

กลไกการเหนี่ยวนำกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งผิวหนัง
เมลาโนมาโดยสารโกโนโอทาลามิน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา
ธันวาคม 2560

กลไกการเหนี่ยวนำกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งผิวหนัง
เมลาโนมาโดยสารโกโนโอทาลามิน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา
ธันวาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กลไกการเหนี่ยวนำกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งผิวหนัง
เมลาโนมาโดยสารโกนีโอทาลามิน



บทคัดย่อ
ของ
ศุภกร ตั้งจิรภักดิ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา
ธันวาคม 2560

ศุภกร ตั้งจิรภักดิ์. (2560). กลไกการเหนี่ยวนำกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง
ผิวหนังเมลาโนมาโดยสารโกนิโอทาลามิน. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ตจวิทยา). กรุงเทพฯ:
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์
ดร.รมิดา วัฒนโกศาสิน, รองศาสตราจารย์นายแพทย์ มนต์รี อุดมเพทายกุล

ปัจจุบันมะเร็งผิวหนังเมลาโนมามีความชุกเพิ่มขึ้น แต่ยังไม่มีการรักษามาตรฐานที่สามารถรักษาให้หายได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาสารโกนิโอทาลามินกับกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในมะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษากระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสของสารโกนิโอทาลามินต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมาชนิด A375

วัตถุประสงค์: ศึกษาผลของสารโกนิโอทาลามินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมาชนิด A375

วิธีการศึกษา: ทดสอบฤทธิ์ของสารโกนิโอทาลามินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารต่อเซลล์ในช่วงเวลาและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ศึกษาฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิดการหลุดตัวของโครมาติน รวมทั้งวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย

ผลการศึกษา :สารโกนิโอทาลามินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิดการแตกหักของโครมาตินรวมทั้งการวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย พบว่าสารสกัดโกนิโอทาลามินเหนี่ยวนำให้เกิดการหลุดตัวของโครมาตินและเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งผิวหนัง

สรุปผล:

สารโกนิโอทาลามินแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมาชนิด A375 ดังนั้นผลการศึกษาสารโกนิโอทาลามินอาจเป็นทางเลือกในการพัฒนาไปเป็นยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งผิวหนังเมลาโนมาได้

MECHAISM OF APOPTOSIS INDUCTION BY GONIOTHALAIN IN MELAMIN IN
MELANOMA CELL

AN ABSTRACT
BY
SUPHAKORN TANGCHIRAKHAPHAN

A large, faint, circular watermark seal of Srinakharinwirot University is centered on the page. The seal features a central emblem with a cross-like design and Thai script around the perimeter.

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
master of science degree in dermatology
at Srinakarinwirot university
December 2017

Suphakorn Tangchirakhaphan. (2017). *Mechanism of Apoptosis Induction by Goniiothalamine in Melanoma Cells. Master's thesis, M.Sc. (Dermatology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc Prof. Ramida Watanapokasin PhD., Assoc Prof. Montree Udompataikul,*

Melanoma is a type of skin cancer. The prevalence of melanoma is on the rise but there is no standard form of treatment. The induction of apoptosis by goniiothalamine has been studied in many cancer cell lines, but has not been seen in melanoma cells.

The purpose of this study was to investigate the effects of goniiothalamine on anti-proliferation and apoptosis induction in the melanoma A375 cell line.

The materials and the methods included cell proliferation and cell viability and nuclear morphological changes and mitochondrial membrane potential were also determined.

Goniiothalamine induced anti-proliferation, nuclear condensation and apoptotic bodies were identified in A375 cells. In addition goniiothalamine-induced mitochondrial membrane dysfunction in A375 cells.

In conclusion, Goniiothalamine showed anti-proliferation and apoptosis induction in A375 cells. These results suggested that goniiothalamine may be a potential candidate for anti-cancer drug development. The underlying mechanisms of apoptosis induction in the melanoma A375 cell line should be examined further.



งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รมิดา วัฒนโกศาสิน ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์นายแพทย์มนตรี อุดมเพทยกุล รองประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัยรวมทั้งได้แนะนำแนวทางอภิปรายและสรุปผลเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ. ดร.สมหญิง พัฒน์ธีรพงศ์ ประธานกรรมการสอบปากเปล่า และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. มาลัย ทวีโชติภัทร์ ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่ารวมทั้งให้คำปรึกษาและช่วยเหลืออย่างมีเมตตาโดยตลอด

ขอขอบคุณ ดร.สุกานดา อินนาจักร และเพื่อนแพทย์ที่ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนอย่างดียิ่งแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมีทุกท่านในความเป็นมิตรและการให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ท้ายนี้คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดามารดา และครอบครัวที่ให้การอุปการะและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยอย่างดีตลอดมา

ศุภกร ตั้งจิรภักดิ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย	1
ความสำคัญของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	2
สมมติฐานการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ผิวหนังของมนุษย์.....	4
โครงสร้างของผิวหนัง	4
มะเร็งผิวหนัง.....	8
กระบวนการ apoptosis	22
วิธีการส่งสัญญาณ Mitogen-activated protein kinase (MAPK)หรือ MAPK signaling pathway.....	26
Akt signaling pathway.....	30
Goniothalamine.....	32
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	35
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	35
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	35
วิธีดำเนินการทดลอง.....	35
4 ผลการศึกษา	40
ผลการศึกษา	40
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม.....	50
ประวัติย่อผู้วิจัย	60

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 การเตรียม stacking gel	38
2 การเตรียม separating gel.....	38



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ภาพตัดขวางแสดงส่วนประกอบของผิวหนังแต่ละชั้น	5
2 ภาพตัดขวางแสดงส่วนประกอบต่างๆในชั้นหนังแท้	6
3 Nodular basal cell carcinoma	10
4 Noduloulcerative basal cell carcinoma.....	10
5 Superficial basal cell carcinoma.....	11
6 pigmented basal cell carcinoma.....	11
7 Sclerosis basal cell carcinoma	12
8 Fibroepithelioma of Pinkus	12
9 พยาธิวิทยาของ basal cell carcinoma.....	13
10 Lower lip squamous cell carcinoma.....	15
11 Erythroplasia of Queyrat.....	16
12 Oral florid papillomatosis	16
13 Epithelioma cuniculatum.....	17
14 พยาธิวิทยาของ squamous cell carcinoma.....	17
15 Superficial spreading malignant melanoma	19
16 Nodular malignant melanoma	20
17 Lentigo malignant melanoma	21
18 Acral lentiginous melanoma	21
19 กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis.....	23
20 วิธีการส่งสัญญาณ MAPK ที่มีการส่งต่อสัญญาณเป็นลำดับขั้นด้วยกระบวนการเติมหมู่ ฟอสเฟต	27
21 การกระตุ้นการทำงานของ MEK และ ERK.....	28
22 การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน JNK.....	29
23 การทำงานของโปรตีน p38	30
24 วิธีการส่งสัญญาณ AKT	31
25 G.macrophyllusหรือชิงดอกเดี๋ยว.....	32
26 โครงสร้างทางเคมีของสารgoniothalamine	33

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

- 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารgoniothalamintต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanomaA375)A) ผลการทดสอบความเป็นพิษที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสาร goniothalaminที่ 24 ชั่วโมง)B) สาร goniothalaminสามารถยับยั้งและลดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง melanomaA375 โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่ใช้ โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 41
- 28 สาร goniothalaminกระตุ้นให้เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง melanomaA375 A) สาร goniothalaminกระตุ้นให้เกิดapoptotic bodies ในเซลล์ที่ได้รับสาร goniothalaminเทียบกับกลุ่มควบคุม B) สาร goniothalaminกระตุ้นให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียซึ่งนำไปสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis 42
- 29 แสดงผลของสารgoniothalaminต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 family ที่ 24 ชั่วโมง หลังได้รับสาร goniothalaminที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 µg/ml(A) แสดงผลของ goniothalaminต่อการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic protein (B) แสดงผลของ goniothalaminต่อการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic protein โดยใช้β-Actin เป็น loading control..... 43
- 30 แสดงผลของสาร goniothalaminต่อการแสดงออกของโปรตีน caspase-9, - และ 7 cleaved-PARP ที่ ชั่วโมงหลังได้รับสาร 24goniothalaminที่ความเข้มข้น 3, 5และ 10µg/ml โดยใช้ β-Actin เป็น loading control 44
- 31 แสดงผลของสาร goniothalaminต่อการแสดงออกของโปรตีน p-PDK1, p-Aktและ total Aktที่ ชั่วโมงหลังได้รับสาร 24goniothalaminที่ความเข้มข้น 3, 5และ 10µg/ml โดยใช้ β-Actin เป็น loading control..... 45
- 32 แสดงผลของสาร goniothalaminต่อการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม MAPK (A) การแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม MAPK signaling pathway หลังจากเซลล์มะเร็งได้รับสาร goniothalaminเป็นเวลา) ชั่วโมง 24B) ระดับของ p-p / 38p 38ratio ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ β-Actin เป็น loading control (*, p < 0.05) 46

บทที่ 1

บทนำ

มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่มีความผิดปกติในการแบ่งตัวของเซลล์ เซลล์เกิดการแบ่งตัวมากขึ้นไม่สามารถควบคุม และเกิดการรุกรานไปสู่บริเวณอื่นทางกระแสเลือด และระบบน้ำเหลืองได้ สาเหตุของโรคมะเร็งนั้นมีทั้งปัจจัยภายนอกเช่น การสูบบุหรี่ การสัมผัสสารเคมี การสัมผัสรังสี การติดเชื้อ และปัจจัยภายในเช่น การถ่ายทอดทางพันธุกรรม ฮอโมน ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ซึ่งการเกิดมะเร็งนั้นมักจะเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน และใช้เวลาในการพัฒนาของโรคเป็นระยะเวลาหลายปี⁽¹⁾

ในปัจจุบันโรคมะเร็งผิวหนังมีความชุกเพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งปัจจัยหลักเกิดจากรังสียูวีจากแสงแดด รังสียูวีจะทำลาย DNA และทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระในเซลล์⁽²⁻⁴⁾ โดยมะเร็งผิวหนังสามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภทคือ non-melanoma skin cancer (NMSC) ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของชั้นหนังกำพร้าโดยสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น basal cell carcinoma (BCC) และ squamous cell carcinoma (SCC) และ cutaneous melanoma ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ melanocytes⁽⁵⁻⁸⁾

โรคมะเร็งสามารถรักษาได้หลายวิธีได้แก่ การผ่าตัด การทำเคมีบำบัด การฉายแสงรักษา immunotherapy และ biological therapy ซึ่งวิธีการรักษานั้นจะขึ้นอยู่กับตำแหน่ง ความรุนแรงของโรค รวมทั้งความแข็งแรงและอายุของผู้ป่วย ในปัจจุบันมีการใช้ยาหลายชนิดเพื่อรักษาโรคมะเร็ง แต่ยานั้นก็ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาและพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งตัวใหม่ๆ อยู่เสมอ⁽⁹⁾

ปัจจุบันมีการศึกษาถึง apoptotic cancer cell death เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยจะศึกษาถึง signaling process ภายในเซลล์ เพื่อกระตุ้นให้เกิด apoptosis⁽¹⁰⁾ แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์มะเร็งก็ยังสามารถหลบหนีกระบวนการ apoptosis ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาและพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งทั้งจากสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติ^(11, 12)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสาร goniothalamine ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma A375
2. เพื่อศึกษากลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยสาร goniothalamine ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma A375

ความสำคัญของการวิจัย

โรคมะเร็งผิวหนังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอย่างหนึ่งของหลายๆ ประเทศ และการรักษานั้นมีปัจจัยเสี่ยงหลายด้าน เช่น ราคาของยาที่ใช้ในการรักษาและผลข้างเคียงในการรักษาด้วยวิธีต่างๆ เช่น การฉายรังสี การรักษาด้วยเคมีบำบัด หรือการผ่าตัด ในประเทศไทยนั้นมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งต่างๆ สำหรับในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นยาสำหรับการรักษาโรคมะเร็งผิวหนังต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อศึกษากลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma A375 โดยสาร goniothalamine

นิยามศัพท์เฉพาะ

A375

เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 จัดเป็นกลุ่มของ malignant melanoma

