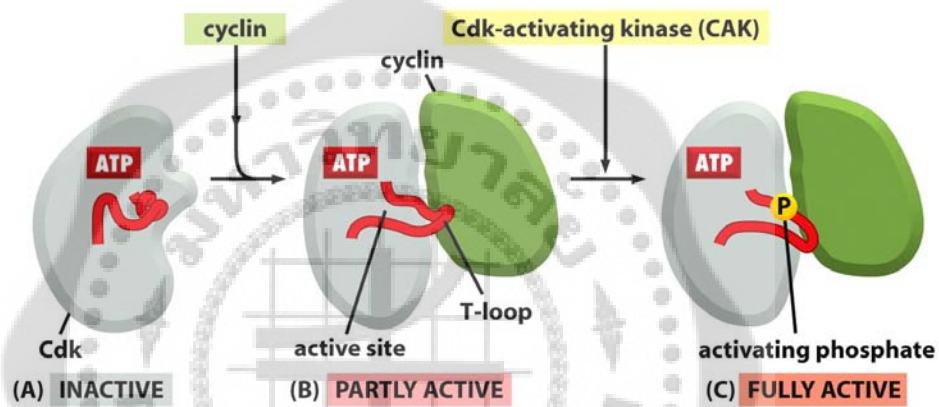
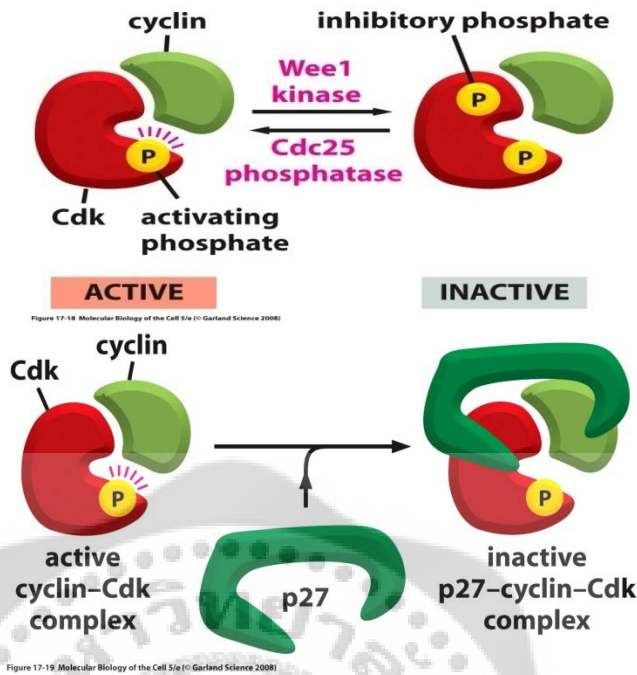


Figure 17-17 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 29 กลไกการกระตุ้นการทำงานของ Cdk โดย Cyclin รวมเป็น cyclin-Cdk complex ⁽¹⁴⁰⁾

2. Inhibition การยับยั้งการทำงานของ cyclin - Cdk complex ถูกควบคุมโดยโปรตีน Wee1 และ CKI (Cdk inhibitor) Wee1 เป็นเอนไซม์ kinase ทำหน้าที่เติมหมู่ phosphate ให้กับ cyclin - Cdk complex เข้าที่ตำแหน่ง inhibitory phosphate site ซึ่งมีผลไปรบกวนตำแหน่ง active site ยังผลให้ไปยับยั้งการทำงานของ cyclin - Cdk complex activity ในทางกลับกัน Cdc25 เป็นเอนไซม์ phosphatase ทำหน้าที่ดึงหมู่ phosphate ออกจากตำแหน่ง inhibitory site ดังนั้น Cdc25 จึงมีผลทำให้ cyclin - Cdk complex activity กลับมาอยู่ในสภาพตื่นตัว



ภาพประกอบ 30 การควบคุมการทำงานของ cyclin-Cdk complex activity

A) การควบคุมด้วย Wee1 kinase และ Cdc25 phosphatase B) การควบคุมด้วย CKI เช่น p27⁽¹⁴⁰⁾

นอกจากนี้ CKI (Cdk inhibitor) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ Cdk activity โดยเข้าจับกับ cyclin - Cdk complex แล้วไปทำลาย active site ของ Cdk โปรตีนที่จัดเข้าอยู่ในกลุ่มของ CKI ที่สำคัญได้แก่ p16 p21 และ p27

การควบคุมการทำงานของ cyclin-Cdk complex พอสรุปได้ โดยยกตัวอย่าง M - cyclin และ Cdk รวมกันเป็น complex ที่เรียกว่า M - Cdk ซึ่งมีความสำคัญต่อการเข้าสู่ระยะ mitosis โดยมีผลต่อการสลายตัวของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear envelop breakdown) และการรวมตัวสร้างเส้นใย spindle fiber เพื่อเข้าจับกับโครมาโซม active M - Cdk สามารถควบคุมการกระตุ้นตัวเองโดยการไปยับยั้ง Wee 1 และโดยการเกิดการตอบสนองย้อนกลับเชิงบวก (positive feedback) โดยเติมหมู่ phosphate ให้กับ Cdc 25 ทำให้ Cdc 25 อยู่ในรูป active phosphatase ทำงาน จึงสรุปได้ว่า ทั้งการยับยั้ง Wee1 และการกระตุ้น Cdc25 ของ M - Cdk ส่งผลเพื่อให้ M - Cdk อยู่ในสภาพที่ถูกกระตุ้นมากยิ่งขึ้น

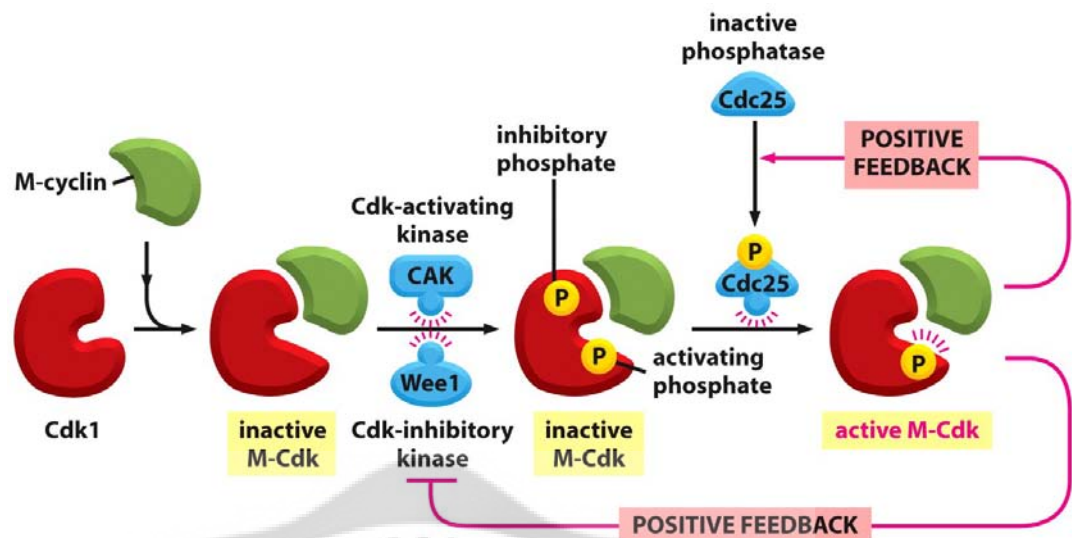


Figure 17-25 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 31 สรุปการควบคุม cyclin-Cdk complex activity โดยการตอบสนอง
ย้อนกลับเชิงบวก⁽¹⁴⁰⁾

นอกจากการกระตุ้นและการยับยั้งกลไกการควบคุมการทำงานของ cyclin-Cdk activity สามารถถูกควบคุมโดยกระบวนการ ubiquitination โดยอาศัยโปรตีน ubiquitin ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สามารถเติมสายยาวของ ubiquitin (multiubiquitin chain) ให้กับโปรตีนเป้าหมาย (target proteins) ทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนเป้าหมายเหล่านั้นโดย proteasome ดังนั้น M-cdk ถูกควบคุมโดยการเกิด ubiquitination ที่ต้องอาศัยโปรตีน APC (anaphase-promoting complex) คอยนำทางให้เกิดการต่อสายยาว polyubiquitin chain เข้ากับ mitotic cyclin และ securing ยังผลให้เกิดการสลายตัวของ M-cyclin และ securing ในที่สุด ผลของการทำลาย securing ทำให้ separase ถูกกระตุ้นซึ่งจะไปตัดและย่อยสลาย cohesin ส่งผลให้ sister chromatid แยกทางออกจากกันในระยะ anaphase

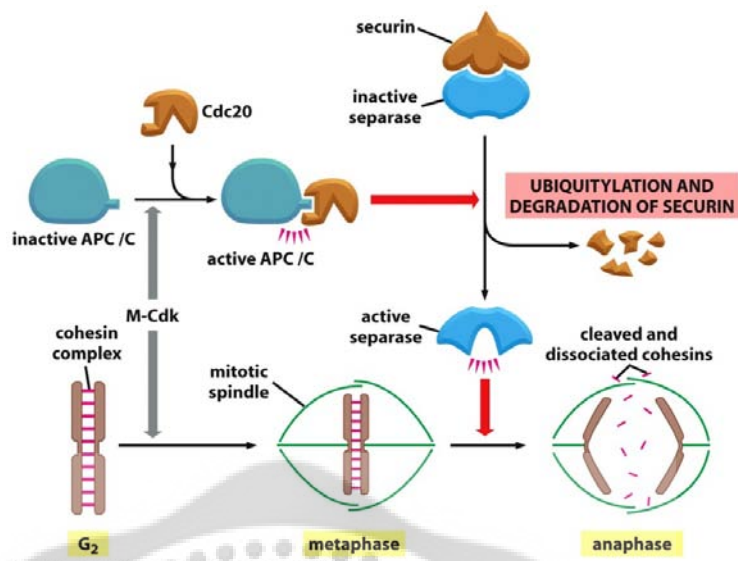
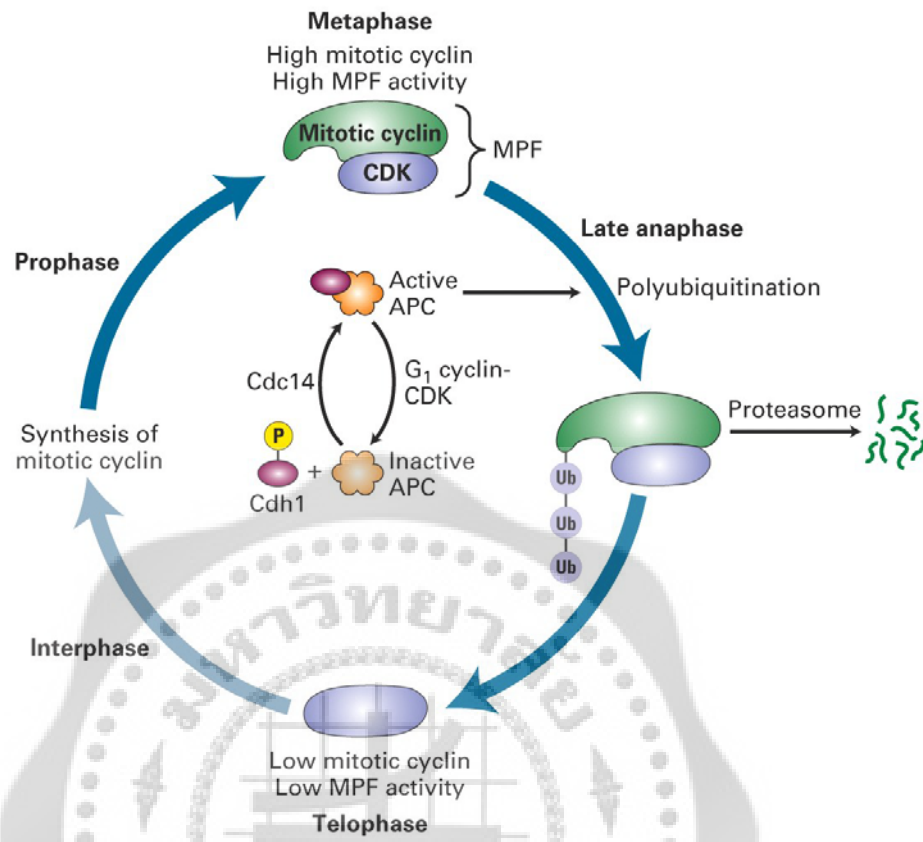


Figure 17-44 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 32 การควบคุม cyclin-Cdk activity โดยกระบวนการ ubiquitination ⁽¹⁴⁰⁾

กล่าวโดยสรุป การควบคุมการทำงานของ cyclin-Cdk activity ในระยะต่างๆของ cell cycle ตั้งแต่ interphase ถึง telophase ซึ่งเกี่ยวข้องกับ APC โดยที่ในระยะ metaphase พบว่า M-cyclin มีปริมาณสูงรวมกับ Cdk อยู่ในรูปของ M-Cdk หรือเรียกกันว่า maturation promoting factor (MPF) ซึ่งมี activity สูงในระยะ metaphase นี้เมื่อเข้าสู่ late anaphase โปรตีน APC ที่ถูกกระตุ้นจะช่วยนำทางการเกิด polyubiquitination และการสลายตัวของ M-cyclin ส่งผลให้การ ทำงานของ MPF activity ลดต่ำลงในระยะ telophase และออกจาก mitosis ในที่สุด

โดยภาพรวมของ phase ต่างๆของ cell cycle ตั้งแต่ G₁ S G₂ และ M พบว่ามีการเข้าร่วมของ cyclin-Cdk complex ที่จำเพาะในแต่ละ phase ในการขับเคลื่อนผ่านจาก phaseหนึ่งไปยังอีก phase หนึ่ง โดยอาศัยโปรตีนเชิงซ้อนที่สำคัญใน phase ต่างๆ การที่เซลล์จะเคลื่อนผ่าน ออกจากระยะ mitosis ได้นั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่ M-Cdk ต้องอยู่ในสภาพไม่ถูกกระตุ้น (M-Cdk inactivation)



ภาพประกอบ 33 Anaphase promoting complex ควบคุมการสลายตัวของ M-cyclin⁽¹⁴¹⁾

โปรตีนควบคุมวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle regulatory proteins)

1. การควบคุมการดำเนินไปของระยะ G1 phase เพื่อไปสู่ระยะ S phase

เมื่อเซลล์อยู่ในระยะใดจำเป็นต้องมีโปรตีน cyclin - Cdk complex ในระยะนั้นถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่และเมื่อจะผ่านออกจากระยะนั้น activity ของ cyclin - Cdk complex ก็จะลดลงอยู่ในสภาพไม่ถูกกระตุ้น ในระยะ G1 phase พบว่ามีโปรตีนที่เกี่ยวข้อง คือ Rb (retinoblastoma protein) และ E2F protein เริ่มจาก active G1 - Cdk สามารถเติมหมู่ phosphate ให้กับ Rb ทำให้ Rb อยู่ในสภาพไม่ถูกกระตุ้นจึงปล่อย E2F เป็นอิสระ เมื่อ E2F เป็นอิสระจะ active จึงส่งผลให้กระตุ้นยีนต่าง ๆ ใน S phase เกิดกระบวนการ transcription และกระตุ้นโปรตีนตัวอื่นในระยะถัดไป ในที่สุดจึงเกิดการสังเคราะห์ DNA ในระยะ S phase