สาร goniothalamine

สาร goniothalamine เป็นสารสกัดที่สกัดได้จากพืชที่มีชื่อในท้องถิ่นว่า ชิงดอกระบาย หรือ *Goniothalamus macrophyllus*

50% Inhibitory Concentration (IC₅₀)

ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%

Apoptosis

Apoptosis เป็นกระบวนการตายของเซลล์ที่ถูกกำหนดไว้แล้วเพื่อเป็นการรักษาสมดุลของเซลล์ และเป็นการกำจัดเซลล์ที่ได้รับความเสียหายเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เซลล์นั้นเกิดการกลายพันธุ์ไปเป็นเซลล์มะเร็ง

วิธีการส่งสัญญาณ MAPK

วิธีการส่งสัญญาณ MAPK เป็นวิธีการส่งสัญญาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ เช่น การเจริญเติบโตแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ กระบวนการอยู่รอดของเซลล์ รวมทั้งกระบวนการตายแบบ apoptosis

วิธีการส่งสัญญาณ Akt

วิธีการส่งสัญญาณ Akt เป็นวิธีการส่งสัญญาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ และกระบวนการอยู่รอดของเซลล์

สมมติฐานในงานวิจัย

สาร goniothalamine เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma A375 และสามารถยับยั้งกระบวนการอยู่รอดของเซลล์ผ่านทางวิถีการส่งสัญญาณ Akt



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผิวหนังของมนุษย์

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกาย โดยมีมากถึง 16% ของน้ำหนักตัวในผู้ใหญ่ มีน้ำหนักมากกว่าสมองถึง 2 เท่า โดยมีน้ำหนักรวมกัน 3-5 กิโลกรัม ผิวหนังมีหน้าที่ในการป้องกันการถูกทำลายจากภายนอก ทั้งทางกายภาพ และเคมี ป้องกันการระเหยของน้ำในร่างกาย สะสมไขมัน สังเคราะห์วิตามินดี ปรับสมดุลอุณหภูมิในร่างกาย⁽¹³⁻¹⁵⁾

โครงสร้างของผิวหนัง

ผิวหนังแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ หนังกำพร้า, หนังแท้, และชั้นใต้หนังแท้หรือชั้นไขมัน⁽¹⁴⁾

หนังกำพร้า (epidermis)

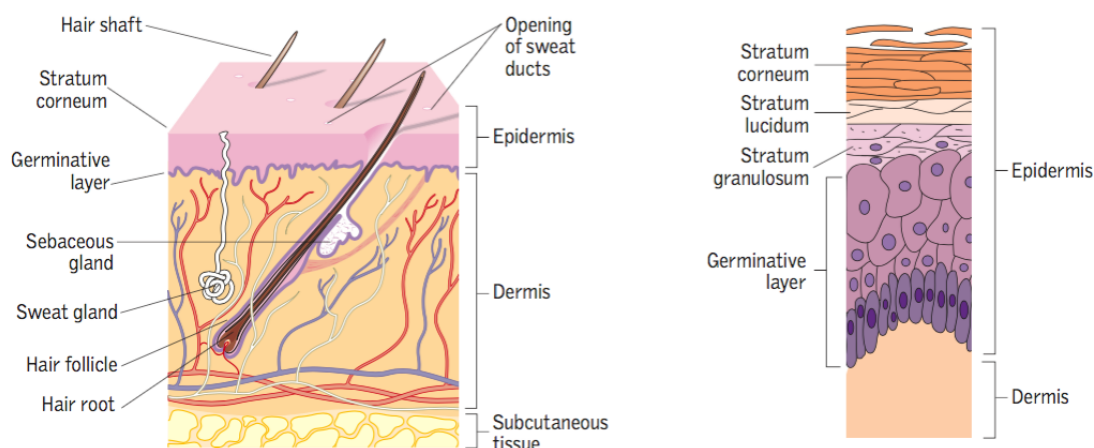
ประกอบด้วย stratified squamous epithelium⁽¹⁵⁾ แบ่งออกเป็นหลายชั้น มีเซลล์หลักๆ 4 ชนิด คือ⁽¹⁶⁾

1. Keratinocytes พบประมาณ 90% ของทั้งหมด
2. Melanocytes พบประมาณ 8% ของทั้งหมดมีหน้าที่ในการผลิตเม็ดสีเมลานิน
3. Langerhans cells เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน
4. Merkel cells

หนังกำพร้าสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ชั้นดังนี้ คือ

1. Stratum basale อยู่ชั้นล่างสุด เรียกอีกชื่อว่า stratum germinativum
2. Stratum spinosum (Prickle cell layer)
3. Stratum granulosum
4. Stratum lucidum
5. Stratum corneum

โดยที่จะสร้างจากชั้นล่างสุดขึ้นไปด้านบนตามภาพประกอบที่ 1



ภาพประกอบ 1 ภาพตัดขวางแสดงส่วนประกอบของผิวหนังแต่ละชั้น⁽¹⁷⁾

1. Stratum basale

stratum basale เป็นชั้นที่เซลล์เรียงตัวกันเพียงแถวเดียว และเป็นชั้นเดียวที่มีการเซลล์ใหม่อยู่เสมอ เซลล์ที่สร้างจะถูกส่งขึ้นด้านบน และกลายเป็นหนังกำพร้าชั้นถัดๆไป ระยะเวลาในการสร้างเซลล์ใหม่กินเวลาทั้งหมดประมาณ 28 วัน โดยความหนาเฉลี่ยของชั้นหนังกำพร้าอยู่ที่ 0.1 มิลลิเมตร⁽¹⁵⁾ เซลล์ในชั้นนี้จะได้รับสารอาหารทางเส้นเลือดฝอยจากชั้นหนังแท้ ส่วนเซลล์ที่ถูกส่งขึ้นชั้นบนก็จะขาดสารอาหารตายไป และกลายเป็นขี้ไคล ซึ่งมีหน้าที่ในการป้องกันความร้อน สารเคมี เชื้อโรคต่างๆ

เซลล์อีกชนิดที่อยู่ใน stratum basale คือ melanocyte มีหน้าที่ในการสร้างเม็ดสีเมลานิน ซึ่งมีหน้าที่ในการป้องกันรังสียูวีจากแสงแดด⁽¹⁶⁾

2. Stratum spinosum

เซลล์ในชั้นนี้ไม่มีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์แล้ว รูปร่างเริ่มเปลี่ยนเป็นรูปหนาม เซลล์ในชั้นนี้มีความหนาประมาณ 5-12 ชั้น เซลล์ในชั้นนี้ยังมีการยึดตัวกันด้วย desmosome ทำให้เซลล์เรียงตัวชิดกันอยู่⁽¹⁸⁾ เซลล์อีกชนิดที่พบได้คือ Langerhans cells ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน⁽¹⁹⁾

3. Stratum granulosum

เซลล์ในชั้นนี้มีรูปร่างแบนลงอย่างชัดเจน เซลล์ในชั้นนี้มีความหนาประมาณ 5 ชั้น เซลล์ในชั้นนี้เริ่มสูญเสียนิวเคลียสไป และเริ่มมีกระบวนการแบบ apoptosis มีเกรนูลที่ผลิตไขมันซึ่งทำให้เซลล์ยังคงยึดติดกันได้ดี

4. Stratum lucidum

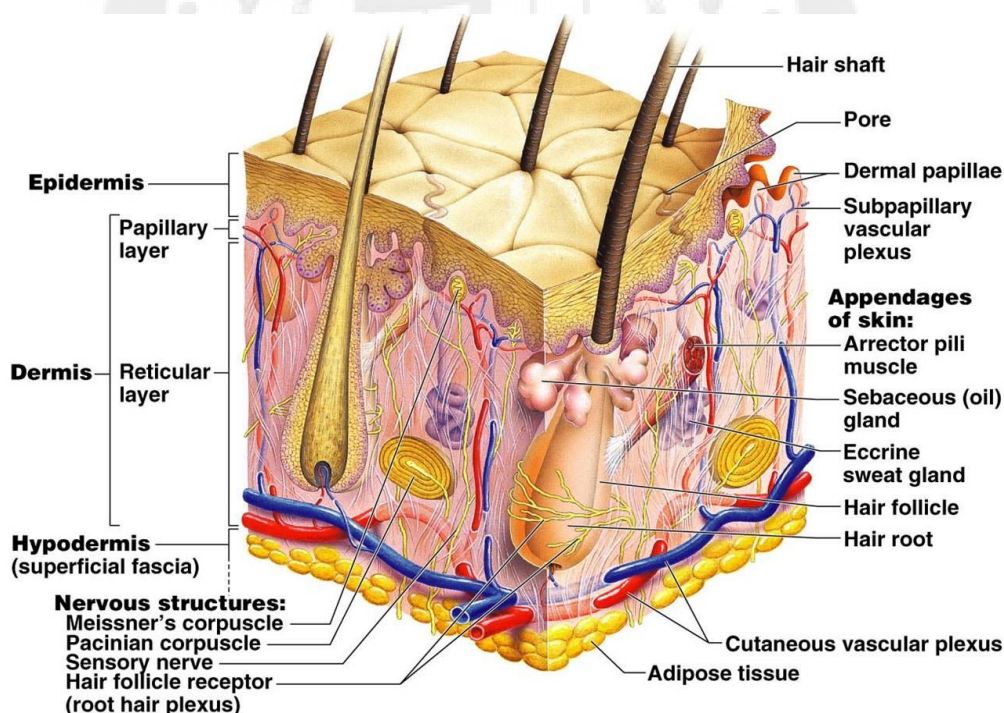
พบเฉพาะบริเวณที่มีความหนาสูง คือ ฝ่ามือและฝ่าเท้า เซลล์ในชั้นนี้มีความหนาประมาณ 3-5 ชั้นเซลล์ในชั้นนี้เป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิตแล้ว

5. Stratum corneum

เป็นชั้นที่อยู่บนสุดของหนังกำพร้า เซลล์ในชั้นนี้มีความหนาประมาณ 25-30 ชั้น รูปร่างแบน เป็นชั้นที่มีส่วนสำคัญในการป้องกันความร้อนจากภายนอก เชื้อโรค และสารเคมีต่างๆ⁽¹⁵⁾ เซลล์มีไขมันที่สร้างจากชั้น stratum granulosum เพื่อลดการระเหยของน้ำ เซลล์ที่อยู่ชั้นบนสุดจะถูกผลัดออกเป็นขี้ไคลต่อมา⁽²⁰⁾

หนังแท้ (Dermis)

ชั้นหนังแท้เป็นชั้นที่อยู่ใต้ต่อชั้นหนังกำพร้า มีเส้นเลือดที่ทำหน้าที่ส่งสารอาหารสู่ชั้นหนังกำพร้า⁽¹⁷⁾ และยังเป็นที่อยู่ของระบบน้ำเหลือง ปลายประสาท รากขน รวมถึงต่อมต่างๆ⁽¹⁹⁾ ตามภาพประกอบ 2 โดยที่ชั้นหนังแท้จะเชื่อมติดกับชั้นหนังกำพร้าด้วย rete ridges ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการส่งผ่านสารอาหารต่างๆ สู่หนังกำพร้า⁽¹⁶⁾ แต่รอยเชื่อมนี้ก็สามารถเกิดการแยกได้ โดยถ้าเกิดการแยกจะเกิดเป็นถุงน้ำต่อไป



ภาพประกอบ 2 ภาพตัดขวางแสดงส่วนประกอบต่างๆ ในชั้นหนังแท้⁽²¹⁾

ชั้นหนังแท้แบ่งย่อยได้เป็น 2 ชั้น คือ

Reticular dermis เป็นชั้นที่ประกอบด้วย คอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงให้กับผิว⁽¹⁹⁾

Papillary dermis เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเส้นเลือดและเส้นประสาท

คอลลาเจนและอีลาสติน

คอลลาเจนและอีลาสตินจะสานกันเป็นร่างแหเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ผิว ป้องกันผิวจากการฉีกขาด⁽¹⁵⁾ คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักของชั้นหนังแท้ โดยมีน้ำหนักมากถึง 70% ของชั้นหนังแท้ทั้งหมด⁽¹⁹⁾ ส่วนอีลาสตินมีหน้าที่ในการผลิต fibroblasts ซึ่งเป็นเส้นใยที่มีขนาดเล็กกว่าคอลลาเจน มีหน้าที่ในการเสริมความแข็งแรงให้กับโครงสร้างผิว เมื่ออายุมากขึ้นจำนวนคอลลาเจนจะลดลง ทำให้ผิวขาดความยืดหยุ่น และเกิดริ้วรอยขึ้น⁽¹⁵⁾