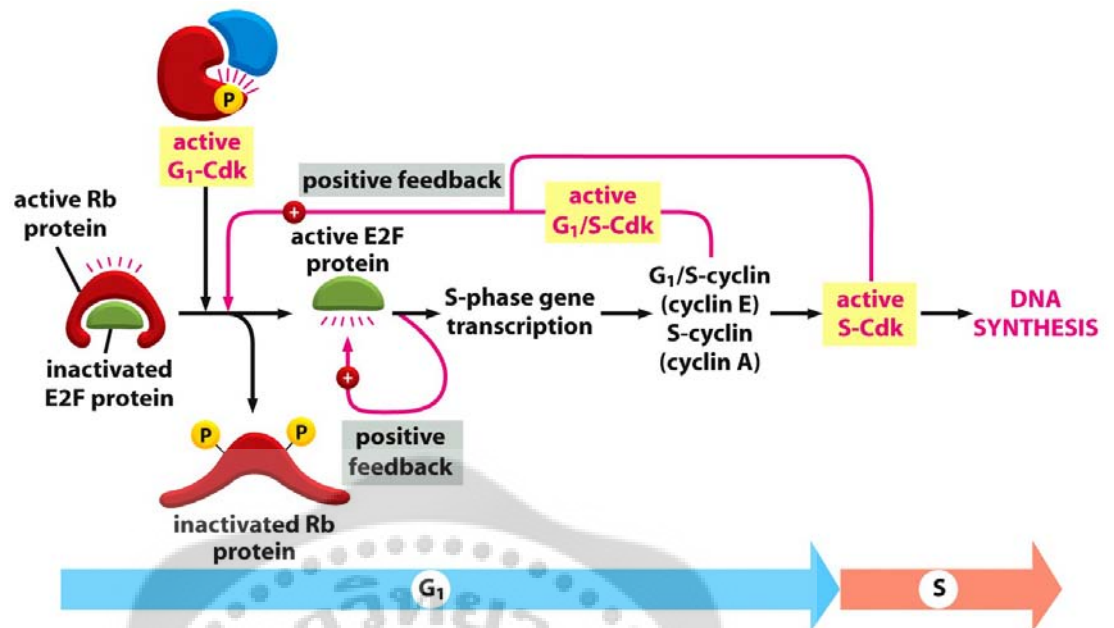


Figure 17-62 part 3 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 34 การควบคุมการดำเนินไปในระยะ G1 phase เพื่อเข้าสู่ระยะ S phase⁽¹⁴⁰⁾

โปรตีน Rb (Retinoblastoma protein)

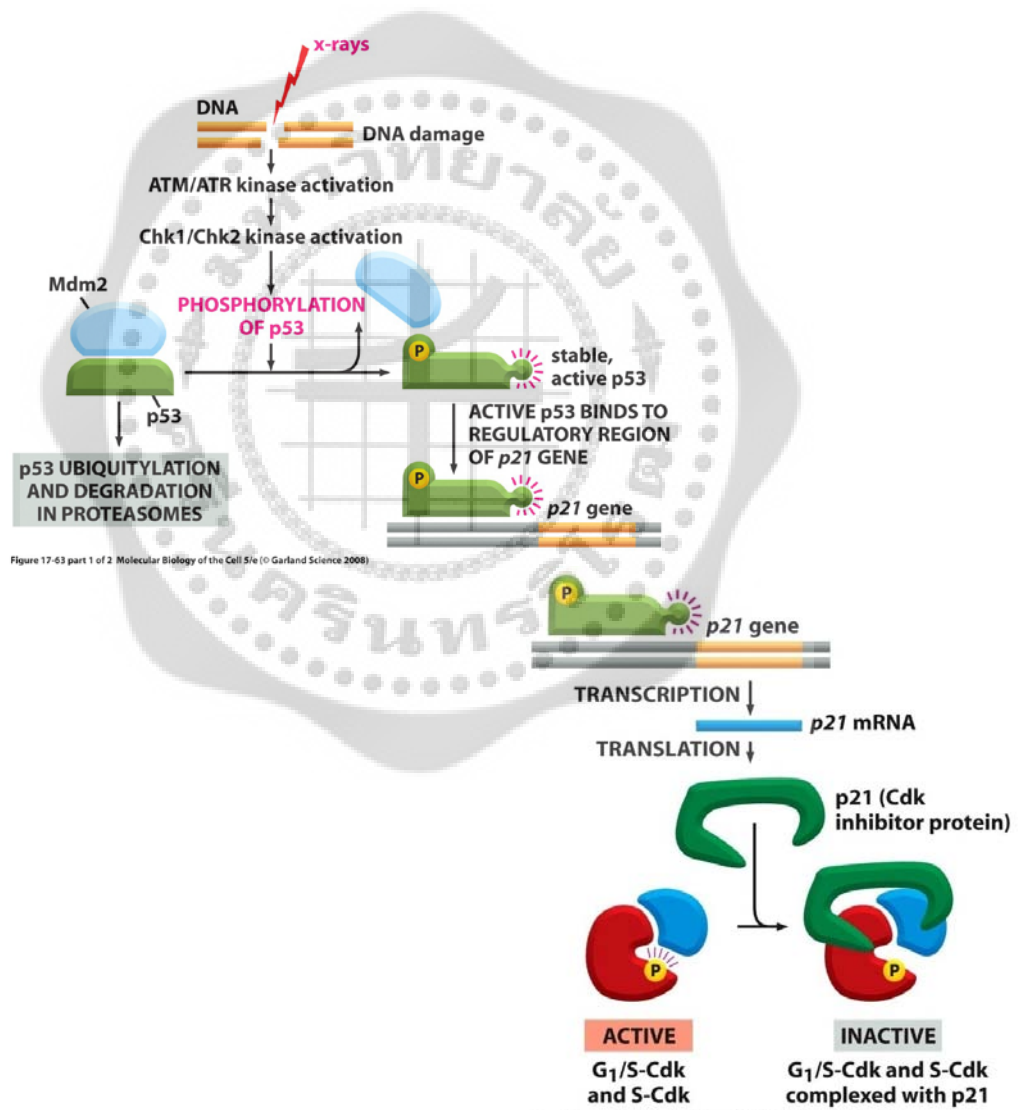
Rb (Retinoblastoma protein) เป็นโปรตีนที่มาจากยีน retinoblastoma ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเกิดโรคมะเร็งจอประสาทตา และจัดว่าเป็นยีนต้านมะเร็งยีนหนึ่งที่สำคัญ (tumor suppressor gene) Rb เป็นโปรตีนควบคุมครอบจักรวาล (universal regulator) ที่สำคัญใน cell cycle ใน ระยะ G1 phase โปรตีน Rb มีหน้าที่จับโปรตีน E2F ซึ่งควบคุมการทำงานของยีนอื่นในการ ถอดรหัส (transcription factor) ไม่ให้ทำงาน เมื่อมีสัญญาณผ่าน cyclin D – Cdk โปรตีน Rb จะ ถูกเติมหมู่ phosphate ทำให้ปลดปล่อย E2F เป็นอิสระ E2F จึงสามารถทำหน้าที่กระตุ้นการ ทำงานและควบคุมยีนอื่นที่จำเป็นต่อการออกจากระยะ G1 เพื่อเข้าสู่ระยะ S ให้เริ่มการสังเคราะห์ DNA ฉะนั้น โปรตีน Rb จึงทำหน้าที่เสมือนด่านคอยควบคุมการดำเนินจะให้ผ่านพ้นระยะ G1 ไป หรือไม่ เรียกว่า G1 checkpoint

โปรตีน cyclin-Cdk complex สามารถถูกควบคุมโดยโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งเรียกว่า CKI (Cdk inhibitor)

2. โปรตีน p 53

P53 เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นจากยีน p53 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งอีกชนิดหนึ่ง (tumor suppressor gene) p53 เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 53 KDa มีหน้าที่เป็นด่านคอยควบคุมเมื่อ DNA มีความเสียหาย โดยหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ไว้ก่อนเพื่อซ่อมแซม DNA ในระยะ G1 หรือ G2 (arrest for DNA repair)

ในระยะเวลาต่าง ๆ ของ cell cycle เซลล์มีกลไกตรวจสอบความผิดพลาดของ DNA ว่ามีความเสียหาย แตกหัก หรือถูกทำลาย หรือเกิดการกลายพันธุ์ทำให้เบสไม่คู่สมกัน ความผิดพลาดเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้ในระยะ G1 G2 หรือ M ส่งผลให้ p53 ถูกกระตุ้นเพิ่มปริมาณมากขึ้น ทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวเพื่อรอการซ่อมแซมเสียก่อน เมื่อมีความเสียหายของ DNA จะกระตุ้นให้โปรตีน p53 ทำงาน โดยไปกระตุ้นโปรตีน p21 มาจับและมีผลยับยั้ง G1/S-Cdk จึงสามารถหยุดเซลล์ไว้ได้ในระยะ G1 และ G2 ถ้า DNA ถูกทำลายเสียหายมากเกินไปกว่าจะซ่อมแซมได้ p53 สามารถส่งสัญญาณกระตุ้นยีนที่ชักนำให้เกิดการทำลายตัวเซลล์เอง ที่เรียกว่า apoptosis หรือ program cell death



ภาพประกอบ 35 การกระตุ้นของโปรตีน p53 หลังจาก DNA ได้รับความเสียหาย ⁽¹⁴⁰⁾

4. ระบบควบคุมตรวจสอบโดยอาศัยจุดตรวจที่เป็นด้านควบคุม (checkpoint controls)

การที่เซลล์เข้าสู่ cell cycle และดำเนินไปจนครบวงจรได้ จำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบ เพื่อป้องกันและกำจัดเซลล์ที่เกิดความผิดพลาด ผิดปกติของยีนไม่ให้เข้าสู่ cell cycle แล้วแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเรียกการตรวจสอบนี้ว่า checkpoint control เซลล์ที่ผิดปกติจะถูกหยุดไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของ cell cycle จนกว่าจะได้รับการซ่อมแซมแก้ไขความผิดปกติเสียก่อน จึงจะแบ่งตัวต่อไป หรือหากไม่สามารถซ่อมแซมแก้ไขได้ก็จะต้องเข้าสู่ apoptosis จุดที่เป็นด่านตรวจสอบนี้เกิดขึ้นบริเวณระยะต่อ เช่น G1/S checkpoint โดยไปยับยั้ง G1/S-Cdk และ S-Cdk



การตายของเซลล์ (Cell Death and Apoptosis) ⁽⁶⁵⁾

การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ (apoptosis) หรือ cell suicide เป็นกลไกที่ทำให้สัตว์หลายเซลล์สามารถควบคุมจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อให้คงที่ โดยการกำจัดเซลล์เสื่อมสภาพตามอายุขัยหรือเสื่อมสภาพจากการถูกทำลายจนไม่สามารถที่จะซ่อมแซมได้ ไม่ว่าจะจากปัจจัยภายนอก เช่น การได้รับแสงยูวี มีภาวะติดเชื้อไวรัส การขาดสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (เช่น growth factor และ cytokines) หรือปัจจัยภายใน เช่น ภาวะ oxidative stress การทำงานที่ผิดปกติของวงจรเซลล์ ทั้งนี้การทำงานของกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในร่างกายจะต้องสอดคล้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ใหม่ (proliferation) เพื่อรักษา organism ให้อยู่ภาวะสมดุล (homeostasis) การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์จัดเป็นหนึ่งในกลไกภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) เพื่อกำจัดเซลล์ติดเชื้อ และเป็น anticarcinogenesis กำจัดเซลล์ที่มีความผิดปกติในระดับพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย

คำจำกัดความ

ในปี 1972 Kerr, JF และคณะ บัญญัติคำว่า "apoptosis" เพื่อบรรยายลักษณะการตายของเซลล์ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ซึ่งแตกต่างจากลักษณะของเซลล์ที่ตายแบบเนโครซิส (necrosis) หรือ accidental cell death ที่รู้จักกันดีมาก่อนแล้ว การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์อาจถูกเรียกว่า programmed cell death (PCD) ซึ่งความจริงแล้ว PCD เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในกระบวนการพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่ง PCD มีบทบาทในเรื่องการพัฒนารูปร่างและอวัยวะต่าง ๆ ของ embryo (morphogenesis) เช่น การพัฒนาการจากลูกอ๊อดเป็นกบต้องมีการกำจัดเซลล์บริเวณส่วนหาง ของลูก อ๊อดตามโปรแกรมที่กำหนดไว้ อย่างไรก็ตาม ในสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตเต็มวัยแล้วก็ยังพบการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เป็นปกติ เช่น เซลล์ผิวหนัง การตายของเซลล์เยื่อผนังมดลูกที่รอบประจำเดือน เป็นต้น

ลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์

การตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์เป็นขบวนการฆ่าตัวตายที่อาศัยพลังงานในรูป ATP เนื่องจากต้องมีการแสดงออกของยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ เซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสจะหดตัว และหลุดออกจากการเกาะเกี่ยวของเซลล์เพื่อนบ้าน มีการหดแน่นของโครมาตินมาอยู่บริเวณขอบ ของนิวเคลียส จนมองดูเหมือนลักษณะของพระจันทร์เสี้ยว ผนังเซลล์ไม่เรียบมีลักษณะเหมือนตุ่มยื่นออกมา (membrane blebbing) DNA

จะหักเป็นท่อนตรงช่วงระหว่าง internucleosome และ apoptotic bodies ที่มีชิ้นส่วนของ DNA จะถูกเซลล์เพื่อนบ้านมาเก็บกิน ด้วยวิธี phagocytosis ทั้งนี้จะไม่มีการปล่อย cellular contents ของเซลล์ตายดังกล่าวออกมาสู่ภายนอก ทำให้ไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammation) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis อย่างสิ้นเชิง

เทคนิคที่ใช้ในการบ่งชี้การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ถูกต้องที่สุด คือ การ ดูรูปร่าง ของ apoptotic cell ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน อย่างไรก็ตาม ในเซลล์บางชนิดอาจมองเห็น ผิวเซลล์มีลักษณะยื่นออกมาเป็นตุ่ม (blebbing) โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) การใช้ annexin V ที่ติดฉลากด้วย fluorescent dye จะทำให้บ่งชี้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก เนื่องจาก annexin V สามารถจับกับ phosphatidyl serine (PS) ซึ่งอยู่ด้านนอก (outer leaflet) ในขณะที่เซลล์ปกติจะอยู่ด้านใน การย้ายที่อยู่ของ PS จากผนังเซลล์ด้านในออกมาอยู่ผนังเซลล์ด้านนอกของ apoptotic cell ทำให้เกิดเป็นเครื่องหมายบอกเซลล์เพื่อนบ้านให้มาช่วยเก็บกิน ในกรณีที่ไม่มีเซลล์เพื่อนบ้านมาเก็บกิน apoptotic bodies เช่น การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง (cell line) ในจานเพาะเลี้ยง พวก membranous vesicle เหล่านี้บางครั้งอาจถูกสลายให้ฉีกขาด ปล่อย inflammatory contents ออกมาแล้วกลายเป็นการตายที่เรียกว่า secondary necrosis ไปในที่สุด

การย้อม fluorescent เช่น DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) หรือ propidium iodide เพื่อย้อม DNA ใน apoptotic cell แล้วส่องด้วยกล้อง fluorescent microscopy จะสามารถช่วยบ่งชี้ apoptotic bodies ได้ สำหรับการหักเป็นท่อนของ DNA ในช่วง internucleosome ซึ่งเกิดในช่วงท้ายของกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ โดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ DNase ที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบได้จากการทำ gel electrophoresis ของ genomic DNA ที่สกัดได้ หรือการตรวจสอบ DNA fragmentation แบบ in situ โดยอาศัยเทคนิค TdT - mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการตรวจสอบชิ้นส่วนปลาย 3'-OH ที่เป็นอิสระของ DNA ที่พบได้ใน apoptotic cell โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) เป็นตัวเร่งการเติม dUTP ที่ติดฉลากเข้าไปที่ปลาย 3'-OH

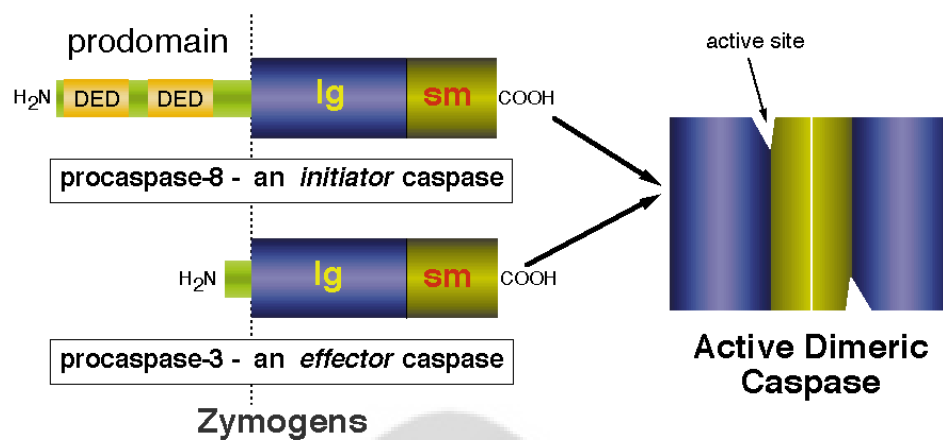
ยีนควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ (Apoptotic genes)

จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ในหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* ซึ่งเป็นสัตว์หลายเซลล์ที่ได้มีการศึกษาที่มาของเซลล์ทุกเซลล์ใน organism ไร่อย่างสมบูรณ์ (complete cell lineage) พบว่า ยีนที่สำคัญในการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิส คือ *ced-3*, *ced-4* ซึ่งเป็นยีนกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส และ *ced-9* ซึ่งเป็นยีนยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส ในสภาวะปกติ *ced-9* จะจับกับ *ced-3* และ *ced-4* ทำให้ *ced-3* และ *ced-4* ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ แต่ถ้าเซลล์ได้รับการกระตุ้นให้ตายแบบอะพอพโทซิส *ced-9* จะแยกตัวออกไป

Ced-3 ใน *C.elegans* เป็น homologs ของ ICE (caspase-1) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม Caspases (cysteine-dependent aspartate specific proteases) เป็นเอนไซม์ cysteine proteases ที่จะตัดพันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโน aspartic acid แบ่งเป็น initiator caspases (caspase-2,8,9,10) และ effector caspases (caspase-3,6,7) caspases ทั้ง 2 กลุ่มจะถูกสร้างออกมาอยู่ในรูป proenzymes ซึ่งจะต้องเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูป active form ต่อเมื่อภายในเซลล์มีกระบวนการชักนำให้ตายแบบอะพอพโทซิส สำหรับ initiator caspase จะอยู่ในรูป active form เมื่อมีการ dimerization แล้วเกิดปฏิกิริยา autocatalytic cleavage ตัด N-terminal prodomain ออกในส่วนของ effector caspase จะอยู่ในรูป active form เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยการตัด prodomain ออกไปด้วย initiator caspase ที่อยู่ในโครงรูป active ทำให้สามารถสลายโปรตีนหลายชนิดจนนำไปสู่ลักษณะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่น การสลาย cytoskeleton proteins ทำให้เซลล์มีรูปร่างหดเล็กลง หรือการสลาย nuclear protein lamin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส

Caspase จะถูกสร้างในรูปที่มีบริเวณ prodomain จึงไม่สามารถทำงานได้จนกว่าจะมีกระบวนการการตัดส่วน prodomain ออกไป และมีการรวมตัวของ 2 หน่วยย่อยใหญ่เข้ากับ 2 หน่วยย่อยเล็กในรูปของ tetramer ซึ่งจะทำให้เกิดบริเวณ catalytic site ของเอนไซม์ 2 แห่ง *ced-4* ใน *C.elegans* เป็น homologs ของ Apaf-1 ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของ apoptosome ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ced-9 ใน *C.elegans* เป็น homologs ของ *bcl-2* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม Bcl-2 family มีสมาชิกเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสมากกว่า 20 ชนิด โดยยีนบางชนิดมีคุณสมบัติกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส (proapoptosis) เช่น *bax*, *bid*, *bad* เป็นต้น แต่บางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (anti-apoptosis) เช่น *bcl-2* และ *bcl-X_L* เป็นต้น



ภาพประกอบ 36 โครงสร้างของ initiator caspase (procaspase-8) และ effector caspase

(procaspase-9)⁽¹⁴²⁾

lg = a large subunit และ sm = a small subunit

กลไกการตายแบบอะพอพโทซิสในระดับโมเลกุล

1. **Extrinsic pathway** ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของ death receptor ที่ได้รับการกระตุ้นจาก death ligand โมเลกุลส่งสัญญาณ death ligand ที่จะจับกับ death receptor ได้แก่ FasL, TNF- α เช่น การตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเมื่อได้รับการส่งสัญญาณจาก death ligand FasL จาก cytotoxic T-cell สำหรับ death receptor เป็นโปรตีนตัวต่อรับบนผิวเซลล์กลุ่ม tumor necrosis factor superfamily ที่จะจับกับ death ligand อย่างจำเพาะ เช่น FasL จับกับ Fas receptor หรือ TNF- α จับกับ TNFR1 เป็นต้น ต่อมาเกิดการแปลงสัญญาณนำไปสู่การกระตุ้น caspases ภายในไม่กี่วินาทีหลังการจับกันของ ligand กับ receptor ทำให้เซลล์ที่ได้รับสัญญาณจาก death ligand นั้นตายแบบอะพอพโทซิสภายในไม่กี่ชั่วโมง

2. **Intrinsic pathway (mitochondria-mediated pathway)** เกี่ยวข้องกับการปล่อย cytochrome C ออกมาจากไมโทคอนเดรีย เนื่องจากโปรตีน Bax ซึ่งในภาวะปกติอยู่ที่ไซโตซอล เคลื่อนไปจับที่ outer membrane ของไมโทคอนเดรียเมื่อเซลล์ได้รับการชักนำให้ตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้ permeability transition pore เสียการควบคุมการเข้าออกของไอออนปล่อยไอออนจากไซโตซอลเข้ามาข้างใน ทำให้ inner membrane potential ของไมโทคอนเดรียถูกรบกวน cytochrome C จะถูกปล่อยมาจากไมโทคอนเดรียเมื่อ cytochrome C ออกมาสู่ไซโตซอลจะรวมตัวกับ Apaf-1 และ procaspase-9 เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome โดยใช้พลังงานใน

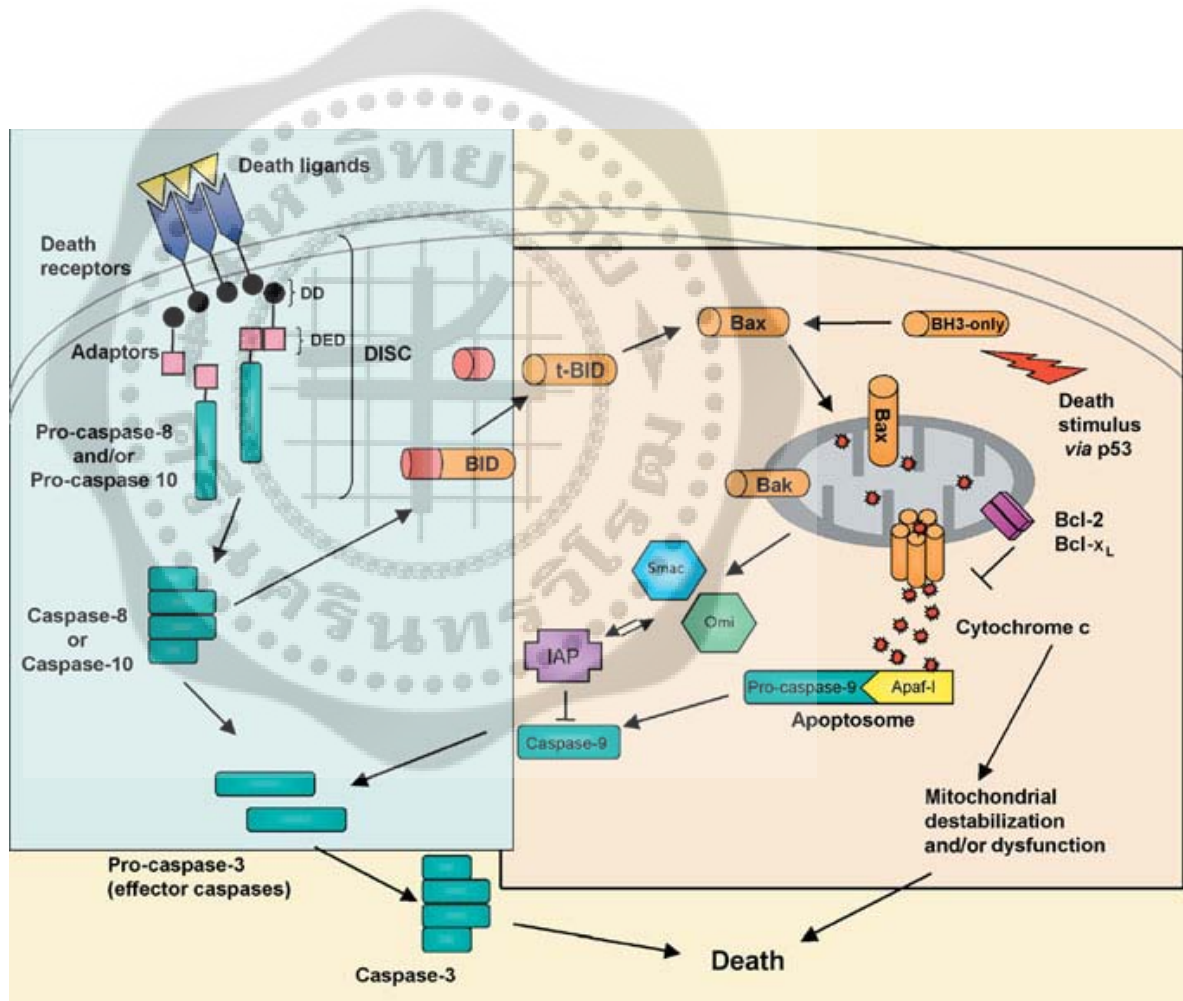
รูป ATP ในการรักษาโครงสร้างให้เสถียร ซึ่ง caspase-9 จะกระตุ้นการทำงานของ effector caspase เช่น procaspase-3 ต่อไป caspase-3 จะสลาย complex ของ CAD-ICAD ที่อยู่ในสภาพ inactive ในไซโตซอล ทำให้ CAD อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน โดย CAD จะตัดสาย DNA บริเวณ linker DNA ที่อยู่ระหว่างนิวคลีโอโซม ทำให้เมื่อนำเซลล์ที่ตายแบบอะพอพอโทสิสมาแยกสกัด genomic DNA แล้วนำไปทำ agarose gel electrophoresis จะเห็นท่อน DNA ขนาด 180 base pairs และท่อน DNA ขนาดเป็นจำนวนเท่าของ 180 อีกหลายท่อนเหมือนขั้นบันได (DNA ladders) ซึ่งเป็นวิธีพิสูจน์ให้เห็นว่ามีการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์ที่ตายด้วย apoptosis อย่างเด่นชัดดังกล่าวมาแล้ว

การชักนำให้เซลล์ที่มี DNA เสียสภาพ (DNA damage) ตายแบบอะพอพอโทสิสเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในการทำงานเป็น tumor suppressor ของโปรตีน p53 DNA ที่อยู่ในรูป single-strand break หรือ double-strand break จะชักนำให้ p53 ถูกทำให้อยู่ในโครงสร้าง phosphorylated form สามารถทำหน้าที่เป็น transcription factor นำไปสู่การหยุดวงจรเซลล์ (cell cycle arrest) ในระยะ G1 โดยการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน p21 ที่เป็น cyclin dependent kinases inhibitor ยับยั้งการทำงานของ cyclin E/cdk2 complex ทำให้เกิดการหยุดวงจรเซลล์เพื่อซ่อมแซม DNA ที่แตกหัก ก่อนการจำลองตนเอง (DNA replication) ในช่วง S phase หรือ p53 จะชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพอโทสิสของเซลล์ โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน bax PUMA NOXA และยับยั้งการแสดงออกของยีน bcl-2 ในกรณีที่ DNA ของเซลล์เสียหายจนไม่อาจซ่อมแซมได้

อย่างไรก็ตาม ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ยับยั้งการทำงานของ caspase คือ inhibitors of apoptosis proteins (IAP) เช่น survivin และ XIAP เป็นต้น โดยยับยั้งการทำงานของทั้ง caspase-9 และ caspase-3 จัดเป็นการทำงานของกลุ่มโปรตีนเพื่อป้องกันการตายแบบอะพอพอโทสิสของเซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นเองจากการกระตุ้นของ caspase โดยไม่ผ่านการชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพอโทสิสทั้ง intrinsic และ extrinsic pathway มาก่อน

เมื่อ death receptor ที่มีบริเวณ death domain (DD) ในด้านไซโตซอล ได้รับการกระตุ้นจาก death ligand จะเกิด trimerization และ adaptor protein ซึ่งมีบริเวณ DD ที่ N-terminal จะมาจับที่ receptor ดังกล่าว นอกจากนี้ death effector domain (DED) ที่บริเวณ C-terminal ของ adaptor protein นั้นยังทำให้ adaptor protein สามารถจับกับ procaspase-8 ผ่านทาง DED นำไปสู่การกระตุ้นของ procaspase-8 ในที่สุด activated caspase-8 จะกระตุ้น procaspases-3 โดยตรง หรือจะสลาย Bid ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในไซโตซอลให้อยู่ในรูป truncated form (t-bid)

โปรตีนดังกล่าวกระตุ้น Bax ให้มาเกาะที่ outer membrane ของ mitochondria สามารถกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสโดยผ่านทาง intrinsic pathway ซึ่งจะมีการปล่อย cytochrome C ออกจากไมโทคอนเดรียมาเกี่ยวข้องกับ DISC = death-inducing signaling complex หมายถึงถึง intracellular apoptotic mediating signal molecule กระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสทาง extrinsic pathway นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ caspase-8 เช่น FADD และ TRADD เป็นต้น



ภาพประกอบ 37 กลไกการตายแบบอะพอพโทซิสระดับโมเลกุล ⁽¹⁴³⁾

สรุปขั้นตอนและความสำคัญทางการแพทย์ของการตายแบบอะพอพโทซิส

1. การเหนี่ยวนำเซลล์ให้ตายแบบอะพอพโทซิส
2. การควบคุมการทำงานของ apoptotic gene โดยกระตุ้นการทำงานของ proapoptotic gene เช่น bax, bid และยับยั้งการทำงานของ anti-apoptotic gene เช่น bcl-2, bcl-X_L

3. กระตุ้น proteolytic enzyme เช่น caspase
4. เซลล์ตายโดยมีลักษณะของ apoptotic cell ซึ่งจะถูกล้างเพื่อนบ้านที่เป็น phagocytic cell มาเก็บกิน

การศึกษาเรื่องการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มีความสำคัญสำหรับแพทย์ เนื่องจากการศึกษากลไกการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้มีการพัฒนายาชนิดใหม่ ๆ จนสามารถควบคุมจำนวนเซลล์ไม่ให้มากหรือน้อยผิดปกติ ผ่านทางการรักษา สมดุลระหว่างการตายของเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่มากเกินไปผิดปกติ (excessive apoptosis) นำไปสู่พยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียเซลล์จำนวนมาก เช่น การมีภูมิคุ้มกันบกพร่องในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV เนื่องจากการตายแบบอะพอพโทซิสของ T lymphocyte (helper T cell) หรือการลดจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรค Alzheimer's disease หนึ่งในวิธีการรักษา คือ การยับยั้ง apoptosis ที่มากเกินไปผิดปกติด้วยการสังเคราะห์ด้วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase ซึ่งให้ผลดีในการรักษาหนูทดลองที่มีการตายของเซลล์ประสาทมากเกินไปผิดปกติ

สำหรับการตายแบบอะพอพโทซิสที่น้อยกว่าปกติ (insufficient apoptosis) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็ง การเติบโตของก้อนมะเร็งเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์อย่างควบคุมไม่ได้ ร่วมกับการลดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ซึ่งควรจะตาย สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน p53 ซึ่งพบในผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 50% ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส การกระตุ้น proapoptotic gene ให้ทำงานในเซลล์มะเร็งเท่านั้น เป็นหนทางหนึ่งในการพัฒนายารักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ การที่เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ควรจะตายกลับไม่ตายจะนำไปสู่ภาวะ chronic autoimmune syndromes เช่น โรค systemic lupus erythematosus (SLE) หรือ rheumatoid arthritis การรักษาโรคที่เกิดจากการลดลงของการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ คือ การกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการ อาจโดยการให้ antisense oligonucleotides เพื่อป้องกันการแสดงออกของ anti-apoptotic gene bcl-2 อย่างไรก็ตาม ต้องระวังภาวะแทรกซ้อนจากการกระตุ้นอะพอพโทซิส ซึ่งอาจนำไปสู่ haemorrhagic liver necrosis