ต่อมในชั้นหนังแท้ (glands in the dermis)

ผิวหนังประกอบด้วยต่อมเหงื่อประมาณ 3-4 ล้านต่อม มีหน้าที่ในการผลิตเหงื่อ โดยแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ eccrine glands และ apocrine glands

Eccrine glands เหงื่อที่ผลิตจาก eccrine glands จะมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก มีหน้าที่ในการปรับสมดุลอุณหภูมิของร่างกาย โดยในแต่ละวันร่างกายจะมีการผลิตเหงื่อประมาณ 600 มิลลิลิตร

Apocrine glands เป็นต่อมที่ไม่ทำงานในวัยเด็ก เป็นต่อมที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพศเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น⁽¹⁹⁾ พบมากบริเวณรักแร้ ขาหนีบ หัวนม และหนวด เหงื่อที่ผลิตจาก apocrine glands จะแตกต่างจาก eccrine glands โดยมีลักษณะข้นกว่า และเมื่อเจอแบคทีเรียบริเวณผิวจะทำให้เกิดกลิ่นขึ้น ซึ่งกลายเป็นกลิ่นตัวต่อมา⁽¹⁵⁾

นอกจากต่อมเหงื่อแล้วในชั้นหนังแท้ยังมีส่วนของต่อมไขมันอยู่ด้วยเช่นกัน

ต่อมไขมันหรือ sebaceous glands เป็นต่อมที่มักต่ออยู่กับรูขุมขน พบมากบริเวณหน้า คอ และหลัง⁽¹⁹⁾ มีหน้าที่ในการผลิตไขมันจำพวกไตรกรีเซอไรด์ (triglyceride) และ คอเลสเตอรอล (cholesterol) โดยที่ไขมันเหล่านี้จะมีส่วนของโปรตีนและเกลือเป็นส่วนประกอบ ไขมันนี้จะปกคลุมบริเวณขน และผิวหนังเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ทำให้ผิวชุ่มชื้น⁽¹⁵⁾ รวมถึงทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่นผิว มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย⁽¹⁹⁾ เมื่อเข้าสู่วัยรุ่นจะมีการทำงานเพิ่มขึ้นของต่อมไขมันทำให้มีการผลิตไขมันมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดสิว⁽¹⁵⁾

หน้าที่ของผิวหนัง (Function of the skin)

ระบบประสาทหรือ sensory function เส้นประสาทบริเวณผิวหนังมีจำนวนมากกว่า 1 ล้านเส้น มีหน้าที่ในการรับรู้ความรู้สึก ร้อน เย็น เจ็บปวด การสัมผัส และการกด มีจำนวนมากที่สุดในบริเวณฝ่ามือ และฝ่าเท้า

การปรับอุณหภูมิหรือ thermoregulatory function ที่ผิวหนังจะมีต่อมรับรู้อุณหภูมิ และส่งสัญญาณประสาทไปสมองส่วน hypothalamus ซึ่งอยู่บริเวณสมองส่วนหน้ามีหน้าที่ในการควบคุมระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ได้แก่ การควบคุมอุณหภูมิร่างกาย การกระจายน้ำ ความหิว เป็นต้น ซึ่งการควบคุมอุณหภูมิบริเวณผิวหนังนั้นจะตอบสนองด้วยการขับเหงื่อ และปรับเปลี่ยนปริมาณการไหลเวียนของเลือด โดยร่างกายจะขับเหงื่อและเพิ่มการไหลเวียนโลหิตไปบริเวณผิวหนังเพื่อลดอุณหภูมิเมื่ออุณหภูมิร่างกายมากกว่า 37°C ^(15, 16, 22) เมื่ออายุมากขึ้นการทำงานของระบบนี้จะแย่ลงทำให้การควบคุมอุณหภูมิร่างกายในผู้สูงอายุแย่ลง⁽²³⁾

การปกป้อง หรือ protective function ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใช้ในป้องกันอวัยวะภายในทางกายภาพจากสิ่งแวดล้อม โดยป้องกันการสูญเสียน้ำรักษาระดับเกลือแร่ ป้องกันเชื้อโรค^(16, 19)

การสังเคราะห์วิตามินดี หรือ vitamin D synthesis ร่างกายจะมีการสังเคราะห์วิตามินดีบริเวณผิวหนังเมื่อผิวหนังมีการสัมผัสรังสีจากแสงแดด ซึ่งวิตามินดีมีความสำคัญในการควบคุมระดับแคลเซียม และฟอสฟอรัส ซึ่งการขาดวิตามินดีทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนตามมาได้⁽¹⁵⁾

ทางจิตวิทยา หรือ psychological function ผิวหนังเป็นบริเวณที่สามารถบ่งถึงสุขภาพที่ดีได้ และเป็นบริเวณที่มองเห็นได้จากภายนอกจึงส่งผลเรื่องความสวยงาม⁽¹⁹⁾

มะเร็งผิวหนัง

มะเร็งคือเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัว และเจริญเติบโตได้ มะเร็งผิวหนังจะเกิดบริเวณผิวหนังทำให้มองเห็นได้ง่าย ไม่เหมือนมะเร็งที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย มะเร็งผิวหนังส่วนใหญ่จึงถูกวินิจฉัยตั้งแต่ระยะต้นๆ ทำให้สามารถรักษาให้หายขาดได้ มะเร็งผิวหนังมีอาการแสดงของโรคได้หลายอย่าง ได้แก่ มีแผลบริเวณผิวหนังที่ไม่หาย สีของผิวหนังเปลี่ยนแปลงไป รูปร่างลักษณะของไฝที่มีเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีขอบขรุขระ เม็ดใหญ่ขึ้น เป็นต้น มะเร็งผิวหนังนั้นสามารถมีขนาดเล็กหรือใหญ่ ผิวเงาหรือขรุขระ มีสะเก็ด แข็งหรือนิ่ม มีสี เลือดออก หรืออื่นๆ ได้ ดังนั้นถ้าเกิดความเสี่ยงควรรีบไปพบแพทย์เพื่อทำการวินิจฉัยต่อไป^(24, 25) มะเร็งผิวหนังในมนุษย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

Non-Melanoma skin cancer (NMSC) แบ่งเป็น^(16, 24-26)

Basal cell carcinoma หรือ BCC เกิดจาก basal cell keratinocytes ซึ่งอยู่บริเวณ basement membrane ของผิว เป็นมะเร็งผิวหนังที่พบบ่อยที่สุด แต่มีอันตรายน้อย

Squamous cell carcinoma หรือ SCC เกิดจาก squamous epithelial keratinocytes มีรูปร่างแบน รอยโรคจะอยู่บริเวณผิวหนังชั้นบนสุด พบได้น้อยแต่ก็มักจะมีอาการรุนแรง ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องอาจทำให้เสียชีวิตได้^(16,27-29)

Melanoma หรือ malignant melanoma (MM) เกิดจาก melanocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการผลิตเม็ดสี พบได้น้อยแต่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องอาจทำให้เสียชีวิตได้

Non-melanoma skin cancer (NMSC)

National Cancer Institute at the U.S. (NCI) ได้รายงานจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งผิวหนัง (basal cell carcinoma และ squamous cell carcinoma) ในปี ค.ศ. 2005-2009 ในประเทศอเมริกา ว่ามีจำนวน 81,240 ราย โดยเป็นเพศชาย 46,890 คน และเพศหญิง 34,350 คน และในปี ค.ศ. 2012 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งผิวหนังนี้ 12,190 คน^(27, 28)

Basal cell carcinoma (BCC)

เป็นมะเร็งผิวหนังที่พบบ่อยที่สุดประมาณ 75% ของมะเร็งผิวหนังทั้งหมด โดยลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BCC จะคล้ายคลึงกับ basal cell keratinocyte มักจะพบบนผิวหนังบริเวณที่สัมผัสแสงแดดมาก เช่น ศีรษะ ลำคอ แขน มือ ใบหน้า เป็นต้น และมักพบในคนผิวขาว⁽²⁹⁾ เซลล์ต้นกำเนิดของ BCC ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด โดยเชื่อกันว่าเกิดจากเซลล์ outer root sheath ของรูขุมขนทำให้ BCC มักพบบริเวณที่มีขน BCC เป็นมะเร็งชนิดที่เติบโตค่อนข้างช้า และสามารถรักษาให้หายขาดได้ BCC มักมี local invasion แต่ไม่แพร่กระจายไปบริเวณอื่นของร่างกาย^(28, 30)

สาเหตุอื่นๆ นอกเหนือจากแสงแดด คือ การสัมผัสสาร arsenic ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิโรคพันธุกรรมบางชนิด เช่น albinism, xeroderma pigmentosum, basal cell nevus syndrome, linear basal cell nevus และ Torre's syndrome เป็นต้น⁽³¹⁾

ลักษณะรอยโรคที่พบมี 5 ชนิด ได้แก่

1. Noduloulcerative BCC เป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด รอยโรคมีลักษณะเป็นตุ่มผิวเรียบ มักมีหลอดเลือดฝอยขยายตัวเห็นจากผิวบน จากนั้นตุ่มขยายใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ตรงกลางบวมลงไปและแตกเป็นแผล ขอบยกนูนและม้วนเข้า อาจมีสีผิวหรือสีน้ำตาลก็ได้ (ภาพประกอบ 3 และ 4) มักพบบริเวณที่สัมผัสแสงแดดมาก เช่น หน้าและลำคอ เป็นต้น



ภาพประกอบ 3 Nodular basal cell carcinoma⁽³¹⁾



ภาพประกอบ 4 Noduloulcerative basal cell carcinoma⁽³¹⁾

2. Superficial BCC รอยโรคมีลักษณะเป็นผื่นนูนใหญ่ (plaque) โดยมีขอบยก บริเวณกลางผื่นมักมี atrophy อาจมี crust หรือแผล (ulcer) พบบ่อยบริเวณลำตัว (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 Superficial basal cell carcinoma⁽³¹⁾

3. Pigmented BCC รอยโรคมีลักษณะสีคล้ำย melanoma และมีรูปร่างเหมือน noduloulcerative BCC อาจเกิดบริเวณฐานเล็บ ทำให้เกิด longitudinal melanonychia ได้ (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 pigmented basal cell carcinoma⁽³²⁾

4. Sclerosis BCC หรือ morpheaform เป็นชนิดที่วินิจฉัยและรักษาได้ยาก รอยโรคมีลักษณะเป็น infiltrating plaque ผิวเนียนมัน แข็ง ขอบเขตไม่ชัดเจน ไม่แตกเป็นแผล พบในคนอายุน้อย และไม่ค่อยมีอาการ



ภาพประกอบ 7 Sclerosis basal cell carcinoma⁽³²⁾

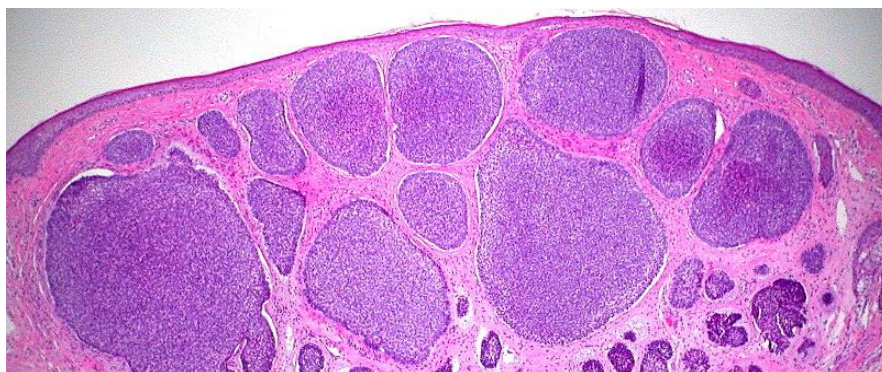
5. Fibroepithelioma of Pinkus เป็นชนิดที่พบน้อย ส่วนมากพบบริเวณหลังช่วงล่าง (lumbrosacral area) รอยโรคมีลักษณะเป็นก้อน ผิวเรียบ สีชมพูอ่อน (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 Fibroepithelioma of Pinkus⁽³³⁾

จุลพยาธิวิทยาของ BCC

รูปแบบของความผิดปกติจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของ BCC แต่จะมีลักษณะร่วมกัน คือ เซลล์มีขนาดนิวเคลียสใหญ่ ไฮโดพลาสซึมมีขนาดเล็ก ติดสีเข้ม แต่รูปร่างของเซลล์ยังดูปกติ ไม่ค่อยมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นให้เห็น มี stromal retraction from tumor islands ทำให้เกิดช่องว่างรอบๆ ก้อนมะเร็ง⁽³⁴⁾ (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 พยาธิวิทยาของ basal cell carcinoma⁽³⁵⁾

การรักษามะเร็งผิวหนัง BCC

การเลือกวิธีการรักษามะเร็งผิวหนัง BCC นั้นขึ้นอยู่กับบริเวณที่จะทำการรักษา และจุลพยาธิวิทยาของโรคโดยมีวิธีการรักษาต่างๆ ได้แก่

การทำ surgical excision ใช้ได้ดีในการรักษา BCC โดยที่การรักษานั้นจะขึ้นอยู่กับขนาดของก้อนมะเร็งในก้อนมะเร็งที่มีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร จะมีความเสี่ยงต่ำ โดยจะทำการตัดก้อนของมะเร็งให้ห่างจากขอบรอยโรคประมาณ 4 มิลลิเมตร ส่วนก้อนมะเร็งที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 เซนติเมตร มะเร็งจะลามเข้าไปในชั้นไขมันทำให้มีความเสี่ยงสูง การผ่าตัดจะทำการตัดให้ห่างจากขอบรอยโรคประมาณ 6 มิลลิเมตร⁽³⁶⁾

Mohs micrographic surgery เป็นวิธีการที่ทำเมื่อต้องการชิ้นเนื้อเพื่อตรวจจุลพยาธิวิทยาคุณภาพสูง และเป็นวิธีการที่มีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงต่ำ เป็นวิธีการที่มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของโรคต่ำที่สุด มีข้อบ่งชี้ในการเลือกคือ morpheaform BCC, BCC ที่มีขอบเขตไม่ชัดเจน, ผ่านการผ่าตัดแล้ว แต่ผ่าตัดออกไม่หมด, recurrent BCC, BCC ในบริเวณที่ผ่าตัดยาก และต้องการการรักษาเนื้อเยื่อข้างเคียงไว้ ได้แก่ บริเวณร่องแก้ม, หน้าหู, รอบตา เป็นต้น⁽³⁶⁾

Curettage with electrodesiccation สามารถรักษา BCC ให้หายขาดได้ 97-98%⁽³⁷⁾ แต่อาจทำให้เกิดแผลเป็นนูน (hypertrophic scar) และรอยดำหลังการรักษาได้ (post inflammatory hyperpigmentation)

Cryosurgery เป็นวิธีการผ่าตัดร่วมกับการใช้ความเย็น โดยจะทำให้เซลล์ผิวหนังเย็นลงจนถึงอุณหภูมิ -50°C จึงทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อรอบข้างร่วมด้วย ทำให้ปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากหลังการรักษามีผลข้างเคียงเรื่องความสวยงามอยู่ เช่น แผลเป็นนูน

Topical therapy จะแบ่งออกเป็น

Imiquimod หรือ 5% imiquimod cream ได้รับการอนุมัติจาก อย.สหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ.2004 ว่าสามารถใช้ในการรักษา primary smallsuperficial BCC (เล็กกว่า 2 เซนติเมตร) ได้

โดย imiquimod คือ Toll-like receptor 7 (TLR 7) agonist ซึ่งเชื่อว่าจะไปกระตุ้นการทำงานของ interferon-alpha (IFN- α) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)

5-fluorouracil หรือ 5-FU ถูกใช้ในการรักษา actinic keratosis และ superficial BCC มีผลข้างเคียงต่ำ มีรายงานว่าส่วนใหญ่ของคนไข้มีอาการปวด และเป็นแผลเป็นน้อย มีเพียงอาการแดงเล็กน้อยที่พบ

Photodynamic therapy เป็นการใช้แสงขาวในการกระตุ้นตัวยาเพื่อให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ และไปทำลายเซลล์มะเร็ง

Radiation therapy หรือการรักษาด้วยรังสีบำบัด เป็นวิธีการรักษาที่เหมาะสมกับการรักษาเสริมไปกับการผ่าตัด

Squamous cell carcinoma (SCC)

SCC เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับที่สอง โดยพบประมาณ 20% ของมะเร็งผิวหนังทั้งหมด⁽²⁹⁾ SCC เป็นมะเร็งที่มาจากเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) ในคนผิวขาวมักจะพบบนผิวหนังบริเวณที่ถูกแสงแดด เช่น ศีรษะ ลำคอ ใบหู ริมฝีปาก และหลังมือ⁽³⁸⁾ แต่ในคนผิวเข้มนั้นจะพบ SCC เท่ากันทั้งบริเวณผิวหนังที่ถูกและไม่ถูกแสงแดด⁽³⁹⁾ ลักษณะรอยโรคที่พบได้บ่อยคือ ตุ่มนูน แข็ง สีแดง หรือสีเนื้อ (firm, flesh-colored or erythematous keratotic papule or plaque) และลักษณะอื่นๆ ที่พบได้คือ แผล, ก้อนนูน (smooth nodule), ดิ่งเนื้อแข็ง (thick keratotic horn), ขรุขระ (verrucous) หรือตุ่มหนอง (abscess) ในบริเวณศีรษะ และลำคอ⁽²⁹⁾ สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่ SCC เป็นมะเร็งที่โตเร็ว ถ้าไม่ได้รับการรักษา รอยโรคอาจขยายใหญ่ขึ้น และกระจายไปตามระบบน้ำเหลืองได้ และสามารถกระจายไปสู่บริเวณอื่นของร่างกายได้ เช่น ปอด มดลูก และปากมดลูก^(25, 27, 30)

ปัจจัยเสี่ยงในการเกิด SCC ได้แก่

Precursor lesion

ประวัติสัมผัสรังสียูวีในปริมาณมาก

ประวัติสัมผัสสารก่อมะเร็ง

ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง

แผลเป็น

แผลเป็นจากความร้อน

แผลหรือการอักเสบเรื้อรัง

การติดเชื้อ human papilloma virus (HPV)

โรคทางพันธุกรรมบางชนิด เช่น albinism, xeroderma pigmentosum, porokeratosis และ epidermolysis bullosa เป็นต้น

ประเภทของ SSC สามารถแบ่งออกได้เป็น

1. Oral squamous cell carcinoma

เป็น SCC ที่พบบริเวณช่องปากมักพบในคนที่มีประวัติสูบบุหรี่ ยาเส้น หรือดื่มสุรา โดยตำแหน่งที่พบบ่อยคือเพดานปาก และลิ้น SCC ที่พบบริเวณช่องปากมักจะพัฒนามาจากรอยโรคประเภท erythroplakia มักไม่มีอาการใดๆ ลักษณะรอยโรคคือเป็นผื่นแดงหยาบ (rough red patch) หรือเป็นผื่นแดงคล้ายกำมะหยี่ (granular velvety red plaque) และพัฒนาเป็นตุ่มนูนแข็ง (firm nodular)

2. Lower lip squamous cell carcinoma

SCC ที่พบบริเวณริมฝีปากล่าง ลักษณะรอยโรคเป็น actinic cheilitis หรือ scaly leukoplakia และพัฒนาเป็น SCC ต่อมา อาการที่สัมพันธ์กับ SCC ที่พบบริเวณริมฝีปากล่างคือ มีอาการริมฝีปากแตกเรื้อรัง มีขุยบริเวณ vermilion zone มีลักษณะ red and white blotchy vermilion border คือ คดเคี้ยว (wandering) ภายในมี fissure หรือแผล (ภาพประกอบ 10)⁽²⁹⁾



ภาพประกอบ 10 Lower lip squamous cell carcinoma⁽²⁹⁾

3. Genital squamous cell carcinoma

SCC ที่พบบริเวณอวัยวะเพศหญิงมักพบบริเวณ anterior labia majora ลักษณะรอยโรคคือ small warty nodule หรือ erosive erythematous plaque อาจมีหรือไม่มีอาการคัน และมีเลือดออกได้ ส่วนในอวัยวะเพศชายมักพบบริเวณถุงหุ้มอัณฑะ ลักษณะรอยโรคคือ small pruritic verrucous lesion และบริเวณองคชาติมักพบบริเวณหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศ ส่วนใหญ่พัฒนามาจาก precursor lesion ได้แก่ Erythroplasia of Queyrat (ภาพประกอบ 11) โดยมีลักษณะรอยโรคคือ velvety red plaque และมักสัมพันธ์กับประวัติการมี condyloma, phimosis, และ lichen sclerosis⁽²⁹⁾



ภาพประกอบ 11 Erythroplasia of Queyrat⁽²⁹⁾

4. Verrucous carcinoma

มีลักษณะเป็นก้อนเนื้อออกโตช้า รูปร่างคล้ายดอกกะหล่ำ (cauliflower-like appearance) มักเกิดบริเวณที่มีการระคายเคือง มี 4 ชนิด คือ ⁽²⁹⁾

Oral florid papillomatosis เป็นกลุ่มของเนื้องอกที่เกิดขึ้นบริเวณกระพุ้งแก้ม มักพบในคนที่สูบบุหรี่หรือยาเส้น (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 Oral florid papillomatosis⁽²⁹⁾

Anogenital type เกิดขึ้นบริเวณ glans penis, ถุงหุ้มอัณฑะ, รอบทวาร

Epithelioma cuniculatum มักพบฝ่าเท้าส่วน first metatarsal head และมีกลิ่นเหม็น (ภาพประกอบ 13)

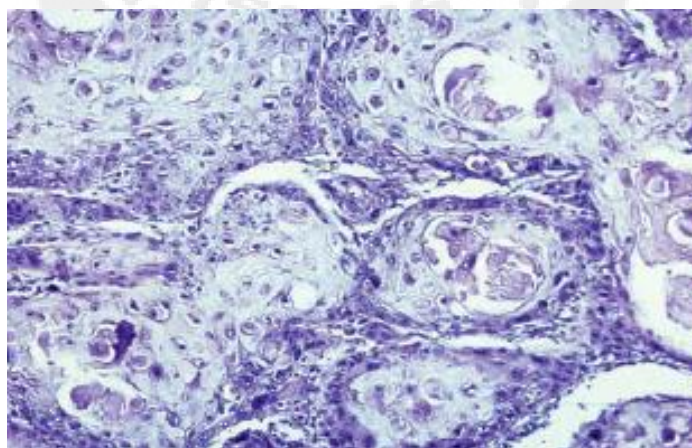


ภาพประกอบ 13 Epithelioma cuniculatum⁽²⁹⁾

ชนิดที่เกิดขึ้นในตำแหน่งอื่น ๆ ได้แก่ หนังสีรษะ ลำตัว แขน ขา

จุลพยาธิวิทยาของ SCC

มีความผิดปกติของเซลล์หนังกำพร้า (atypical keratinocyte) โดยมีขนาดนิวเคลียสใหญ่ขึ้น หรือมีหลายนิวเคลียสในเซลล์เดียว ติดสีเข้มขึ้น มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น มีการลดลงของ tonofilament และ intercellular bridge ใน carcinoma in situ SCC จะพบความผิดปกตินี้เฉพาะบริเวณหนังกำพร้า แต่ใน Invasive SCC จะพบความผิดปกตินี้ลงมาถึงชั้นหนังแท้ (ภาพประกอบ 14)⁽³⁴⁾



ภาพประกอบ 14 พยาธิวิทยาของ squamous cell carcinoma⁽²⁹⁾

การรักษามะเร็งผิวหนัง SCC

การเลือกวิธีการรักษา SCC นั้น ขึ้นอยู่กับระยะของโรค การแพร่กระจาย และโอกาสในการเกิดซ้ำของโรค โดยมีวิธีได้แก่

Curettage หรือการขูดใช้ในการรักษา SCC *in situ* เท่านั้นแต่มีการใช้น้อยเนื่องจากมีรายงานเรื่อง แผลเป็นนูน และรอยดำหลังการรักษา⁽⁴⁰⁾