การเจริญของเซลล์และมะเร็ง (Cell Growth and Cancer) ⁽¹⁴⁴⁾

มะเร็งเป็นผลมาจากเซลล์ของร่างกายเจริญเติบโตผิดปกติ ทำให้เกิดเป็นเนื้องอกร้ายแรง เซลล์มะเร็งนี้สามารถรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง และแพร่กระจายจากบริเวณหนึ่งไปยังบริเวณที่สองของร่างกาย แบบแผนการเจริญเติบโตที่ผิดปกตินี้มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งควบคุมการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiation) และการอยู่รอดของเซลล์ (survival) การที่เซลล์มะเร็งไม่ตอบสนองต่อสัญญาณที่มาควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ เนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้นภายในเซลล์

โดยทั่วไปเซลล์ปกติแบ่งตัวจนถึงระดับหนึ่งจะหยุดการแบ่งตัว ในขณะที่เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตอย่างไม่หยุดยั้ง ลักษณะเฉพาะที่สำคัญสำหรับเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็งสามารถสรุปได้ดังนี้

ลักษณะที่สำคัญของเซลล์ปกติ

1. Contact inhibition of growth เซลล์ปกติมีการหยุดการเจริญเติบโตเมื่อเจริญมาสัมผัสกัน และแผ่ตัวเต็มพื้นที่ นั่นคือ เซลล์ปกติมีความสามารถในการหยุดการเจริญเติบโตหลังจากที่เซลล์เจริญเข้ามาชิดสัมผัสกัน
2. Side by side organization เซลล์ปกติมีการเรียงตัวติดกันเป็นแพ ขยายตัวเต็มพื้นที่บนจานทดลอง หลังจากนั้นเซลล์ปกติจะหยุดการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน
3. Monolayer of ordered cells เซลล์ปกติมีการเจริญเติบโตเรียงกันเป็นระเบียบเพียงชั้นเดียว ไม่เจริญเติบโตแบ่งเซลล์ซ้อนทับกันหลายชั้น
4. Grow attached to surface คุณสมบัติในการยึดเกาะติดกับพื้นผิวเรียบบนจานทดลองและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่า เซลล์ปกติเจริญเติบโตติดกับพื้นจานทดลองเต็มพื้นที่

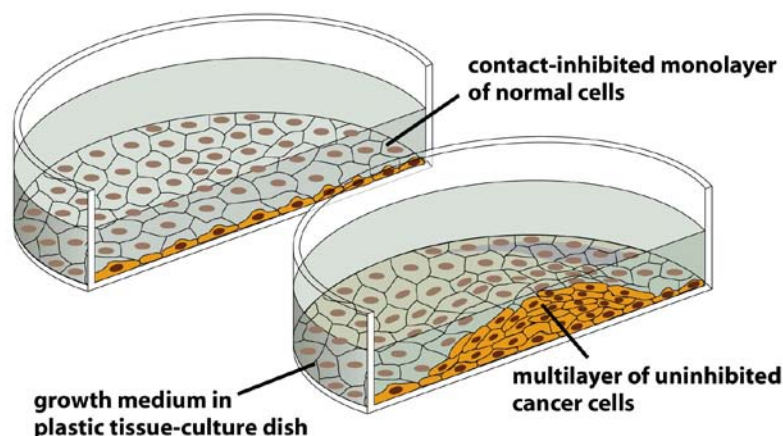


Figure 20-29 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 38 ลักษณะที่สำคัญของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง ⁽¹⁴⁰⁾

ลักษณะที่สำคัญของเซลล์มะเร็ง

1. Decreased growth factor requirement เซลล์มะเร็งบางชนิดสามารถสังเคราะห์ growth factors ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เอง แล้วมีผลมากระตุ้นตัวเซลล์เอง (autocrine) ทำให้ไม่ต้องพึ่งพา growth factors จากภายนอก หรือต้องการน้อยกว่าเซลล์ปกติ

2. Loss of capacity for growth arrest เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์อย่างไม่หยุดยั้ง เนื่องจากกลไกของการควบคุม checkpoints ใน cell cycle ผิดปกติ จึงทำให้สูญเสียความสามารถในการยับยั้ง และหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้น เซลล์มะเร็งจึงเป็นเซลล์ที่ไม่ตาย (immortal cells) และไม่สามารถควบคุมได้

3. Loss of dependence on anchorage เซลล์มะเร็งจะสูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะติดกับพื้นผิว ทำให้สามารถเจริญเติบโตกระจายตัวแวนลอยอยู่ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือในระบบไหลเวียนของร่างกาย เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีปริมาณ fibronectin ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของ extracellular matrix ลดลง จึงไม่สามารถยึดติดกับพื้นผิวได้ดังเช่นเซลล์ปกติ

4. Changed cell morphology and growth habits เซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างขนาดของเซลล์ และมีพฤติกรรมในการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ

5. Loss of contact inhibition เซลล์มะเร็งจะเจริญเติบโตแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วโดยไม่เรียงตัวเป็นแผ่นเซลล์ชั้นเดียว แต่จะเจริญเติบโตทับซ้อนกันเป็นกลุ่มก้อน เนื่องจากสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตหลังจากที่เซลล์เจริญมาชิดสัมผัสกัน

นอกจากนี้เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการเจริญเติบโตแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว อัตราการแบ่งตัวแบบ mitosis จะสูง และเมื่อส่องดูลักษณะของเซลล์มะเร็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่า nucleoli เด่นชัดเจน และเมื่อเทียบสัดส่วนระหว่างขนาดของนิวเคลียสต่อขนาดของไซโตพลาซึม จะมีสัดส่วนสูงกว่าเซลล์ปกติ แสดงว่าเซลล์มะเร็งมีขนาดของนิวเคลียสใหญ่กว่าเซลล์ปกติ เมื่อเทียบระหว่างเซลล์ที่มีขนาดเท่ากัน

เซลล์ปกติโดยทั่วไปจะมีการแบ่งตัว (cell proliferation) จนถึงระดับหนึ่ง จึงหยุดการแบ่งตัว แล้วมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ระยะตัวอ่อนไปเป็นเซลล์เฉพาะทาง ซึ่งอาจมีขนาดหรือรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป และมีหน้าที่เฉพาะ (cell differentiation) การเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell growth) ถูกควบคุมโดยกลไกในแต่ละระยะของ cell cycle โดยมีจุดตรวจที่เป็นด่านตรวจเช็คควบคุมการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในระยะเวลาต่างๆ ของ cell cycle ถ้าความสามารถในการควบคุมการเจริญของเซลล์เสียไป (loss of cell cycle and growth

control) ยังผลให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และขนาดของเซลล์มากขึ้นจนควบคุมไม่ได้ ทำให้กลายเป็นเนื้องอกและมะเร็งได้

ประเภทของเนื้องอก

เซลล์หนึ่งเซลล์เมื่อมีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวผิดปกติ ในที่สุด กิดการเจริญเป็นก้อนเนื้อโตขึ้น ซึ่งเรียกว่า เนื้องอก (tumor หรือ neoplasia) ชนิดของเนื้องอกเป็นได้ทั้งเนื้องอกไม่ร้ายแรง และเนื้องอกร้ายแรง เช่น ก้อนหูด (wart) ที่บริเวณนิ้วมือเป็นเนื้องอกไม่ร้ายแรง ซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ของกลุ่มเซลล์ ส่วน มะเร็งมีการเจริญเติบโตแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งอย่างรวดเร็ว โดยเจริญเข้าแทรกซึม (infiltrate) รุกราน (invade) และทำลาย (destroy) เนื้อเยื่อข้างเคียงโดยรอบ เช่น มะเร็งที่ปอดแพร่กระจายไปที่ตับทำให้เป็นมะเร็งที่ตับได้

เนื้องอก คือ ก้อนของเซลล์ร่างกายที่เจริญขึ้นผิดปกติ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. Benign tumor เป็นเนื้องอกไม่ร้ายแรง มีลักษณะเจริญเติบโตเฉพาะที่ (localized) มักมีขนาดเล็ก ถูกห่อหุ้มโดยเยื่อหุ้มพังผืด (fibrous capsulation) ทำให้มีขอบเขตชัดเจน และไม่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต

2. Malignant tumor หรือ cancer เป็นเนื้องอกร้ายแรง หรือมะเร็ง มีลักษณะขอบแพร่กระจาย (spread) รุกราน (invasive) จากอวัยวะหนึ่งไปสู่เนื้อเยื่อข้างเคียง และอวัยวะอื่น ๆ (metastasis) โดยส่วนใหญ่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต (life-threatening) สาเหตุที่ทำให้เป็นมะเร็งอาจเกิดจากการได้รับสารเคมี สารพิษ สุรา บุหรี่ รังสี การติดเชื้อไวรัสบางชนิด รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดการกลายพันธุ์

การแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) เกิดขึ้นเป็นขั้นตอน เริ่มจากเซลล์ที่แพร่กระจายแยกรุกรานทะลุผ่านชั้น basal lamina จากก้อนมะเร็งเดิม (primary site) เข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียง ลูกกลมเข้าสู่ท่อน้ำเหลือง หรือเข้าสู่หลอดเลือด หลีกเลียงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เดินทางไปยังจุดหมายปลายทางอีกตำแหน่งหนึ่ง (secondary site) แล้วแทรกตัวออกจากท่อน้ำเหลืองหรือหลอดเลือด เพื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นให้สร้างหลอดเลือดมาเลี้ยงกลุ่มก้อนเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งที่แพร่กระจายใหม่ หลังจากที่เซลล์มะเร็งได้แพร่กระจายไปยังตำแหน่งใหม่ของร่างกาย เซลล์มะเร็งจำเป็นต้องมีหลอดเลือดมาเลี้ยงสำหรับแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นก้อนมะเร็งใหม่ได้

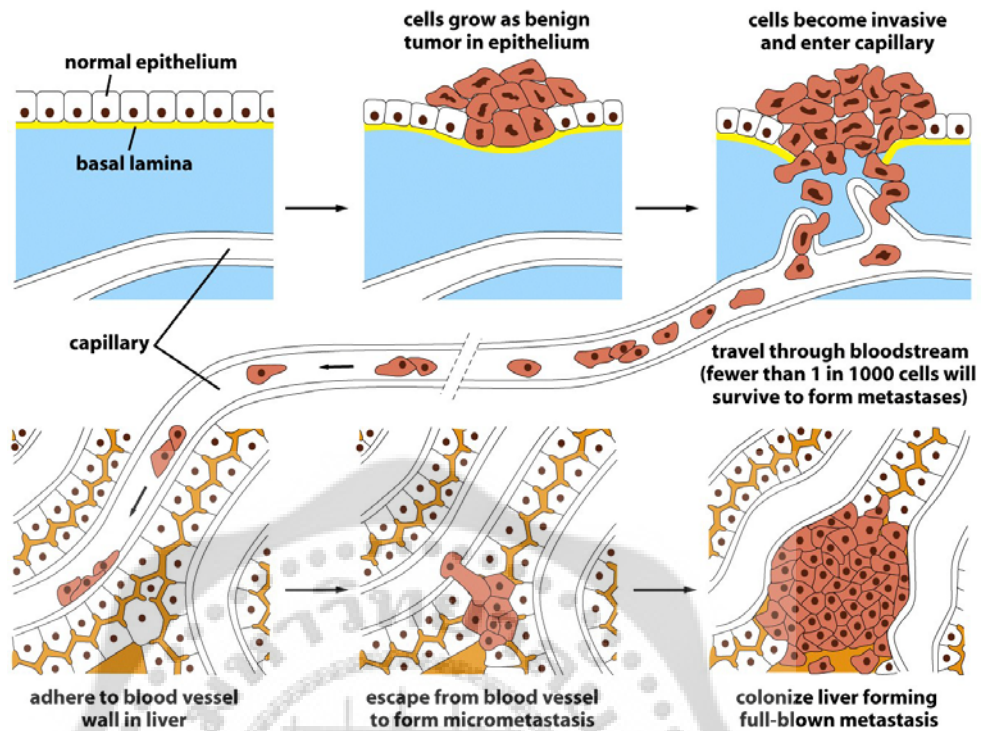


Figure 20-17 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

ภาพประกอบ 39 การแพร่กระจายของมะเร็งจากอวัยวะหนึ่งไปยังอีกอวัยวะหนึ่ง⁽¹⁴⁰⁾

โดยทั่วไป เนื้อเยื่อที่มีความสามารถในการสร้างหลอดเลือด และหลอดเลือดฝอยขึ้นใหม่ (angiogenesis) ดังนั้น เนื้อเยื่อจึงมีหลอดเลือดของตนเองมาเลี้ยงโดยนำเอาสารอาหาร และออกซิเจนให้แก่ก้อนเนื้อเยื่อ การสร้างหลอดเลือดใหม่มาเลี้ยงก้อนมะเร็งมีความสำคัญต่อเซลล์มะเร็ง ในการแพร่กระจาย และเกิดการรวมตัวเป็นก้อนมะเร็งขึ้นใหม่ที่ตำแหน่งซึ่งเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไป การงอกและสร้างหลอดเลือดขึ้นมาใหม่ เพื่อเลี้ยงก้อนมะเร็งนั้น เกิดขึ้นโดยได้รับการกระตุ้นจากโปรตีน ที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ชักนำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ขึ้น เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นต้น

ยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

คำว่า oncogene มาจากคำภาษากรีก “onkos” ซึ่งแปลว่า ก้อนหรือเนื้องอก การกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง (transforming mutation) ใน proto – oncogene มีผลทำให้ไปเพิ่มหน้าที่ (activity) หรือปริมาณ (quantity) ของ gene product เรียกว่า gain of function mutation ในขณะที่ tumor suppressor gene ทำหน้าที่ต้านการเกิดมะเร็ง ถ้าเกิด transforming mutation กับยีนต้านมะเร็งแล้ว มีผลทำให้สูญเสียหน้าที่ หรือลดปริมาณของ gene product การกลายพันธุ์นี้ เรียกว่า loss of function mutation กล่าวโดยสรุป มะเร็งเป็นผลมาจากการสะสมของการกลายพันธุ์หลาย ๆ ครั้งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลง

พัฒนาของเซลล์ การกลายพันธุ์เหล่านี้ ยังผลให้เซลล์มะเร็งเจริญแบ่งเซลล์เองได้โดยไม่สิ้นสุด และไม่สามารถควบคุมได้ ยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. Proto – oncogene เป็นยีนปกติของเซลล์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการแบ่งเซลล์ เมื่อมีการกลายพันธุ์ของ proto – oncogene ทำให้ยีนทำงานมากขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลง เป็น oncogene เซลล์ก็จะแบ่งตัวมากจนควบคุมไม่ได้เกิดเป็นมะเร็งขึ้น

2. Oncogene เป็นยีนมะเร็งซึ่งก่อให้เกิดโรคมะเร็ง โดยที่ proto – oncogene เกิดการกลายพันธุ์เปลี่ยนแปลงเป็น oncogene ทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง oncogene นี้สามารถผลิตโปรตีนที่ผิดปกติทั้งในด้านคุณภาพหรือด้านปริมาณ ส่งผลให้กระตุ้นการแบ่งเซลล์มากขึ้นผิดปกติ การกลายพันธุ์นี้ทำให้ยีนทำงานมากขึ้น (gain of function mutation) ดังนั้น oncogene จึงเป็นยีนเด่น (autosomal dominant)

3. Tumor suppressor gene เป็นยีนต้านมะเร็ง มีหน้าที่ผลิตโปรตีนเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของเซลล์ ตัวอย่างของ tumor suppressor gene ที่สำคัญในระดับนี้ เช่น ยีน Rb สังเคราะห์โปรตีน Rb และยีน p53 สังเคราะห์โปรตีน p53 ดังนั้น ถ้า tumor suppressor gene เกิดการกลายพันธุ์มีผลให้ทำหน้าที่น้อยลง หรือหมดประสิทธิภาพ จะก่อให้เกิดเป็นมะเร็งมากขึ้นได้ การกลายพันธุ์นี้ทำให้ยีนนั้นสูญเสียหน้าที่ (loss of function mutation) มักเกิดขึ้นกับยีนทั้ง 2 allele ดังนั้น tumor suppressor gene จึงเป็นยีนด้อย (autosomal recessive)