Surgical excision หรือการตัดชิ้นเนื้อใช้ในกรณีรอยโรคมีขนาดเล็กน้อยกว่า 1 เซนติเมตร และลึกน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร

Mohs micrographic surgery เป็นวิธีการผ่าตัดที่ทำให้ได้ชิ้นเนื้อส่งตรวจต่อ และมีขนาดแผลต่อเนื้อเยื่อข้างเคียงต่ำ ข้อบ่งชี้ในการเลือกวิธีนี้ ได้แก่⁽⁴¹⁾ infiltrative squamous cell carcinoma, ขอบเขตของรอยโรคไม่ชัดเจน, รอยโรคอยู่บริเวณริมฝีปาก, หู, ฐานเล็บ, ปลายนิ้ว, เปลือกตา และบริเวณอวัยวะเพศ, มีประวัติได้รับการรักษาด้วยรังสีรักษา, รอยโรคกระจายไปบนเส้นประสาท, กล้ามเนื้อ, กระดูก, verrucous carcinoma, SCC ที่ขึ้นบริเวณแผลเป็นเดิมและ recurrence SCC

Radiation หรือรังสีบำบัด เป็นวิธีการรักษาที่เหมาะสมกับการรักษาเสริมไปกับการผ่าตัด

Topical therapy จะแบ่งออกเป็น

5-fluorouracil และ imiquimod ใช้ในการรักษา SCC *in situ* แต่ไม่สามารถใช้ในการรักษา SCC ที่มีการกระจายตัวลงลึกได้ เนื่องจากยามีฤทธิ์ในการดูดซึมลงสู่ชั้นหนังแท้ต่ำ⁽²⁹⁾

Melanoma หรือ malignant melanoma

National Cancer Institute at the U.S. (NCI) ได้รายงานจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งผิวหนัง (melanoma) ในปี ค.ศ. 2005-2009 ในประเทศอเมริกา ว่ามีจำนวน 76,250 ราย โดยเป็นเพศชาย 44,250 คน และเพศหญิง 32,000 คน และในปี ค.ศ. 2012 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งผิวหนังนี้ 9,180 คน

Melanoma เป็นมะเร็งผิวหนังที่พบได้ไม่บ่อย แต่มีอัตราการตายสูง เนื่องจากมีการเติบโต และแพร่กระจายโรคได้รวดเร็ว โดยในผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยมะเร็งผิวหนัง 100 ราย จะเสียชีวิตด้วย melanoma สูงถึง 79 ราย (79%) ปัจจุบันมะเร็งผิวหนังชนิดนี้ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก เพราะหากได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้องในระยะเริ่มแรกนั้นสามารถทำการรักษาให้หายขาดได้เกือบทุกราย^(27, 28)

Melanoma เป็นมะเร็งผิวหนังที่เจริญมาจาก melanocyte สามารถเกิดได้ทุกบริเวณ โดยเฉพาะบริเวณที่สัมผัสแสงแดด โดยปัจจัยเสี่ยงในการเกิด melanoma ได้แก่

สีผิวขาว

การสัมผัสแสงแดด

มีประวัติ melanoma ในครอบครัว

ไฝมีจำนวนมากขึ้น หรือไฝมีรูปร่างผิดปกติ เช่น ใหญ่ขึ้น ขอบเขตไม่สม่ำเสมอ มีการเปลี่ยนแปลงของสี

มี congenital nevi หรือ dysplastic nevi ⁽⁴²⁾

ลักษณะทางคลินิกของ melanoma ส่วนใหญ่จะมีสีน้ำตาล ถึงสีดำ แต่ก็มีบางชนิดที่สามารถพบสีชมพู สีแดง วิธีการสังเกตเบื้องต้นสามารถใช้วิธี “ABCDE”^(27, 28)

A หรือ asymmetric หมายถึง สองข้างของรอยโรคไม่สม่ำเสมอ

B หรือ border หมายถึง ขอบเขตของรอยโรคไม่เรียบ

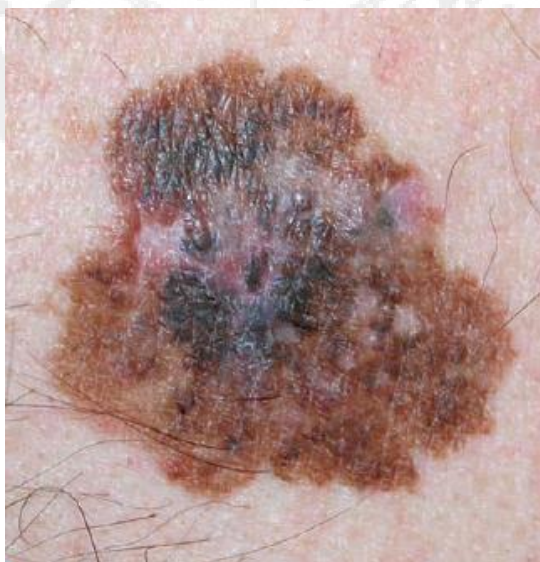
C หรือ color หมายถึง มีหลายสีได้แก่ สีแดง ขาว ฟ้ำ หรือน้ำเงินเข้ม

D หรือ diameter หมายถึง มีขนาดใหญ่มากกว่า 6 มิลลิเมตร

E หรือ evolving หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ขนาด หรือมีเลือดออกจากไฝ

โดย melanoma สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ

1. Superficial spreading malignant melanoma เป็นชนิดที่พบได้มากที่สุด โดยพบเป็น 70% ของ melanoma ทั้งหมดมักพบบริเวณหลัง และขา มีลักษณะนูนเล็กน้อย กลม หรือรี ขนาด 1-3 เซนติเมตร มักมีลักษณะ polycyclic และ finger-like projection ผิวนูนมีสีน้ำตาลอ่อน ขอบเข้ม ซึ่งบริเวณที่มีสีเข้มคือบริเวณที่มีการแบ่งตัวของมะเร็ง มะเร็งชนิดนี้จะมีการกระจายตัวช้า โดยใช้เวลาหลายเดือนถึงหลายปีในการเจริญเติบโต ลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบว่ามี large melanocyte ตลอดทุกชั้นของหนังกำพร้า (pagetoid distribution) (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 Superficial spreading malignant melanoma⁽⁴³⁾

2. Nodular malignant melanoma เป็นชนิดที่พบบ่อยมากเป็นอันดับสอง โดยพบเป็น 15-30% ของ melanoma ทั้งหมดเป็นชนิดที่รุนแรงที่สุด เกิดได้ทุกบริเวณของร่างกาย ตำแหน่งที่พบบ่อยได้แก่ ลำตัว ศีรษะ และคอ มีการลุกลามอย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 2-3 เดือนในการเจริญเติบโตเป็นก้อนยื่นออกมา ไม่มีลักษณะรอยโรคเฉพาะ ผิวอาจเรียบหรือขรุขระ หรือแตกออกเป็นแผลได้ มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบว่ามี atypical melanocyte ในชั้นหนังกำพร้าชั้นล่าง มักพบ atypical melanocyte ในชั้นหนังแท้ โดยมีลักษณะ large epithelioid cell, spindle cell และ small cell อยู่ผสมกัน (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 Nodular malignant melanoma ⁽⁴³⁾

3. Lentigo malignant melanoma เป็นชนิดที่พบน้อยที่สุดพบมากในผู้สูงอายุ มักเป็นบริเวณที่ถูกแสงแดด โดย melanoma ชนิดนี้จะขึ้นอยู่บนรอยโรคของ lentigo maligna รอยโรคจะมีลักษณะเป็นผื่นสีน้ำตาล เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-6 เซนติเมตร ขอบไม่เรียบ และมีก้อนนูนสีเข้มขึ้นบนผื่นดังกล่าว เป็น melanoma ชนิดที่โตช้า⁽⁴⁴⁾ ลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบ extensive proliferation ของ atypical melanocyte บริเวณ dermo-epidermal junction พบ nest ของ atypical melanocyte ได้ทั้งในชั้นหนังกำพร้า และหนังแท้ (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 Lentigo malignant melanoma⁽⁴³⁾

4. Acral lentiginous melanoma เกิดบริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า ฐานเล็บ บริเวณเยื่อในช่องปาก และอวัยวะเพศ รอยโรคมีลักษณะเป็นผื่นสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ขอบไม่เรียบ ลูกกลมซำ อาจพบเป็น papule หรือ nodule ก็ได้ ลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบ proliferation ของ large melanocyte ซึ่งมีนิวเคลียสใหญ่ และไซโตพลาสซึมเต็มไปด้วย melanin granule และพบว่า melanocyte จะมีลักษณะเป็นรูปกระสวย (spindle shape) ยื่นลงไปในระดับหนังแท้ (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 Acral lentiginous melanoma⁽⁴³⁾

ความถี่ในการเกิด melanoma แต่ละชนิด คือ ร้อยละ 70, 15, 5 และ 8 ตามลำดับ และไม่สามารถจำแนกประเภทได้อีก 2%

การแบ่งระยะของโรคและการรักษา^(45, 46)

Stage 1 (Melanoma *in situ*) เป็นเซลล์ melanocyte ที่ผิดปกติจะพบเฉพาะในชั้นหนังกำพร้าการรักษาสามารถทำได้ด้วยวิธี local excision และ surgical margin อยู่ที่ 1 เซนติเมตร

Stage 2 (Invasive melanoma) เป็นเซลล์ melanocyte ที่ผิดปกติมีการลุกล้ำเข้าไปในชั้นหนังแท้การรักษาจะขึ้นอยู่กับความหนาโดยที่ความหนาน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร จะใช้วิธีการรักษาแบบ local excision และ surgical margin อยู่ที่ 1 เซนติเมตร ส่วนความหนาที่มากกว่า 2 มิลลิเมตร จะใช้วิธีการรักษาแบบ local excision และ surgical margin อยู่ที่ 2 เซนติเมตร

Stage 3 (Regional lymph node involvement) เป็นเซลล์ melanocyte ที่ผิดปกติมีการลุกล้ำไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงการรักษาสามารถใช้วิธี local excision, lymph node dissection และ adjuvant therapy เช่น รังสีบำบัดและเคมีบำบัด

Stage 4 (Distance metastasis) เป็นเซลล์ melanocyte ที่ผิดปกติมีการลุกล้ำไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกายการรักษาสามารถใช้วิธี local excision และ adjuvant therapy เช่น รังสีบำบัดและเคมีบำบัด

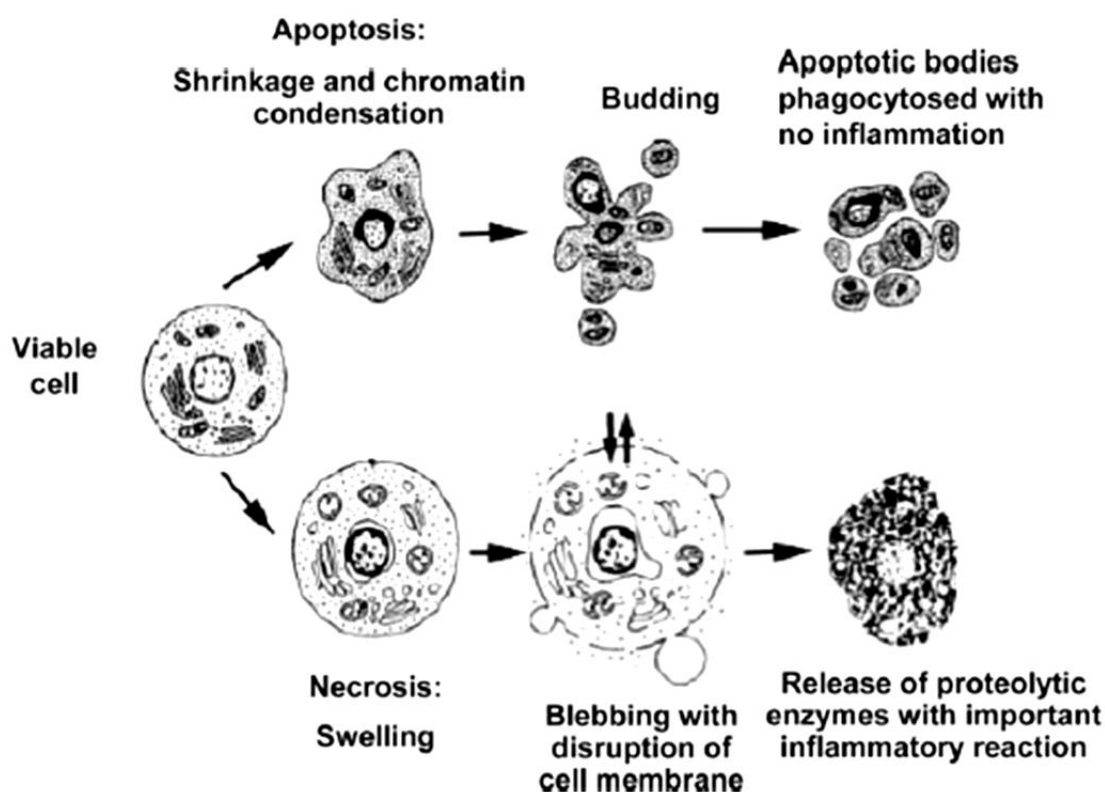
กระบวนการ apoptosis

Apoptosis หรือ programmed cell death เป็นกระบวนการตายของเซลล์ซึ่งเกิดในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (multicellular organisms) ในปี ค.ศ. 1842 นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน Carl Vogt เป็นผู้อธิบายเรื่อง apoptosis เป็นคนแรกต่อมา ค.ศ. 1972 John Foxton Ross จากมหาวิทยาลัย Queensland ได้แยก programmed cell death กับ traumatic cell death (necrosis) ออกจากกัน และได้กำหนดชื่อกระบวนการตายของเซลล์ตามธรรมชาติว่า apoptosis⁽⁴⁷⁾ apoptosis เป็นกระบวนการที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต ช่วยรักษาสมดุลในร่างกาย และกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ⁽⁴⁸⁾ โดยสิ่งกระตุ้นนั้นมีทั้งจากภายในและภายนอกร่างกาย เช่น รังสียูวีจากแสงแดด (UV radiation) สารอนุมูลอิสระ และสารเคมีภายในร่างกายที่สามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้⁽⁴⁹⁾ การเกิด apoptosis ถูกเหนี่ยวนำผ่านทาง 2 กระบวนการ ได้แก่ intrinsic และ extrinsic pathways ลักษณะเฉพาะของการเกิด apoptosis คือ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และทางชีวภาพซึ่งได้แก่ การหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage), chromatin condensation, phosphatidylserine จะพลิกตัวออกมาด้านนอก plasma membrane และเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นๆ เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งจะถูกกำจัดโดยเซลล์ในกลุ่ม phagocyte เช่น macrophage ต่อไป โดยไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ซึ่งแตกต่างจากการตายแบบ necrosis ที่จะมีกระบวนการอักเสบร่วมด้วย และ apoptosis ยังเกี่ยวข้องกับอีกหลายโรค ได้แก่ การบาดเจ็บของระบบประสาทเฉียบพลัน (acute neurological injuries) โรคที่มาจากความผิดปกติของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) โรคหัวใจและหลอดเลือด

(cardiovascular diseases) โรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน(immunological diseases) โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immunodeficiency syndrome) และมะเร็ง (cancer) เป็นต้น⁽⁵⁰⁾

รูปแบบและลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาหรือ **morphological changes** เป็นกระบวนการที่สามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในระหว่างเกิดกระบวนการ apoptosis ขึ้นนั้น เซลล์จะเกิดการหดตัว มีขนาดเล็กลงเนื่องจากไซโทพลาสซึมและออร์แกเนลล์ (organelle) ภายในเซลล์จะมีการหดตัวเกิดการรวมตัวกันแน่น เกิด chromatin condensation ต่อมาเมื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการพองออกเป็นกระเปาะ และแยกตัวออกเป็นชิ้นส่วนที่เรียกว่า apoptotic bodies ชิ้นส่วนเหล่านี้จะถูกกำจัดโดยการจับกินของเซลล์ phagocyte (ภาพประกอบ 19) เช่น macrophage ซึ่งจะทำให้การย่อยเซลล์ที่เกิด apoptosis และกำจัดออกจากเนื้อเยื่อในบริเวณนั้นโดยปราศจากการอักเสบของเนื้อเยื่อ⁽⁵⁵⁾



ภาพประกอบ 19 กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis⁽⁵⁶⁾

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหรือ **biochemical changes** เซลล์ที่เกิด apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีโดยส่วนใหญ่แล้วจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในตระกูล

cysteinyI aspartate proteinases หรือ caspase ที่ทำหน้าที่ในการเข้าตัด DNA ในบริเวณ linker DNA ออกเป็นชิ้นส่วนของ DNA สายสั้นๆ เหตุการณ์ดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างจำเพาะในเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis⁽⁵⁷⁾

ตัวกลางในการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis แบ่งออกเป็น

1. เอนไซม์ caspase
2. โปรตีนในตระกูล Bcl-2 (Bcl-2 family protein)
3. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)

เอนไซม์ caspase

เอนไซม์ในตระกูล caspase จะมีคุณสมบัติในการเป็น aspartate-specific cysteine proteases คือจะมีการดะมีโน cysteine อยู่ในตำแหน่ง active site เพื่อกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว โดยในภาวะปกติเอนไซม์ caspase จะถูกสร้างให้อยู่ในรูปของ procaspase ซึ่งไม่สามารถทำงานได้ เมื่อเกิดการกระตุ้นที่ตำแหน่ง active site แบบจำเพาะจะส่งผลให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ caspase ได้ โดยเอนไซม์ caspase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis สามารถแบ่งออกได้เป็น initiator caspase และ effector caspase⁽⁵⁸⁾

Initiator caspase จะประกอบด้วย caspase-2, caspase-8, caspase-9 และ caspase-10

Caspase-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน CASP2 เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียด จะเกิดการส่งสัญญาณการตายของเซลล์ไปกระตุ้นกลุ่มของ death receptor ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะรวมเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนเพื่อให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ caspase-2 การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-2 จะส่งเสริมให้เกิด mitochondrial membrane permeabilization เป็นผลให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c และกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis⁽⁵⁹⁾

Caspase-8 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน CASP8 เอนไซม์ caspase-8 จะถูกกระตุ้นก็ต่อเมื่อมีสัญญาณของ death ligand ที่เข้าจับกับ death receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเอนไซม์ caspase-8 ถูกกระตุ้นจะทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในตระกูล Bcl-2 BH3 interacting domain death agonist หรือ Bid ซึ่งจัดเป็น pro-apoptotic protein ซึ่งจะส่งผลให้เกิด mitochondrial membrane dysfunction เกิดการหลั่งของ cytochrome c ออกมาจาก ไมโทคอนเดรียนำไปสู่กระบวนการ apoptosis⁽⁶⁰⁾

Caspase-9 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน CASP9 เป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกับ apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), cytochrome c และ cofactor คือ ATP/dATP เกิดเป็นโครงสร้างที่มีชื่อว่า apoptosome ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ effector caspase คือ caspase-3 และ caspase-7⁽⁶¹⁾

Caspase-10 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน *CASP10* มีการทำงานคล้ายกับเอนไซม์ caspase-8

Effector caspase จะประกอบด้วย caspase-3, caspase-6 และ caspase-7

Caspase-3 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน *CASP3* การทำงานของเอนไซม์ caspase-3 นั้นจะถูกกระตุ้นมาจากเอนไซม์ caspase-8 และ caspase-9 ซึ่ง downstream substrate ของเอนไซม์ caspase-3 จะได้แก่ DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease (ICAD) และ PARP ⁽⁶²⁾

Caspase-6 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน *CASP6* การทำงานของเอนไซม์ caspase-6 เกิดขึ้นในลักษณะเดียวกับเอนไซม์ caspase-3 ที่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ caspase-9 ส่วน downstream substrate ของเอนไซม์ caspase-6 นั้นจะเป็น lamin A ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการพองออกเป็นกระเปาะของเยื่อหุ้มเซลล์ และนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis ⁽⁶³⁾

Caspase-7 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน *CASP7* เอนไซม์ caspase-7 จะมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ caspase-3 ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้น หรือแม้กระทั่ง downstream substrate ⁽⁶⁴⁾

Bcl-2 family protein

โปรตีนในตระกูล Bcl-2 จัดเป็นกลุ่มของ proto-oncogene ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น pro-apoptotic protein และ anti-apoptotic protein สมาชิกของโปรตีนในตระกูล Bcl-2 จะมีส่วนบริเวณของ Bcl-2 homology (BH) domain ที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved domain) โดยในกลุ่มแรกคือ pro-apoptotic protein เช่น โปรตีน Bcl-2 homologous antagonist/ killer (Bak), Bcl-2 associated death promoter (BAD), Bcl-2 associated X protein (Bax), Bid และ Bcl-2 interacting killer (Bik) โปรตีนในกลุ่มนี้จะมีบริเวณของ BH3 domain ที่อนุรักษ์ไว้ในขณะที่โปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic protein เช่น โปรตีน myeloid cell leukemia (Mcl-1), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) และ B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) จะมีบริเวณของ BH4 domain ทำให้สรุปได้ว่า BH4 มีความเกี่ยวข้องในการยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในขณะที่ BH3 domain จะมีส่วนของ death promoter ทำให้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ⁽⁶⁵⁾

PARP

PARP เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA พบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ เมื่อเกิดความผิดปกติของ DNA แบบ single strand DNA breaks (SSB) PARP จะเข้าทำหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA แต่ในสถานะที่เซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis PARP จะถูกยับยั้งการทำงานโดยเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-7 ทำให้ PARP ไม่สามารถทำงานได้ ⁽⁶⁶⁾

วิธีการส่งสัญญาณ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) หรือ MAPK signaling pathway

MAPK signaling pathways คือ วิธีการส่งสัญญาณทางชีวเคมีที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ยูคาริโอตในหลายด้าน ได้แก่ ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ของเซลล์ (differentiation) การอยู่รอดของเซลล์ การตายของเซลล์แบบ apoptosis และการปรับกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์

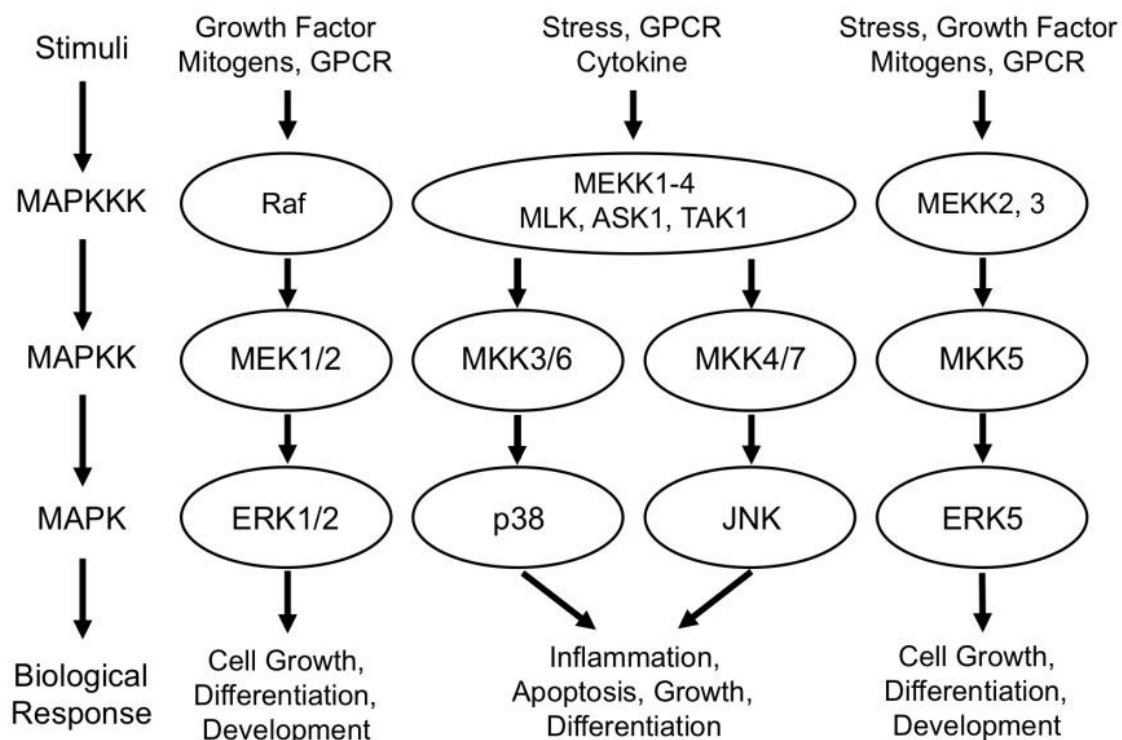
การกระตุ้นการทำงานของวิธีการส่งสัญญาณ MAPK นั้น เกิดขึ้นจากสัญญาณจากภายนอกเซลล์กระตุ้นผ่านกลุ่มของโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะได้แก่ G-protein ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กเกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต เมื่อ G-protein เหล่านี้ถูกกระตุ้นแล้วจะเกิดการถ่ายทอดสัญญาณไปยังโปรตีนในกลุ่ม MAPKKK เกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งกรดอะมิโน serine และ threonine เมื่อโปรตีนในกลุ่ม MAPKKK สามารถทำงานได้แล้วจะเกิดการส่งต่อสัญญาณเป็นลำดับขั้นให้แก่โปรตีนในกลุ่ม MAPKK และ MAPK ตามลำดับด้วยกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต ประกอบด้วยการกระตุ้น 3 ลำดับ⁽⁶⁷⁾ ดังนี้