กลไกการเกิดยีนมะเร็ง

โดยทั่วไป กลไกที่ทำให้ proto – oncogene ซึ่งอยู่ในเซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลง กลายเป็น oncogene พบได้ 3 รูปแบบหลัก ดังนี้

1. Point mutation (การกลายพันธุ์แบบจุด) หรือ deletion (การขาดหายไปของยีน) การกลายพันธุ์แบบจุด หรือการเปลี่ยนลำดับเบสสั้น ๆ รวมถึงการกลายพันธุ์ในระดับยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส จากการแทนที่ การตัดออก หรือการแทรกเบสของยีนก็ได้ ส่งผลให้ได้โปรตีนที่มีปริมาณเท่าเดิม แต่มีประสิทธิภาพสูง (hyperactive)

2. Gene amplification (การเพิ่มจำนวนยีน) ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่มีประสิทธิภาพปกติ แต่มีปริมาณสูงมากขึ้น (overproduction) ส่วนของ DNA ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมักมีความยาวหลายแสนนิวคลีโอไทด์ ดังนั้น ยีนอื่นที่อยู่ข้าง proto – oncogene นั้น จึงมักมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นไปด้วย

3. Chromosome rearrangement หรือ translocation (การสลับส่วน และจัดส่วนใหม่ระหว่างโครโมโซม) ทำให้เปลี่ยนศูนย์ควบคุมการทำงานของยีน ส่งผลให้ยีนได้รับการกระตุ้นให้แสดงออกมากขึ้น เกิดการสร้างโปรตีนที่มีปริมาณสูงขึ้น หรือโปรตีนที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น โครโมโซม Philadelphia ซึ่งเป็นสาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด chronic myelogenous leukemia (CML) การสลับส่วนของโครโมโซมทำให้ ABL ซึ่งเป็น proto - oncogene บนโครโมโซมที่ 9 มาเชื่อมต่อกับยีน บนโครโมโซมที่ 22 การสลับส่วนของโครโมโซม 9 และ 22 แล้วจัดเรียงใหม่ได้ยีนลูกผสม ซึ่งสร้างโปรตีน BCR - ABL อันเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML

การเกิดมะเร็งต้องอาศัยการกลายพันธุ์หลายครั้ง

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง ที่เรียกว่า transformation เริ่มเกิดขึ้นเมื่อ DNA ได้รับความเสียหาย (DNA damage จากการเปลี่ยนแปลงเบส หรือสาย DNA ขาด) โดยสารเคมีก่อมะเร็ง แสง ultraviolet ไวรัส หรือเกิดความผิดพลาดขณะเกิด DNA replication ถ้า DNA ไม่ได้รับการซ่อมแซมก่อนที่จะเกิด replication หรือซ่อมแซมไม่เรียบร้อย เป็นเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งอาจจะถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นลูกหลานได้ เมื่อเซลล์ที่เกิด mutation หนึ่งครั้งได้แบ่งตัวเพิ่มจำนวน มีการขยายตัวเป็นกลุ่มเซลล์ (clonal expansion) ในกลุ่มเซลล์เหล่านี้ เซลล์อาจเกิดกลายพันธุ์ครั้งที่สอง (2^{nd} mutation) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตหรือการตายของเซลล์ ในแต่ละ clonal expansion โอกาสของการเกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งหนึ่ง (transforming mutation) เพิ่มสูงขึ้น เมื่อ mutation สะสมมากขึ้นเรื่อยๆ ในยีนที่ควบคุมการเจริญแบ่งเซลล์ การกลายพันธุ์ก็จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในที่สุด เซลล์ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์ถึงเจ็ดครั้ง (multiple mutations) พร้อมทั้งจะเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งในที่สุด

มะเร็งส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ซึ่งเกิดจากเซลล์หนึ่งเซลล์ โดยมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเป็นขั้นตอนหลายครั้ง (multiple mutations) นั่นคือ การกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดมะเร็ง จะเกิดขึ้นหลาย ๆ ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนควบคุมไม่ได้ ตัวอย่างที่พบได้บ่อย คือ การเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer)

โปรตีนจากยีนมะเร็งในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์

เมื่อยีนปกติที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และกา รแบ่งเซลล์ (proto-oncogene) เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ยีนทำงานมากขึ้น จนควบคุมไม่ได้ เกิดเป็นยีนมะเร็ง (oncogene) โปรตีน ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจาก oncogenes เรียกว่า oncoproteins สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 ประเภทหลัก ดังนี้

1. Growth factors คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นปัจจัยกระตุ้นการเจริญเติบโตสำหรับ เซลล์ growth factors นี้ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น ligands สำหรับจับ กับ receptors ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ถ้ามีการสร้าง growth factors มากเกินไป เซลล์เป้าหมายอาจมีการ เจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากผิดปกติ จน เกิดเป็นมะเร็งในที่สุด เช่น โปรตีน platelet – derived growth factor (PDGF)

2. Growth factor receptors คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสารกระตุ้นการ เจริญเติบโตที่เยื่อหุ้มเซลล์ growth factor receptors นี้ อาจมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิด translocation หรือ point mutations ในบริเวณที่มีผลต่อการจับกับ growth factors หรือต่อ กระบวนการ dimerization (การเข้าคู่ของ receptor) หรือต่อ kinase activity เป็นผลให้ receptors ส่งผ่านสัญญาณให้เซลล์มีการเจริญแบ่งตัวตลอดเวลา โดยไม่ขึ้นอยู่กับการกระตุ้นจาก growth factors เช่น โปรตีน epidermal growth factor receptor (EGFR)

3. Intracellular transducers คือ กลุ่มโปรตีน GTP – binding proteins ภายในเยื่อหุ้ม เซลล์ด้านใน โดยการรับสัญญาณจาก receptors เช่น โปรตีน Src, Ras และ Raf เป็นต้น Ras ถูก กระตุ้นโดยการจับกับ GTP แต่ถ้ามีการเปลี่ยน GTP เป็น GDP ทำให้ Ras ไม่ถูกกระตุ้น เมื่อเกิด Point mutations ของ Ras ทำให้ไปลดฤทธิ์ GTPase ของ Ras ทำให้ Ras ถูกกระตุ้นเป็น เวลานานมากขึ้น เป็นผลให้ไปกระตุ้นสัญญาณลำดับถัดไปได้เวลานานมากขึ้น เซลล์จึงแบ่งตัวเพิ่มขึ้น

4. Transcription factors คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ เป็น Transcription factors คอย ควบคุมการทำงานของยีน เช่น โปรตีน Fos, Jun, AP – 1 และ Myc เป็นต้น AP – 1 เป็น heterodimer ของโปรตีนในกลุ่ม Fos และ Jun family เมื่อ AP – 1 ถูกกระตุ้นมากขึ้น เป็นผลให้ ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการดำ เนินไปของ cell cycle ถูก กระตุ้นเพิ่มขึ้นด้วย

5. Apoptotic regulator proteins คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis เช่น โปรตีน Bcl-2, Bad และ Bax เป็นต้น โดยที่ Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic

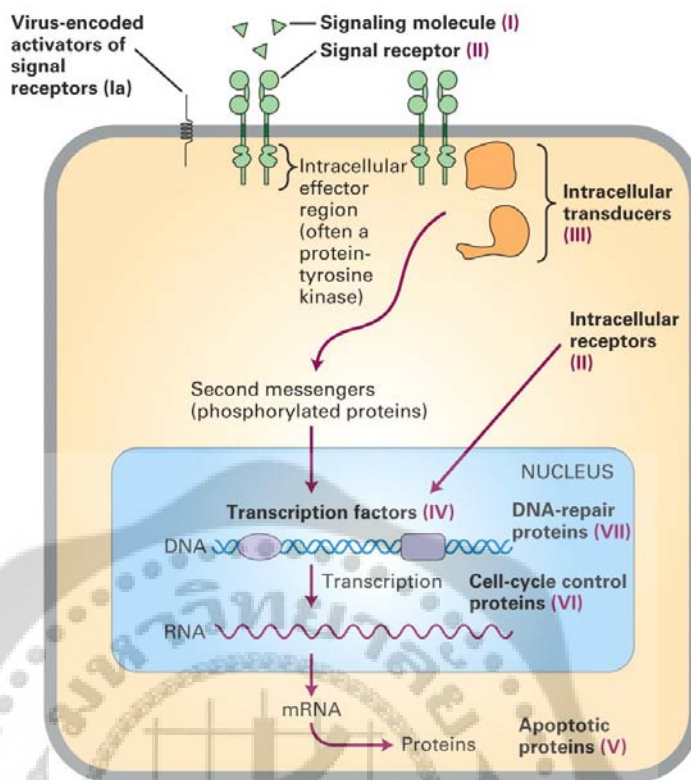
proteins ไปจับกับ Bid แล้วขัดขวางการเกิดช่องที่จะให้ cytochrome C ปล่อยออกมาจาก mitochondria

6. Cell-cycle control proteins คือ กลุ่มโปรตีนทำหน้าที่ควบคุม cell cycle เช่น โปรตีน cyclins และ cyclin-dependent kinases (Cdk) เป็นต้น โปรตีนกลุ่มนี้ควบคุมการดำเนินจากระยะหนึ่งไปสู่อีกระยะหนึ่งของ cell cycle ในแต่ละระยะมีโปรตีน cyclins และ Cdk ที่จำเพาะ

7. DNA repair proteins คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมแก้ไข DNA ที่บกพร่องหรือถูกทำลายไป เช่น โปรตีน BRCA เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (breast cancer) เป็นต้น ถ้าปราศจาก

DNA repair enzymes แล้ว การกลายพันธุ์ และ DNA ที่เสียหายจะสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อการกลายพันธุ์นั้นเกิดขึ้นกับยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth regulatory gene) มีผลทำให้เกิดเป็นมะเร็งในที่สุด โปรตีนผลผลิตของยีนในกลุ่มนี้มีบทบาทในกระบวนการ recombination กระบวนการซ่อมแซม DNA (DNA repair) และการควบคุมกระบวนการ transcription เช่น การกลายพันธุ์ของยีนต้านมะเร็ง *brca 1* และ *brca 2* นำไปสู่การเกิดมะเร็งเต้านมได้ นอกจากนี้ยังมีโรค hereditary non – polyposis colorectal cancer (HNPCC) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ DNA mismatch repair system

ถ้าเกิดความผิดปกติของยีน ซึ่งทำให้โปรตีนตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มนี้เกิดความผิดปกติ มาส่งสัญญาณกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มมากกว่าปกติ จะส่งผลให้เกิดเป็นมะเร็งขึ้นในที่สุด



ภาพประกอบ 40 โปรตีนจากยีนมะเร็งและสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์⁽¹⁴¹⁾

มังคุด (Mangosteen)

มังคุด (mangosteen) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia mangostana* Linn เป็นพืชในวงศ์ Clusiaceae⁽¹⁴⁵⁾ เปลือกมังคุดมีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ xanthones, terpenes, anthocyanins, tannins และ phenols⁽⁵⁴⁾ เปลือกมังคุดนำมาใช้เป็นยาในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในการรักษาแผลติดเชื้อ แผลต่าง ๆ โรคบิด ท้องเสีย และอหิวาตกโรค⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁹⁾ ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากมังคุดผสมวิตามินต่าง ๆ มาใช้เป็นอาหารเสริมต้านมะเร็ง⁽¹⁵⁰⁾

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

ส่วนประกอบกลุ่ม xanthone มีทั้งหมด 68 ชนิด ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด สารประกอบกลุ่ม xanthone ที่พบบ่อยได้แก่ α - mangostin, β - mangostin, garcinone E, gartanin สารประกอบกลุ่ม xanthone เหล่านี้ประกอบด้วย xanthone skeleton และมีหมู่ย่อยต่าง ๆ เช่น aromatic protons, phenolic hydroxyl groups, methoxyl prenyl group, hydroxyl proton, oxygenated methine protons หรือ dihydrofuran ring มาเกาะที่โครงสร้าง เป็นต้น⁽¹⁵¹⁾

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

1. ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เป็น 1.57 - 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁵⁵⁾
2. ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อไวรัส HIV โดยยับยั้งการทำงานของ HIV-1 protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการตัดสายโปรตีนยาวที่ไวรัสสร้างขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเพื่อให้ได้โปรตีนที่สามารถทำงานได้ เช่น โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ หรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส โดยมีค่า IC_{50} เป็น 5.12 ไมโครโมลาร์ และเมื่อสารสกัดกลุ่ม xanthone มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงเท่ากับยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสด้วย⁽⁵⁶⁾
3. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในพืช (phytopathogenic fungi) ได้แก่ *Fusarium oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis* และ *Dreschlera oryzae* สาร xanthone ที่สกัดจากเปลือกมังคุด มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ดี โดยสามารถลดการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้ถึง 64%, 58% และ 85% ตามลำดับ⁽⁵⁷⁾

4. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถลดการเกิด super-oxide anion ได้ถึง 72% ^(58, 152)
5. ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งโดยการยับยั้งการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งตับ, มะเร็งปอด และมะเร็งกระเพาะอาหารโดยมีค่า 50% Lethal Dose (LD₅₀) อยู่ในช่วง 0.5 - 5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ⁽⁶¹⁾ และสารสกัดกลุ่ม xanthone สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR 3 ได้ โดยศึกษาจาก MTT assay, การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และการเกิด DNA fragmentation ⁽⁵⁹⁾ นอกจากนี้สารสกัดกลุ่ม xanthone ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ DLD-1 ได้ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ⁽⁶²⁾ นอกจากนี้สารสกัดกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดยังมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ใน human leukemia cell lines (HL60) โดยสาร xanthones ที่ออกฤทธิ์ดี คือ α - mangostin, β - mangostin และ γ - mangostin โดยมีค่า IC₅₀ คือ 6.8, 7.6, 6.1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ⁽⁶⁰⁾

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1997 Nihal Ahmad และคณะ ศึกษาผลของ green tea polyphenols และ epigallocatechin-3-gallate ที่มีต่อการ apoptosis และ cell cycle ใน human epidermoid carcinoma cells (cell line A431) การศึกษาพบว่า green tea polyphenols และ epigallocatechin-3-gallate ทำให้เกิดการสร้าง internucleosomal DNA fragments ซึ่งเป็นลักษณะของ apoptosis ได้ใน A431 cells การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphologic alterations) โดยการส่องกล้อง confocal microscopy พบว่า กลุ่มควบคุมและ low dose (20 ug/ml) ของ epigallocatechin-3-gallate ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส กลุ่ม 40 ug/ml ของ epigallocatechin-3-gallate แสดงการเกาะกลุ่มของ nuclear chromatin บริเวณขอบนิวเคลียส (peripheral aggregation of nuclear chromatin) กลุ่ม 80 ug/ml ของ epigallocatechin-3-gallate แสดง advanced chromatin condensation, nuclear condensation, formation of apoptotic bodies การศึกษาโดย flow cytometric analysis พบว่า epigallocatechin-3-gallate ทำให้ยับยั้งระยะ G_0 - G_1 ของ cell cycle ได้ใน A431 Cells โดยมีลักษณะแบบ dose dependent apoptosis ⁽¹⁵³⁾

ปี 1999 Appolinary Kamuhabwa และคณะ ศึกษาพืชสมุนไพรของแทนซาเนีย จากการศึกษาน้ำสกัดทั้งหมด 9 ชนิด พบว่า Entanda abyssinica และ Harissonia abyssinia มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ (A431 cell lines) ⁽¹⁵⁴⁾

ปี 2000 Nihal Ahmad และคณะ ศึกษา sanguinarine ซึ่งได้มาจากรากของต้น Sanguinaria canadensis ในด้านการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (antiproliferative) ที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง human epidermoid carcinoma (A431 cells) จากการศึกษาน้ำสกัด sanguinarine สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้โดยขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสาร ⁽¹⁵⁵⁾

มีการศึกษาของ Bhatia ในปี 2001 พบว่า Silibinin, quercetin, epigallocatechin 3-gallate (EGCG) มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งผิวหนังได้ โดยศึกษากับ epidermoid carcinoma (A431 cells line) พบว่า ยับยั้งการกระตุ้น epidermal growth factor receptor และยับยั้ง protein Shc Silibinin ยับยั้ง mitogen – activated protein kinase extracellular signal – regulated kinase -1 และ -2 สาร silibinin, quercetin, EGCG ทำให้ cell death โดยกระบวนการ apoptosis โดยไม่มีกระบวนการ inhibitory effect ต่อ mitogen – activated protein kinase – extracellular signal – regulated kinase -1 และ -2 ทำให้เกิดการตอบสนองแบบ apoptotic cell death ซึ่งนำไปสู่ฤทธิ์ต้านมะเร็งในที่สุด ⁽¹⁵⁶⁾

ปี 2009 Laurence Kegah Nzowa และคณะ ศึกษา *Entada rheedii* ซึ่งเป็นพืชพันธุ์ไม้ประเภทออกฝักเช่นเดียวกับกระถิน ทองหลวง ถั่ว พบตามเขตร้อนของแอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษพบว่า saponins ซึ่งเป็นประกอบหลัก สามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ (A431 cell lines) ⁽¹⁵⁷⁾

ปี 2009 Boglarka Csupor – Loffler และคณะ ศึกษา *Achillea millefolium* ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งพบในยุโรป อเมริกาเหนือ โบคัลยาไบเฟิร์น ดอกสีขาว ในด้านการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (antiproliferative activities) ที่มีต่อ cervix epithelial adenocarcinoma (HeLa) breast epithelial adenocarcinoma (MCF-7) และ skin epidermoid carcinoma (A431) การศึกษาพบว่า centaureidin เป็นส่วนประกอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ⁽¹⁵⁸⁾

ปี 2010 Bence Csapi และคณะ ศึกษา *Centaurea arenaria* ซึ่งเป็นพืชสายพันธุ์ธัญญาธิยณ อยู่ใน Asteraceae family การศึกษาพบว่า chloroform extract ของพืชชนิดดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (antiproliferative) ต่อเซลล์ cervix adenocarcinoma (HeLa) breast adenocarcinoma (MCF 7) และ skin epidermoid carcinoma (A431) ⁽¹⁵⁹⁾

ปี 2011 Vijayalakshmi Nandakumar และคณะ ได้ศึกษาผลของชาเขียวต่อมะเร็งผิวหนัง ในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่า epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ลด global DNA methylation levels ใน A431 cells ได้ในลักษณะ dose-dependent EGCG ลดระดับของ 5-methylcytosine, DNA methyl transferase (DNMT) activity, mRNA, และ protein levels of DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b EGCG ลด histone deacetylase activity และเพิ่มระดับของ acetylated lysine 9 และ 14 บน histone H3 และเพิ่มระดับของ acetylated lysine 5, 12, 16 บน histone H4 EGCG มีผลทำให้มีการ reexpression ของ mRNA และ proteins of silenced tumor suppressor genes, P16^{INK4a} และ Cip1/p21 สรุปคือชาเขียวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนัง (anti-skin carcinogenic effects) ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง ⁽¹⁶⁰⁾

ปี 2008 Lynn C. Burgess และคณะ ศึกษาผลของ lycopene ที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A431 cell line) การศึกษาพบว่า lycopene ไม่สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ ⁽¹⁶¹⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (Horizontal Laminar Airflow Cabinets) บริษัท Nuaire
2. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO₂ incubator) บริษัท Nuaire
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ บริษัท International equipment company
4. Microplate reader บริษัท Thermo electron corporation
5. เครื่อง electrophoresis บริษัท C.B.S. scientific corporation

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma
2. Fetal Bovine Serum บริษัท PAA
3. Hank's BSS (1X) บริษัท PAA
4. Hoechst 33342 trihydrochloride, trihydrate บริษัท Invitrogen
5. MTT บริษัท USB
6. DMEM บริษัท Gibco
7. Trypan blue บริษัท Sigma
8. Phosphate Buffered Saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ PH 7.2
9. Tween 20 เข้มข้น 0.15%
10. น้ำกลั่น

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431
เลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม Fetal Bovine Serum เข้มข้น 10% และ Streptomycin (100 ugml⁻¹) และ penicillin (100 IUml⁻¹) ใน culture flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนเซลล์เจริญเต็ม

culture plate แล้วจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์โดยใช้สารละลาย Trypsin / EDTA pH 7.3 ทำให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับผิวหน้า culture flask หลุดออกจากผิวหน้า culture flask จากนั้นปั่นล้างเซลล์ที่ 1800rpm เป็นเวลา 5 นาที และนำมาเลี้ยงตั้งวิธีการข้างต้น โดยเพิ่มขนาดของ culture flask เป็น 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ด้วยวิธี MTT ⁽⁶⁴⁾

ใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวนประมาณ 6.4×10^5 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมของ 96 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบ จากกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก แล้วเติม MTT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 3.03

3. การทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ กลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A 431

ใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวนประมาณ 8.8×10^5 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมของ 96 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบ กลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละช่วงเวลา ดังกล่าว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก แล้วเติม MTT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออกจากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่าโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 3.03

4. การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

4.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส

ใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวนประมาณ 5×10^5 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ disc จำนวน 3 disc บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออกจากนั้นเติมสารสกัดหยาบ กลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ในช่วงเวลานั้น ๆ แล้วย้อมด้วยสีย้อม Hoechst 33342 ⁽¹⁶²⁾ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นล้างด้วย 1X PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงตรวจดูรูปร่างลักษณะของนิวเคลียส บนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence

4.2 การแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ⁽¹⁶³⁾

1. ใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวนประมาณ 5×10^5 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อหลุมของ 36 mm culture disc บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบเวลาดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออกจากนั้นเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมเติมสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็น

เวลา 3,6 และ 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์ตามขั้นตอนต่อไป

3. ดูดส่วน medium ถ่ายใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที เท supernatantทิ้งเพื่อเก็บ detached cell

4. ส่วน adherent cell ที่ติดอยู่ใน dish ให้ lysis cell ด้วย 400 ไมโครลิตร lysis buffer [10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 0.5% Triton X-100]

5. เอาส่วนข้อ 3 มารวมกับส่วนข้อ 4 แล้ว suspend ให้เซลล์กระจายตัวดีนำไปincubate ไว้ที่ -20 °C ซ้ำมคืน

6. นำเซลล์ที่ lysis แล้วมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C นาน 15 นาที แล้วดูด supernatant ถ่ายใส่หลอดใหม่

7. สกัดแยกโปรตีนออกด้วยวิธีสกัดโดยสารละลาย Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) ปริมาตรประมาณ 400 ไมโครลิตร (เป็นสัดส่วน 1 เท่าของ supernatant ที่ได้จากข้อ 6) ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดคว่ำ-หงาย (inverting mix) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C นาน 15 นาที สารละลายจะแยกออกเป็นสองชั้น ให้ดูดสารละลายชั้นบน (ชั้น Tris) ออกถ่ายใส่หลอดทดลองใหม่

8. ตกตะกอน DNA โดยเติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายชั้นบนที่ดูดได้ ทำการผสมแบบ inverting ในขั้นตอนนี้ แอลกอฮอล์จะไปดึงเอาโมเลกุลน้ำตาลรอบๆ โมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนแยกตัวออกมาจากสารละลาย นำไปตกตะกอนที่ -20 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

9. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C นาน 15 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ชั้บ alcohol โดยคว่ำหลอดกับกระดาษชั้บ เติม 75% ethanol แห้งเย็น ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

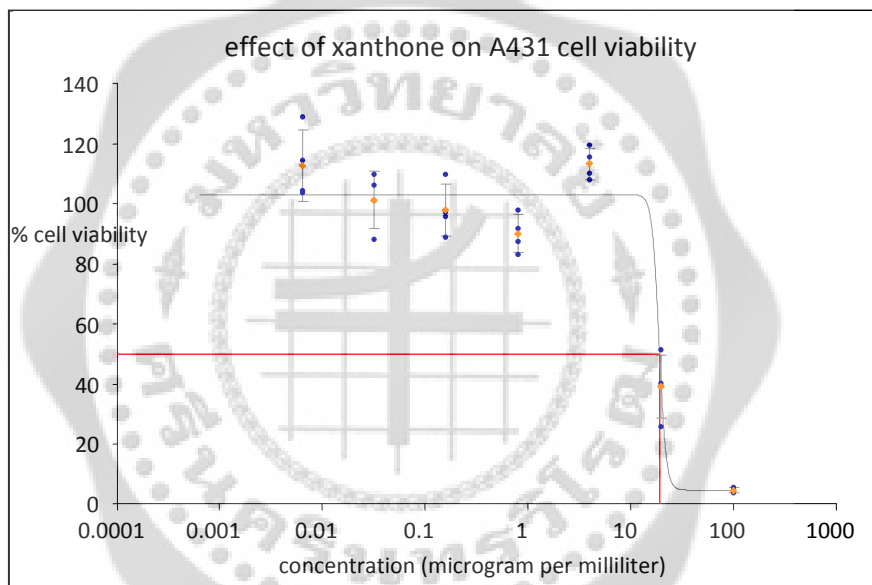
10. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C นาน 15 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ชั้บ alcohol โดยคว่ำหลอดกับกระดาษชั้บ ตั้งทิ้งไว้ใน alcohol ระเหยจนตะกอนดีเอ็นเอค่อนข้างแห้ง (ประมาณ 20-30 นาที)

11. นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายในสารละลาย TE buffer (pH 8.0) ปริมาตร 10-50 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอที่สังเกตเห็นได้ โดยประมาณ 20 ไมโครลิตร) ทิ้งไว้ให้ตะกอนละลายสมบูรณ์ประมาณ 30 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis, 50 V, 0.5x TBE

บทที่ 4 ผลการทดลอง

1. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431

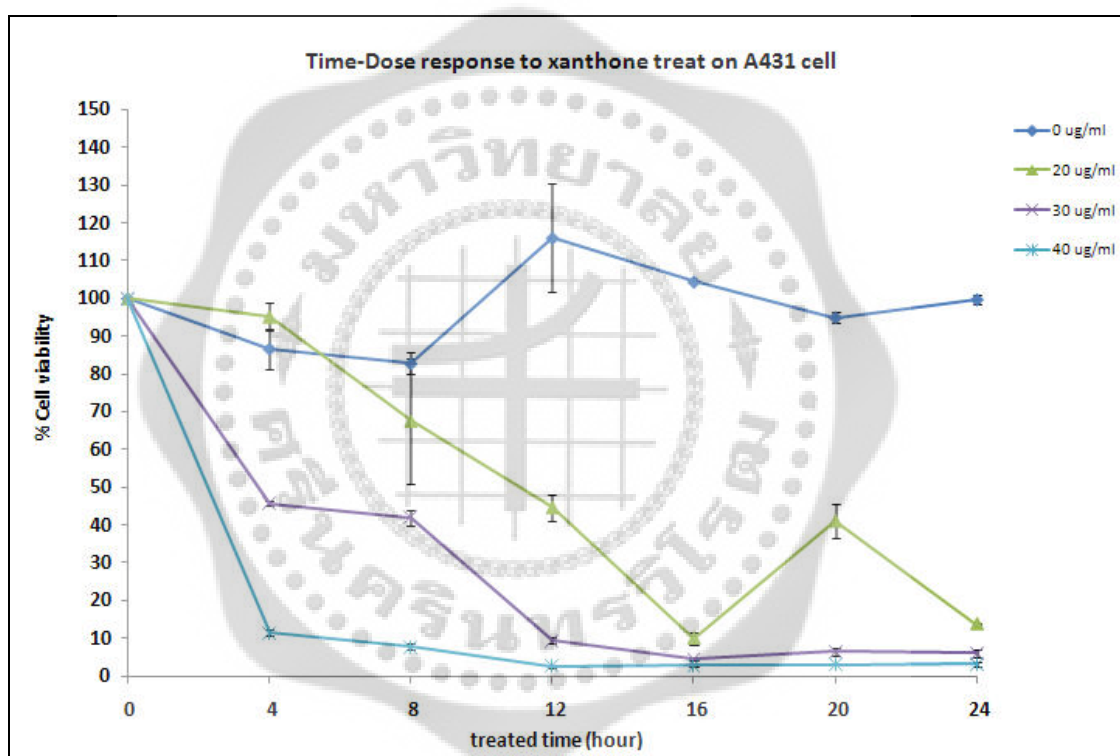
หลังจากทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone พบว่ามีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 โดยมีค่า IC_{50} ที่ 19.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 41) ดังนั้นจึงนำค่า IC_{50} ที่ได้มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431



ภาพประกอบ 41 กราฟแสดงผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ด้วยวิธี MTT (MTT assay) โดยใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวนประมาณ 6.4×10^5 เซลล์ แล้ววัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 3.03

2. ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

การทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ที่ 30, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถทำลายเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ได้ดีในช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง (รูปที่ 42) ดังนั้นจึงนำค่าที่ได้มาศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ที่ถูกฆ่าโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone



ภาพประกอบ 42 กราฟผลการทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวนประมาณ 8.8×10^5 เซลล์ สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ความเข้มข้น 0, 20, 30, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 24 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละช่วงเวลาดังกล่าวดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก แล้วเติม MTT ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเติม DMSO แล้วนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง

microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่าโดยใช้โปรแกรม

GraphPad Prism Version 3.03

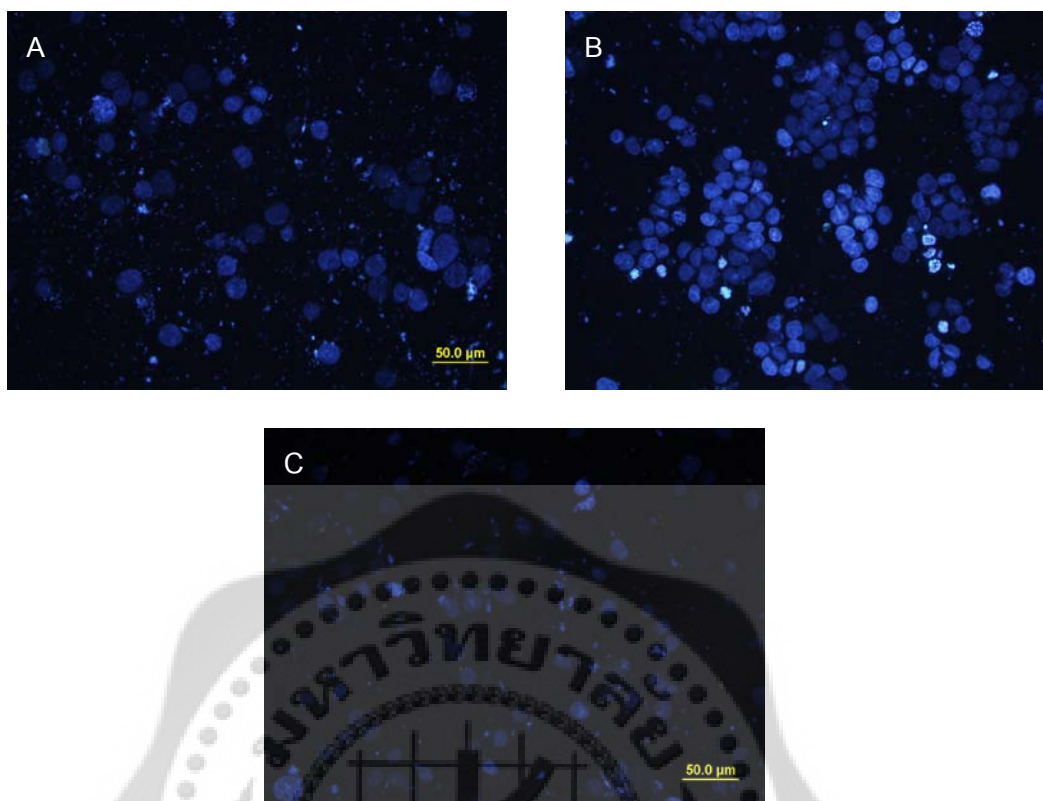
3. การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