1. สัญญาณจากภายนอกกระตุ้น MAPKKK เติมหมู่ฟอสเฟตให้ MAPKK บริเวณ serine และ threonine

2. MAPKK กระตุ้น MAPK โดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้ MAPK

3. MAPK ส่งสัญญาณต่อไป⁽⁶⁸⁾

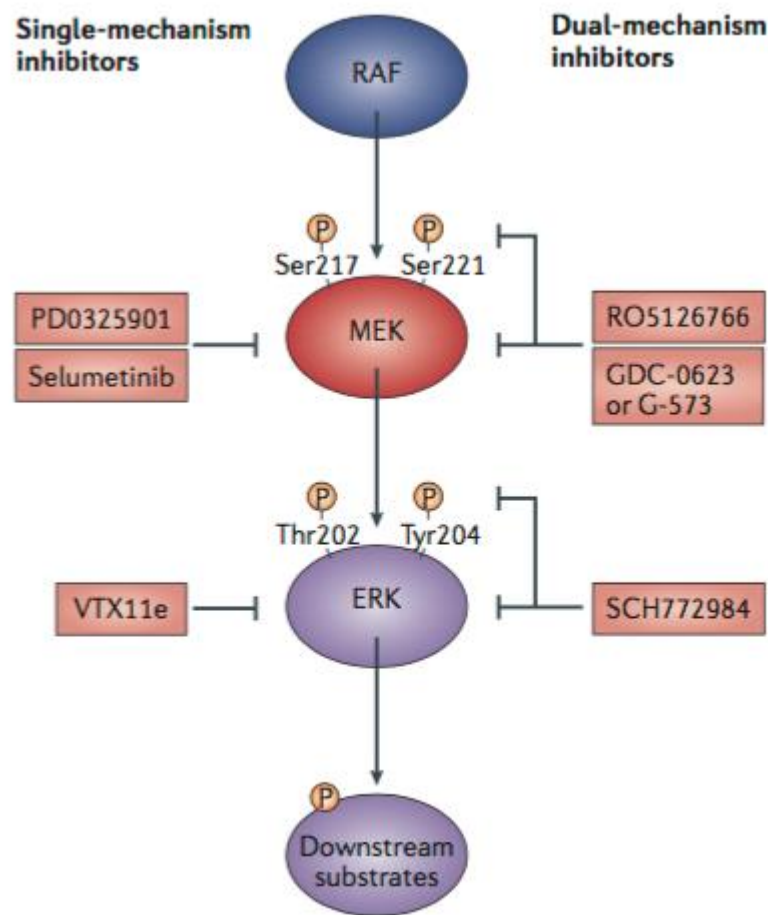
ซึ่งโปรตีนในกลุ่ม MAPK นั้นจะประกอบด้วยโปรตีน ERK1/2, p38 และโปรตีน JNK1/2 โดยที่โปรตีนในกลุ่มนี้จะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น กระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ กระบวนการอยู่รอดของเซลล์รวมถึงกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ดังแสดงในภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 วิธีการส่งสัญญาณ MAPK ที่มีการส่งต่อสัญญาณเป็นลำดับขั้นด้วยกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต⁽⁶⁹⁾

Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) signaling pathway

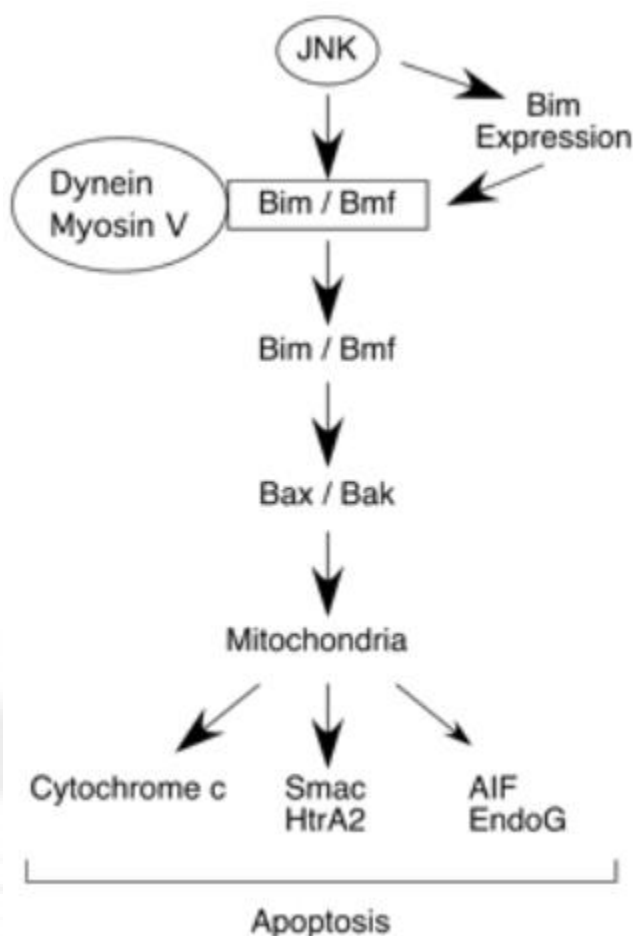
ERK เป็น MAPK signaling pathway แรกที่ถูกค้นพบ มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ โดยมี ERK1 และ ERK2 เป็นส่วนประกอบหลักที่พบ ERK1/2 ถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตบริเวณ Thr202/Tyr204⁽⁷⁰⁾ โดย MAP/ERK kinase 1/2 (MEK1/2) ซึ่งเป็น MAPKK⁽⁷¹⁾ (ภาพประกอบ 21) ERK1/2 จะกระตุ้นการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ของเซลล์กระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์ และต่อต้านการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยเพิ่มกระบวนการ transcription ของยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของเซลล์⁽⁷²⁾



ภาพประกอบ 21 การกระตุ้นการทำงานของ MEK และ ERK⁽⁷⁰⁾

JNK 1/2 (C-Jun N-terminal kinase 1/2) signaling pathway

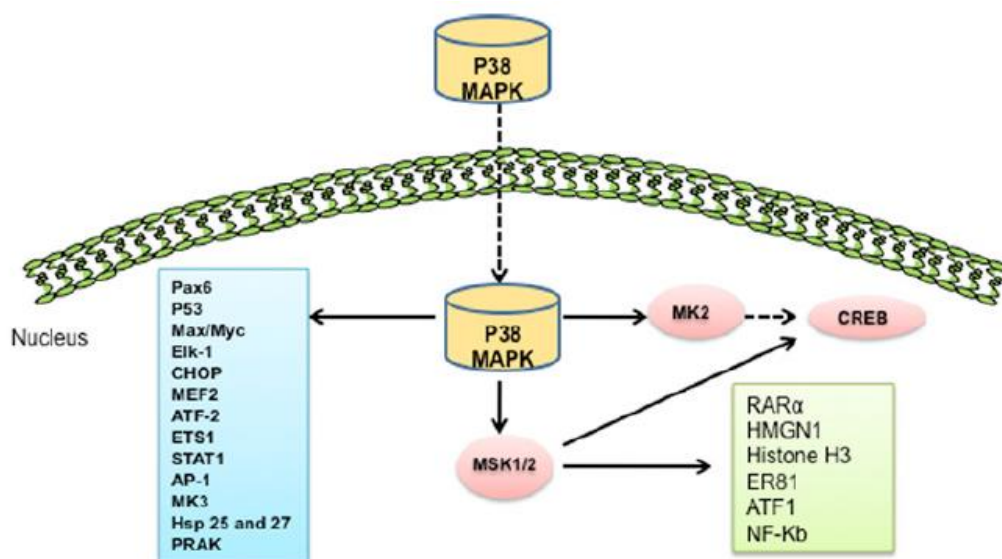
JNK เป็นหนึ่งใน MAPK signaling pathway ที่มีอยู่ในเกือบทุกเซลล์ ที่มีการตอบสนองต่อ cytokines, รังสียูวี, การขาด growth factor และ DNA damage^(73, 74) วิธีการส่งสัญญาณ JNK ถูกกระตุ้นโดย MKK4 และ MKK7 kinases เกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง, เส้นเลือดในสมองตีบ, กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด, และโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอื่นๆ⁽⁷⁵⁾ JNK1/2 จะกระตุ้นสารซึ่งเกี่ยวข้องกับ pro-apoptotic activity⁽⁷⁶⁾ (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 22 การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน JNK ⁽⁷⁷⁾

p38 MAPK signaling pathway

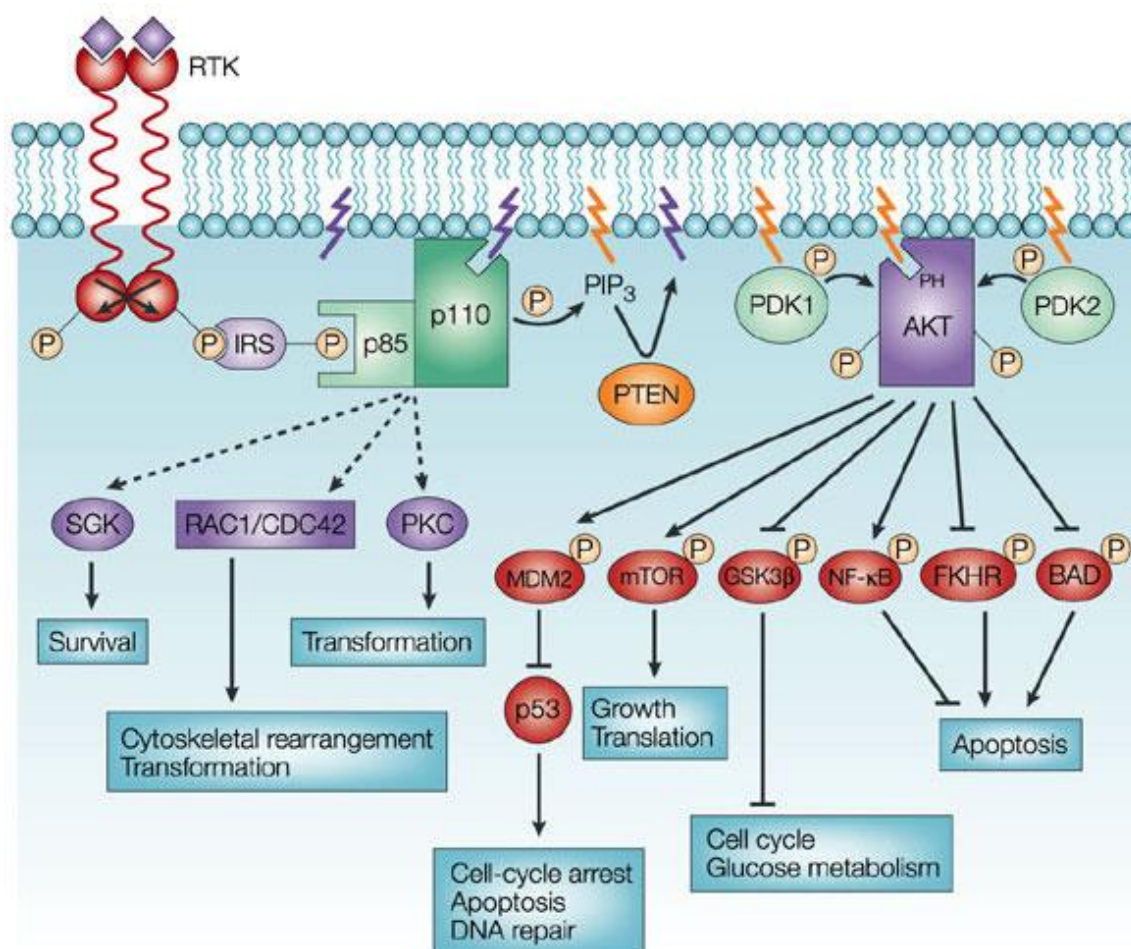
p38 เป็นหนึ่งใน MAPK signaling pathway จะตอบสนองต่อภาวะเครียด, cytokines, รังสียูวี, ความร้อน, ภาวะขาดน้ำ และเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ถูกกระตุ้นโดย MKK3 และ MKK 6 kinases⁽⁷⁸⁾ p38 เป็น tumor suppressor โดยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis และลดการแบ่งตัวของเซลล์แต่ p38 สามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ และการสร้างเส้นเลือดใหม่ได้ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญของมะเร็ง⁽⁷⁹⁾ และ p38 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้⁽⁸⁰⁾ นอกจากนี้โปรตีน p38 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis ได้ เช่น CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF-2), Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), activator protein-1 (AP-1) (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 23 การทำงานของโปรตีน p38⁽⁸¹⁾