3.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส

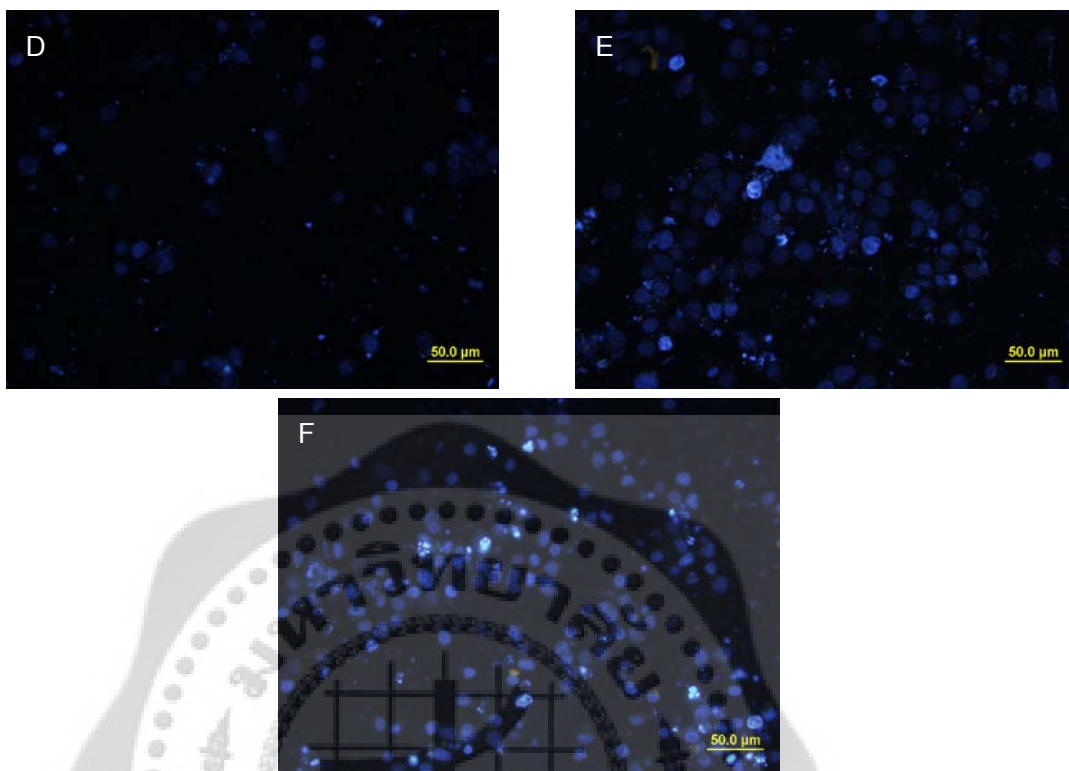
เมื่อเซลล์เกิด apoptosis นิวเคลียสจะเริ่มมีการหดตัวและมีการรวมตัวกันของ chromatin (chromatin condensation) ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงและมีการหดตัวกันของ chromatin เป็นจุดๆ ภายในเซลล์

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถพบเซลล์มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เห็นได้ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถพบเซลล์มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เห็นได้ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงและ 6 และตรวจพบลักษณะดังกล่าวได้ชัดเจนกว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



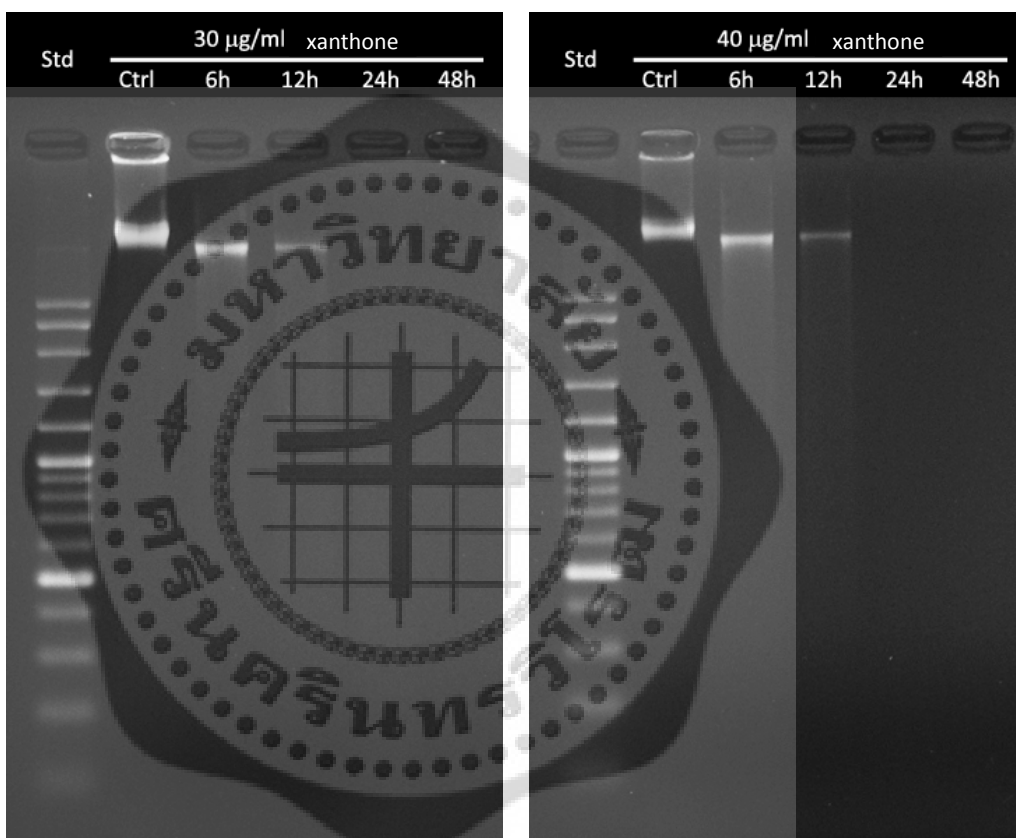
ภาพประกอบ 43 การศึกษาการเกิด apoptosis โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 โดยใช้เซลล์มะเร็งผิวหนังจำนวน 5×10^5 เซลล์ย้อมด้วยสี Hoechst ที่ความเข้มข้นและเวลาดังนี้ (A) control (B) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 3 ชั่วโมง (C) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 6 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 44 การศึกษาการเกิด apoptosis โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของ เซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 โดยใช้เซลล์มะเร็งผิวหนังจำนวน 5×10^5 เซลล์ย้อมด้วยสี Hoechst ที่ความเข้มข้นและเวลาดังนี้ (D) control (E) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 3 ชั่วโมง (F) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 6 ชั่วโมง

3.2 การตรวจสอบการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) โดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis DNA fragmentation

เมื่อทำการทดสอบการแตกหักของ DNA โดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลา 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง ยังไม่พบการแตกหักของ DNA



ภาพประกอบ 45 การตรวจสอบความแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ในเซลล์มะเร็ง

ผิวหนัง A431 ซึ่งทำการสกัด DNA ด้วย Phenol chloroform จากเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 จำนวน 50,000 เซลล์ จากนั้นนำมาแยกด้วย agarose gel electrophoresis

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด พบว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดมีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ดีโดยมีค่า IC_{50} ที่ 19.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ IC_{50} มาปรับเพื่อหาช่วงเวลาที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด จากการทดลองพบว่าสารสกัดกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดที่ช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากกราฟแสดงผลการทดลอง ที่เวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงใช้ค่าความเข้มข้นและช่วงเวลาดังกล่าวมาทำการทดลองเพื่อดูลักษณะการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นแบบ apoptosis ต่อไป

การศึกษากการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ในงานวิจัยนี้จะศึกษาโดยดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสและการตรวจสอบการแตกหักของ DNA อาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยลักษณะการตายแบบ apoptosis นั้น เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะหดตัวและหลุดออกจากการเกาะเกี่ยวของเซลล์เพื่อนบ้าน มีการขดแน่นของโครมาตินมาอยู่บริเวณขอบของนิวเคลียส ผนังเซลล์ไม่เรียบมีลักษณะเหมือนตุ่มยื่นออกมา (membrane blebbing) DNA จะหักเป็นท่อนตรงช่วงระหว่าง internucleosome สารต่าง ๆ ในเซลล์รวมตัวกันเป็นก้อน (apoptotic bodies)

จากการศึกษาโดยดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ณ ช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง สามารถพบเซลล์มะเร็งมีขนาดเล็กลง มีการรวมตัวกันของ chromatin ได้อย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้

การศึกษากการแตกหักของ DNA โดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยังไม่พบการแตกหักของ DNA

จากผลการทดลองทั้งหมดในงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A431 ได้โดยเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ งานวิจัยขั้นต่อไปที่ควรศึกษาต่อในระดับที่สูงขึ้นคือศึกษากลไกการตายแบบ apoptosis ในระดับโมเลกุลทั้ง extrinsic pathway และ intrinsic pathway ต่อไปเพื่อที่จะทราบ

ถึงกลไกการตายแบบ apoptosis ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่นศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น Bcl-2 หรือศึกษาโดยวิธี flow cytometry เพื่อดู cell cycle ระยะ G0-G1 ต่อไป



บรรณานุกรม

1. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002;146(61):1-6.
2. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*. 2000;89:1269-79.
3. Jemal A, Devesa S, Hartge P. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:678-83.
4. Levi F, Te V, Randimbison L. Trends in incidence of various morphologies of malignant melanoma in Vaud and Neuchatel. Switzerland *Melanoma Res* 2005;15:73-5.
5. Mansson-Brahme E, Johansson H, Larsson O. Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta Oncol* 2002;41:138-46.
6. Ocana-Riola R, Martinez-Garcia C, Serrano S. Population-based study of cutaneous malignant melanoma in the Granada province (Spain). *Eur J Epidemiol* 2001;17:169-74.
7. Stang A, Jockel K. Declining mortality rates for nonmelanoma skin cancers in West Germany, 1968-99. *Br J Dermatol* 2004;150:517-22.
8. Weinstock M. Epidemiologic investigation of nonmelanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. *J Invest Dermatol* 1994;102:6s-9s.
9. Weinstock M. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: clinical issues, definitions and classification. *J Invest Dermatol* 1994;102:4s-5s.
10. Gray D, Suman V, Su W. Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Arch Dermatol* 1997;133:735-40.
11. Hannuksela-Svahn A, Pukkala E, Karvonen J. Basal cell skin carcinoma and other nonmelanoma skin cancers in Finland from 1956 through 1995. *Arch Dermatol* 1999;135:781-6.

12. Iversen T, Tretli S. Trends for invasive squamous cell neoplasia of the skin in Norway. *Br J Cancer*. 1999;81:528-31.
13. Karagas M, Greenberg E, Spencer S. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int J Cancer* 1999;81:555-9.
14. Staples M, Marks R, Giles G. Trends in the incidence of nonmelanocytic skin cancer (NMSC) treated in Australia 1985-1995: are primary prevention programs starting to have an effect? . *Int J Cancer* 1998;78:144-8.
15. Weinstock M. Issues in the epidemiology of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998;12:681-98.
16. Stern R. The mysteries of geographic variability in nonmelanoma skin cancer incidence. *Arch Dermatol* 1999;135:843-4.
17. Raasch B, Buettner P. Multiple nonmelanoma skin cancer in an exposed Australian population. *Int J Dermatol* 2002;41:652-8.
18. Athas W, Hunt W, Key C. Changes in nonmelanoma skin cancer incidence between 1977-1978 and 1998-1999 in Northcentral New Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1105-8.
19. Katalinic A. Population-based cancer registration in Germany. Essentials and perspectives. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2004;47:422-8.
20. Armstrong B, Krickler A, English D. Sun exposure and skin cancer. *Australas J Dermatol* 1997;38(suppl 1):s1-s6.
21. Armstrong B, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:8-18.
22. MacLennan R, Green A, McLeod G. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1427-32.
23. Rigel D, Carucci J. Malignant melanoma: prevention, early detection and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin* 2000;50:215-36.

24. Stang A, Stang K, Stegmaier C. Skin melanoma in Saarland: incidence, survival and mortality 1970-1996. *Eur J Cancer Prev* 2001;10:407-15.
25. Bulliard J, Cox B, Semenciw R. Trends by anatomic site in the incidence of cutaneous malignant melanoma in Canada, 1969-93. *Cancer Causes Control* 1999;10:407-16.
26. De Vries E, Bray F, Coebergh J. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer*. 2003;107:119-26.
27. Geller A, Miller D, Annas G. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *JAMA*. 2002;288:1719-20.
28. Anonymus. Stat bite: Incidence of and mortality from melanoma of the skin, 1975-2000. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:933.
29. Marrett L, Nguyen H, Armstrong B. Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996. *Int J Cancer* 2001;92:457-62.
30. Jones W, Harman C, Ng A. Incidence of malignant melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. *World J Surg* 1999;23:732-5.
31. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:459-63.
32. Stracci F, Minelli L, D'Alo D. Incidence, mortality and survival trends of cutaneous melanoma in Umbria, Italy. 1978-82 and 1994-98. *Tumori*. 2005;91:6-8.
33. Vinceti M, Bergomi M, Borciani N. Rising melanoma incidence in an Italian community from 1986 to 1997. *Melanoma Res* 1999;9:97-103.
34. Osterlind A, Hou-Jensen K, Moller J. Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types and comparison with nonmelanoma skin cancer. *Br J Cancer* 1988;58:385-91.
35. de Vries E, Bray F, Eggermont A. Monitoring stage-specific trends in melanoma incidence across Europe reveals the need for more complete information on diagnostic characteristics. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:387-95.

36. Motley R, Kersey P, Lawrence C. Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2002;146:18-25.
37. Rigel D, Cockerell C, Carucci J, Wharton J. Actinic keratosis , basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, editors. *Dermatology* 2 nd ed. Spain: Mosby Elsevier; 2008. p. 1641-59.
38. Yegnanarayana R, Sarat A, Balwani J. Comparison of anti-inflammatory activity of various extracts of *Curcumin longa*. *Indian J Med Res* 1976;64:601-8.
39. Kuttan R. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcumin longa*). *Cancer Lett.* 1985;29(2):197-202.
40. Rafatullah S. Evaluation of turmeric (*Curcumin longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rat. *J Ethnopharmacol.* 1990;29(1):25-34.
41. Belman S. Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. *Carcinogenesis.* 1983;4:1063-5.
42. Sparnins V, Mott A, Barany G, Wattenberg L. Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse. *Nutr Cancer.* 1986;8:211-5.
43. Wargovich M. Diallyl sulfide, a flavor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Carcinogenesis.* 1987;8:487-9.
44. Wargovich M, Woods C, Eng V, Stephens L, Gray K. Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Res.* 1988;48:6872-5.
45. Sumiyoshi H, Wargovich M. Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res.* 1990;50:5084-7.
46. Reddy B, Rao C, Rivenson A, Kelloff G. Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res.* 1993;53:3493-8.

47. Takahashi S, Hakoi K, Yada H, Hirose M, Ito N, Fukushima S. Enhancing effects of diallyl sulfide on hepatocarcinogenesis and inhibitory actions of the related diallyl disulfide on colon and renal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 1992;13:1513-8.
48. Schaffer E, Liu J, Green J, Dangler C, Milner J. Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N-methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis. *Cancer Lett*. 1996;102:199-204.
49. Wattenberg L, Spornins V, Barany G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res*. 1989;49:2689-92.
50. Suzui N, Sugie S, Rahman K, Ohnishi M, Yoshimi N, Wakabayashi K, et al. Inhibitory effects of diallyl disulfide or aspirin on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res*. 1997;88:705-11.
51. Lansky E, Newman R. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;109:177-206.
52. Chan J. Pharmacokinetic drug interactions of vinca alkaloids : summary case reports. *Pharmacotherapy*. 1998;18(6):1304-7.
53. Woo H, Swenerton K, Hoskins P. Taxol is active in platinum resistant endometrial adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1996;19(3):290-1.
54. Shan T, Ma Q, Guo K, Liu J, Li W, Wang F, et al. Xanthones from Mangosteen Extracts as Natural Chemopreventive Agents :Potential Anticancer Drugs. *Curr Mol Med*. 2011;11(8):666-77.
55. Linuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, et al. Antibacterial activity of xanthones from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol*. 1996;48(8):861-5.
56. Chen S, Wan M, Loh B. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Medica*. 1996;62:381-2.

57. Gopalakrishnan G, Banumathi B, Suresh G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *J Nat Prod.* 1997;60:519-24.
58. Ngawhirunpat T, Opanasopi P, Sukma M, Sittisombut C, Kat A, Adachi I. Antioxidant , free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Pharm biol.* 2010;48(1):55-62.
59. Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation , antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004;90:161-6.
60. Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, et al. Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod.* 2003;66:1124-7.
61. Ho C. Garcinone E , a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med.* 2002;68(11):975-9.
62. Yoshihito N. Characterized mechanism of alpha mangostin-induced cell death : Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem.* 2007;15:5620-8.
63. Anthony C. A review of mangosteen (*Garcinia mangostana*) Linn. Dweck data. American Cancer Society Cancer facts and figuresAtlanta , Ga. 1995.
64. Mosmann T. Rapid colorimetric for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immuno Methods* 1983;65:55-63.
65. ธีรฉัตร ทองตัน . การตายของเซลล์ (Cell death and apoptosis). เซลล์ชีววิทยาทาง การแพทย์ 2 กลไกการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อ กรุงเทพฯ ภาควิชาชีวเคมี คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2549. หน้า 111-24.
66. ชรินทร์ ลิ้มวงศ์ . ศัพท์านุกรมเวชพันธุศาสตร์ กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน 2549.

67. ญัฐฐา รัชตะนาวิณ . ผลของแสงแดดต่อผิวหนังในระยะยาว ผิวหนังชราจากแสงแดดและมะเร็งผิวหนัง ใน : ญัฐฐา รัชตะนาวิณ , editor. แสงแดดและผิวหนัง Sunlight and skin พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ งานตำราวารสารและสิ่งพิมพ์ สถานเทคโนโลยีการศึกษาแพทยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 2547. หน้า 83-90.
68. Black H, deGruijl F, Forbes P, Cleaver J, Ananthaswamy H, deFabo E, et al. Photocarcinogenesis : an overview. J Photobiol B 1997;49(1):29-47.
69. Urbach F. The cumulative effects of ultraviolet radiation on the skin : photocarcinogenesis In: Hawk J, editor. Photodermatology 1 st ed. London: Amold; 1999. p. 89-102.
70. Miller D, Weinstock M. Nonmelanoma skin cancer in the United states : incident J Am Acad Dermatol 1994;30(5 Pt 1):774-8.
71. Megregor J. The history of human photobiology In: Hawk J, editor. Photodermatolog. London: amold; 1999. p. 1-4.
72. de Gruijl F, Sterenborg H, Forbes P, Davies R, Cole C. Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice Cancer Res. 1993;53(1):53-60.
73. Stern R, Lange R. Non-melanoma skin cancer occurring in patients treated with PUVA five to ten years after first treatment. J Invest Dermatol 1988;91(2):120-4.
74. Sutherland B, Harber L, Kochevar I. Pyrimidine dimer formation and repair in human skin. Cancer Res 1980;40(9):3181-5.
75. Brash D, Rudolph J, Simon J, Lin A, McKenna G, Baden H, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(22):10124-8.
76. Hall PA, Mckee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. Oncogene 1993;8(1):203-7.

77. Ziegler A, Jonason A, Simon J, Leffell D, Brash DE . Tumor suppressor gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 1996;63(4):432-5.
78. Kripke M. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(5):1333-6.
79. Ullrich S. Photoimmune suppression and photocarcinogenesis. *Front Biosci* 2002;7:684-703.
80. Berg D, Otley C. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology , pathogenesis , and management .*J Am Acad Dermatol* 2002;47(1):1-17.
81. Armstrong K. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol* 2001;63(1-3):8-18.
82. Marks R, Staples M, Giles G. Trends in non-melanocytic skin cancer treated in Australia: the second national survey. *Int J Cancer* 1993;53(4):585-90.
83. Deerasamee S, Martin N, Sontipong S. Cancer in Thailand Vol. II , 1992-1994 Lyon: International agency for research on cancer :World health organization 1999(Reort No. :IARC Technical report No. 34).
84. Stenbeck K, Balanda K, Williams M, Ring I, MacLennan R, Chick J, et al. Patterns of treated non-melanoma skin cancer in Queensland-the region with the highest incidence rates in the world. *Med J Aust* 1990;153(9):511-5.
85. Glass A, Hoover R. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *Jama* 1989;262(15):2097-100.
86. Scotto J, Pitcher H, Lee J. Indications of future decreasing trends in skin-melanoma mortality among whites in the United States. *Int J Cancer* 1991;49(4):490-7.
87. Ley R. Dose response for ultraviolet radiation A-induced focal melanocytic hyperplasia and nonmelanoma skin tumors in *Monodelphis domestica*. *Photochem Photobiol* 2001;73(1):20-3.
88. Ley R. Ultraviolet radiation A-induced precursors of cutaneous melanoma in *Monodelphis domestica*. *Cancer Res* 1997;57(17):3682-4.

89. Setlow R, Woodhead A, Grist E. Animal model for ultraviolet radiation –induced melanoma: platyfish-swordtail hybrid. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86(22):8922-6.
90. Setlow R, Grist E, Thompson K, Woodhead A. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90(14):6666-70.
91. Pfahlberg A, Kolmel K, Gefeller O. Timing of excessive ultraviolet radiation and melanoma: epidemiology does not support the existence of a critical period of high susceptibility to solar ultraviolet radiation induced melanoma. Br J Dermatol 2001;144(3):471-5.
92. Westerdahl J, Ingvar C, Masback A, Jonsson N, Olsson H. Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity. Br J Cancer 2002;82(9):1593-9.
93. Beral V, Evans S, Shaw H, Milton G. Malignant melanoma and exposure to fluorescent lighting at work. Lancet 1982;2(8293):290-3.
94. Stern R, Nichols K, Vakeva L. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA) The PUVA Follow-up Study. N Engl J Med 1997;336(15):1041-5.
95. Hannuksela-Svahn A, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Lindelof B, Berne B, Hannuksela M, et al. Trioxsalen bath PUVA did not increase the risk of squamous cell carcinoma and cutaneous malignant melanoma in a joint analysis of 944 Swedish and Finnish patients with psoriasis. Br J Dermatol. 1999;141(3):497-501.
96. Lindelof B, Sigurgeirsson B, Tegner E, Larko O, Johannesson A, Berne B, et al. PUVA and cancer risk: the Swedish follow-up study Br J Dermatol 1999;141(1):108-12.
97. กิตติศักดิ์ สุธรรมจริยา . Malignant skin tumors ใน :ปรีญา กุลละวณิชย์ , ประวิตร พิศาลบุตร , บรรณิการ. ตำราโรคผิวหนังในเวชปฏิบัติปัจจุบัน Dermatology 2010 กรุงเทพฯ: โฮลิสติก แพทย์ซิ่ง; 2548. หน้า 538-52.

98. Carucci J, Leffell D. Basal cell carcinoma In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D, editors. Fitzpatrick ' s Dermatology in general medicine. 7 th ed. New York McGraw-Hill 2008. p. 1036-42.
99. Rudolph R. Subungual basal cell carcinoma presenting as longitudinal melanonychia. *J Am Acad Dermatol*. 1987;16:229-33.
100. Kirkham N. Tumors and cysts of the epidermis In: Elder D, editor. Lever ' s Histopathology of the skin 10 ed. Philadelphia Lippincott Williams&Wilkins 2009. p. 791-849.
101. Grossman D, Leffell D. Squamous cell carcinoma In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D, editors. Fitzpatrick ' s Dermatology in general medicine 7 th ed. New York McGraw-Hill 2008. p. 1028-36.
102. Giles G, Marks R, Foley P. The incidence of non melanoma skin cancer in Australia. *Br Med J* 1988;296:13-7.
103. Chuang T, Popescu N, Su W, Chute C. Squamous cell carcinoma: a population based incidence study in Rochester Minnesota. *Arch Dermatol* 1990;126:185-8.
104. Johnson T. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol*. 1992;26:467.
105. Stern R, Lange R. Non-melanoma skin cancer occurring in patients treated with PUVA five to ten years after first treatment. . *J Invest Dermatol* 1988;91:120.
106. Markey A. Etiology and pathogenesis of squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol* 1995;13:537.
107. Gupta A. Cutaneous malignant neoplasms in patients with renal transplants. *Arch Dermatol* 1986;122:1288.
108. Weimar V. Aggressive biologic behavior of basal and squamous cell cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia or chronic lymphocytic lymphoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1979;5:609.
109. Bernstein S. The many faces of squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* 1996;22:243.

110. Mora R, Perniciaro C. Cancer of the skin in blacks. I. A review of 163 black patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1981;5:535.
111. Smoller B, Kwaon T, Said J, Banks-Schlegel S. Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin : immunohistochemical localization of involucrin and keratin proteins *J Am Acad Dermatol* 1986;14:226-34.
112. Kimyai-Asadi A, Alam M, Goldberg L. Efficacy of narrow-margin excision of well-demarcated primary facial basal cell carcinomas. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:464-8.
113. Spiller W, Spiller R. Treatment of basal cell epithelioma by curettage and electrodesiccation. *J Am Acad Dermatol* 1984;11:808-14.
114. Honeycutt W, Jansen G. Treatment of squamous cell carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 1973;108:670-2.
115. Barlow J, Zalla M, Kyle A. Treatment of basal cell carcinoma with curettage alone. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:1039-45.
116. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane Database Syst Rev* [database on the Internet]2003.
117. Barrett T, Greenway JH, Massullo V, Carlson C. Treatment of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma with perineural invasion. *Adv Dermatol* 1993;8:277-304.discussion 5.
118. Marmur E, Schmults C, Goldberg D. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg* 2004;30:264-71.
119. Rhodes L, de Rie M, Enstrom Y. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol* 2004;140:17-23.
120. Jorizzo J, Carney P, Ko W. Fluorouracil 5% and 0.5% creams for the treatment of actinic keratosis: equivalent efficacy with a lower concentration and more convenient dosing schedule. *Cutis* 2004;74:18-23.

121. Nelson C, Rigel D, Smith S. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol* 2004;3:401-7.
122. Saldanha G, Fletcher A, Slater D. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. *Br J Dermatol* 2003;148:195-202.
123. Peris K, Campione E, Micantonio T. Imiquimod treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: 12-week open-label trial. *Dermatol Surg* 2005. 2005;31:318-23.
124. Patel G, Goodwin R, Chawla B. Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:1025-32.
125. Tucker S, Polasek J, Perri A, Goldsmith E. Long-term follow-up of basal cell carcinomas treated with perilesional interferon alfa 2b as monotherapy. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:1033-8.
126. Ceilley R, Del Rosso J. Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 2006;45:489-98.
127. Moore B, Weber R, Prieto V. Lymph node metastases from cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2005;11:1561-7.
128. Harwood C, Leedham-Green M, Leigh I, Proby C. Low-dose retinoids in the prevention of cutaneous squamous cell carcinomas in organ transplant recipients: a 16-year retrospective study. *Arch Dermatol* 2005;141:456-64.
129. Neuhaus I, Tope W. Practical retinoid chemoprophylaxis in solid organ transplant recipients. *Dermatol Ther* 2005;18:28-33.
130. Holzle E, Kind P, Plewig G, Burgdorf W. Malignant melanoma , diagnosis and differential diagnosis. New York Schattauer Stuttgart 1993.
131. Evans R, Kopf A, Lew R, Rigel D, Friedman R. Risk factors for the development of malignant melanoma : review of case control studies. *J Dermatol Surg Oncol*. 1988;14:393.

132. Sober A. Cutaneous melanoma in the Northeastern United States. In: Balch C, Milton G, editors. Cutaneous melanoma: clinical management and treatment results worldwide Philadelphia: JB Lippincott 1985. p. 437-46.
133. Paek SC, Sober AJ, Tsao H, Mihm JM, TM J. Cutaneous melanoma In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D, editors. Fitzpatrick 's Dermatology in general medicine. 7 th ed. New York McGraw-Hill 2008. p. 1134-57.
134. Clark WJ, Mihm MJ. Lentigo maligna and melanoma Am J Pathol 1996;55:39.
135. Cochran A, Wen D. S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumors. Pathology 1985 17:340.
136. Wick M, Swanson P, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB 45: an immunohistochemical study of 200 paraffin embedded cutaneous tumors J Cutan pathol. 1988;15:201.
137. Clark WJ, From L, Bernardino E, Mihm MJ. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. Cancer Res 1969;29:705-26.
138. Breslow A. Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1979;172:902-8.
139. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก . วัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) ใน : สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก , ชัยวัฒน์ สว่างคง , บรรณานธิการ . เซลล์ชีววิทยาทางการแพทย์ 2 กลไกการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อ กรุงเทพฯ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2549. หน้า 91-109.
140. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell 5 th ed. New York Garland science 2008.
141. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M. Molecular cell biology 5 th ed. New York W. H . Freeman 2004.
142. Earnshaw W, Martins L, Kaufmann S. Mammalian caspase: structure, activation, substrates and functions during apoptosis Annu Rev Biochem 1999;68 383-424.

143. Benedict C, Norris P, Ware C. To killed or be killed : viral evasion of apoptosis. Nat Immunol. 2002;3(11):1013-8.
144. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก . การเจริญของเซลล์และมะเร็ง (cell growth and cancer). ใน: สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก , ชัยวัฒน์ สว่างคง , บรรณานิการ. เซลล์ชีววิทยาทางการแพทย์ 2 กลไกการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อ กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2549. หน้า 279-94.
145. Mahabusarakam W, Iriyachitra P, Taylor W. Journal of natural products. 1987;50:474-8.
146. Nakamura S, Qu Y, Xu F. Structures of new monoterpenes from Thai herbal medicine curcuma comosa. Chem&Pharm Bull. 2008;56(11):1604-6.
147. Mahabusarakam W, Wiriyaichitra P, Phongpaichit S. Antibicrobial activities of chemical constituents from garcinia-mangostana linn. J Sci Soci Thai. 1986;12(4):239-43.
148. Balasubramanian K, Rajagopalan K. Novel xanthenes from garcinia-mangostana,structures of xanthone-A and xanthone-B. Phytochemistry. 1988;27(5):1552-4.
149. Chomnawang M, Surassmo S, Nukoolkarn V. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. J Ethnopharmacology. 2005;101(1-3):330-3.
150. Kondo M, Zhang L, Ji H. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. J Agr Food Chem. 2009;57(19):8788-92.
151. Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. Chem Pharm Bull. 2006;54(3):301-5.
152. Limei Y. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. Food Chem. 2007;104:176-81.

153. Ahmad N, Feyes D, Nieminen A, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal of the national cancer institute* 1997;89(24):1881-6.
154. Kamuhabwa A, Nshimo C, Witte P. Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology* 2000;70:143-9.
155. Ahmad N, Gupta S, Husain M, Heiskanen K, Mukhtar H. Differential antiproliferative and apoptosis response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical cancer research* 2002 6 April 2000;6:1524-8.
156. Bhatia N, Agarwal C, Agarwal R. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr cancer* 2001;39(2):292-9.
157. Nzowa L, Barboni L, Teponno R, Ricciutelli M, Lupidi G, Quassinti L, et al. Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from *Entada rheedii* *Phytochemistry*. 2010;71(254-61).
158. Csupor-Löffler B, Hajdu Z, Zupko I, Rethy B, Falkay G, Forgo P, et al. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines *Phytother Res* 2009;23:672-6.
159. Csapi B, Hajdu Z, Zupko I, Berenyi A, Forgo P, Szabo P, et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res* 2010;24:1664-9.
160. Nandakumar V, Vaid M, Katiyar S. Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* 2011;32(4):537-44.

161. Burgess L, Rice E, Fischer T, Seekins J, Burgess T, Sticka S, et al. Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and noncancerous) in an in vitro system with does across the physiological range. *Toxicology in vitro* 2008;22:1297-300.
162. Ramonede B, Tomas R. Activation of protein kinase C for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin. *Biol pham* 2002;63:463-9.
163. JS S. Curcumin-induced apoptosis of A-431 cells involves caspase-3 activation J *Biochem Mol Biol* 2001;34(3):189-93.



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	แพทย์หญิงแสงสิริ อยู่อำไพ Miss SAENGSIRI YU-AMPAI
วันเดือนปีเกิด	17 กันยายน พ.ศ. 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	30/33 ม.7 ถนนบางนาตราด ตำบลบางแก้ว อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2549	แพทยศาสตรบัณฑิต วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและ วชิรพยาบาล
พ.ศ.2555	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