Akt signaling pathway

Akt serine/threonine kinase หรือรู้จักกันในชื่อ protein kinase B (PKB) เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในเรื่องการเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ โปรตีน Akt สามารถถูกกระตุ้นได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น ความร้อน, รังสียูวี, การขาดเลือด, ภาวะขาดออกซิเจน, ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ เป็นต้น โปรตีน Akt โปรตีน 3-phosphoinositide-dependent protein (PDK) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีน Akt โดยที่โปรตีน PDK จะหน้าที่ในการเข้าเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน Akt ในตำแหน่งกรดอะมิโน Thr308 และ Ser473 (ภาพประกอบ 24)

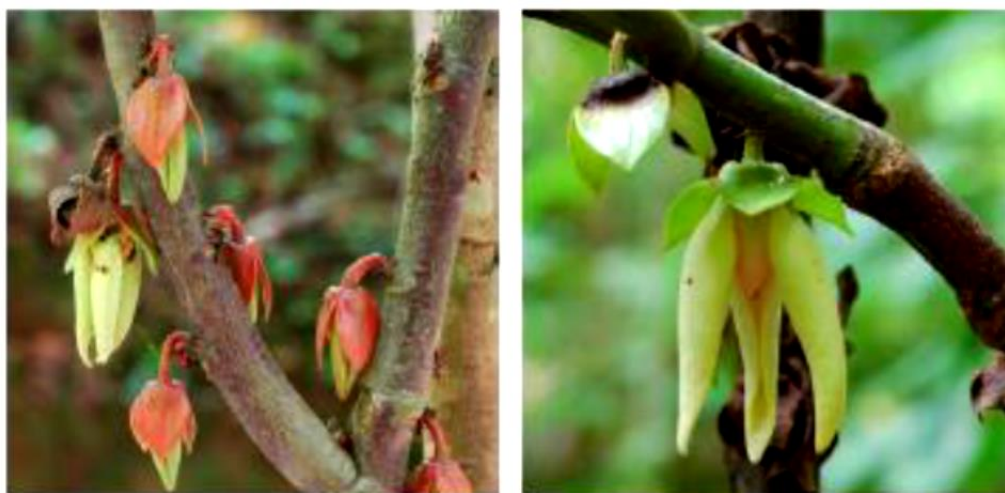


ภาพประกอบ 24 วิธีการส่งสัญญาณ AKT⁽⁸²⁾

Akt สามารถเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ได้ทั้งทางตรง และทางอ้อม เช่น ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน BAD โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ BAD บริเวณตำแหน่ง Ser136 ในภาวะปกติโปรตีน BAD ซึ่งจะจัดอยู่ในกลุ่ม pro-apoptotic protein การยับยั้งการทำงานของโปรตีน BAD จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ apoptosis รวมทั้งการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Nuclear Factor Kappa Beta (NF-κB) ซึ่งจะส่งผลต่อการยับยั้งกระบวนการ apoptosis เช่นเดียวกัน ในกระบวนการอยู่รอดของเซลล์ โปรตีน Akt จะทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) ส่งเสริมให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจาก mTOR เป็นวิธีการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolism ของเซลล์ ที่ส่งเสริมให้เกิดการอยู่รอดของเซลล์⁽⁸³⁾

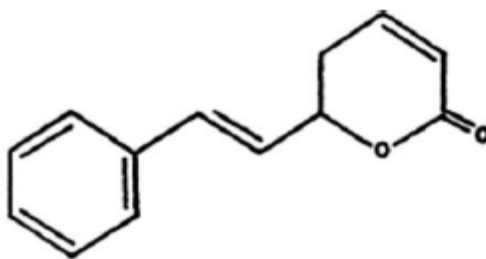
Goniothalamine

สาร goniothalamine เป็นสารสกัดที่สามารถสกัดได้จากราก ใบ ลำต้น และเปลือกของพืช ในตระกูล Annonaceae สกุล *Goniothalamus* เช่น *G. macrophyllus*, *G. tapisoides*, *G. andersonii* เป็นต้น⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้สาร goniothalamine ที่สกัดมาจากลำต้นของพืช *G. macrophyllus* เป็นพืชที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย มีชื่อเรียกในภาษาท้องถิ่นว่า ชิงดอกเดียว หรือต้นราชครู⁽⁸⁷⁾ สามารถพบได้ในป่าที่มีฝนตกชุก โตได้สูงสุดประมาณ 5 เมตร (ภาพประกอบ 25) มักจะใช้เป็น สมุนไพรในการรักษาไข้ เช่น ไข้หวัด และมาลาเรีย เป็นต้น⁽⁸⁸⁾ สาร goniothalamine จัดอยู่ในกลุ่มของสารประเภท styryl-lactones ที่เป็นสาร secondary metabolite ที่ได้จากพืช⁽⁵⁰⁾



ภาพประกอบ 25 *G. macrophyllus* หรือชิงดอกเดียว⁽⁸⁹⁾

สำหรับสาร goniothalamine นั้น ได้มีการงานวิจัยหลายๆ งานวิจัยที่ได้รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารดังกล่าวในด้านของการเป็นสารต้านเซลล์มะเร็ง และยับยั้งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในมนุษย์หลายชนิด ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคจำพวกแบคทีเรีย และรา รวมทั้งมีความสามารถในการกำจัดแมลง โดยที่สาร goniothalamine มีสูตรโมเลกุล คือ $C_3H_{12}O_2$ และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 200.23 g/mol โครงสร้างทางเคมีของสาร goniothalamine แสดงดังภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 โครงสร้างทางเคมีของสาร goniothalamin⁽⁹⁰⁾

ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว (human leukemia) Petsophonsakul และคณะในปี 2013 ได้มีกรายงานว่าสาร goniothalamin มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 และ U937 และมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยเพิ่มระยะ sub-G1 ของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด รวมถึงการลด mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m) ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 และ caspase-9⁽⁹¹⁾ นอกจากนี้รายงานดังกล่าวยังมีรายงานของ Inayat-Hussain และคณะในปี 2003 ได้รายงานว่าสาร goniothalamin มีผลต่อการลดลงของ $\Delta\Psi$ m และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-3,-7 และ caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 ซึ่งเป็นการเพิ่มการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งผ่านทาง intrinsic และ extrinsic pathway⁽⁹²⁾ รวมถึงงานวิจัยของ Inayat-Hussain และคณะในปี 1999 ได้รายงานว่าสาร goniothalamin กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-7 ในเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat T⁽⁸⁶⁾

ในปี 2011 Al-Qubaisi และคณะ ได้รายงานผลของสาร goniothalamin ต่อเซลล์มะเร็งตับในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และลดระยะ G2/M ในวัฏจักรของเซลล์⁽⁹⁰⁾ และจากการศึกษาในเซลล์มะเร็งตับ (liver cancer cell) ชนิด HepG2 และเซลล์ตับปกติ (normal liver cell) ชนิด Chang ของ Al-Qubaisi และคณะ ในปี 2013 พบว่าสาร goniothalamin เพิ่มการเกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง HepG2 ผ่านทางเอนไซม์ caspase-3 แต่ไม่เพิ่มการตายในเซลล์ตับปกติ⁽⁹³⁾

ในปี 2011 Chiu และคณะ ได้ศึกษาผลของสาร goniothalamin ต่อเซลล์มะเร็งปอด (non-small cell lung cancer (NSCLC, H1299) พบว่าสาร goniothalamin สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดได้ ผ่านทางลดการทำงานของ matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) และ matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) และเหนี่ยวนำให้เกิด DNA damage ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis⁽⁹⁴⁾

ในมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) Alabsi และคณะ (2012) ได้ศึกษาเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa พบว่าสาร goniothalamin เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ผ่านทางการแสดงออกของ phosphatidylserine ที่ปรากฏบนเยื่อหุ้มเซลล์ในขณะที่เซลล์เกิด

กระบวนการ apoptosis และยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งโดยยับยั้งเซลล์หยุดอยู่ในระยะ S ในวัฏจักรของเซลล์⁽⁸⁴⁾ นอกจากนี้ Lin และคณะ (2003) ได้ศึกษาเพิ่มเติมกับเซลล์มะเร็งรังไข่ (human ovarian cancer cell line) ชนิด Caov-3 พบว่าสาร goniothalamine กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งรังไข่โดยไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติ (normal kidney cell, MDBK) เมื่อเทียบกับการทดลองโดยใช้ยาสำหรับการรักษามะเร็งคือ tamoxifen หรือ taxol⁽⁹⁵⁾

ในมะเร็งช่องปาก (oral cancer) Yen และคณะ (2012) ได้ศึกษาเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด Ca9-22 พบว่าสาร goniothalamine สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ โดยเพิ่มระยะ sub-G1 เหนี่ยวนำให้เกิด DNA break โดยเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์มะเร็ง และลด $\Delta\Psi_m$ ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้จะนำไปสู่การกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis⁽⁹⁶⁾ นอกจากนี้ Vendramini-Costa และคณะ (2016) ได้รายงานถึงผลของสาร goniothalamine ต่อการเกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ (colon cancer cell) ชนิด HT-29 ผ่านทางารเพิ่มขึ้นของ ROS และเอนไซม์ caspase-3⁽⁹⁷⁾ และในปี 2015 Sophonnithiprasert และคณะ ได้ทำการศึกษาเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo พบว่าเมื่อใช้สาร goniothalamine คู่กับ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) จะส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase ทั้ง extrinsic และ intrinsic pathway และยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทาง death receptor 5 (DR5) และลดการทำงานของ anti-apoptotic protein ได้แก่ FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein (cFLIP)⁽⁹⁸⁾

สำหรับในมะเร็งเต้านม (breast cancer) Chen และคณะ (2005) รายงานว่าสาร goniothalamine เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ระยะ G2/M และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยสาร goniothalamine จะเพิ่มระดับ ROS และลด intracellular free thiol ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เป็นเหตุให้เซลล์มะเร็งเข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis⁽⁹⁹⁾ และในปี 2016 Innajak และคณะ ได้มีการรายงานว่าสาร goniothalamine กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SK-BR-3 เข้าสู่กระบวนการ apoptosis โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 และ caspase-7 กระตุ้นการทำงานของโปรตีน JNK1/2 และ p38 ส่งผลให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis กระตุ้นให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PARP ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA repair และยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ผ่านโปรตีน Akt และ ERK1/2⁽¹⁰⁰⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) (Horizontal Laminar Airflow Cabinets) บริษัท Nuaire
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO₂ incubator) บริษัท Nuaire
3. Microplate reader บริษัท Multiskan EX; Thermo Electron Corp
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ บริษัท International equipment company
5. Fluorescence microscopy บริษัท Olympus
6. ชุด Western blot analysis บริษัท Bio-Rad Laboratories
7. ชุด CCD camera บริษัท GeneGnome Gel Documentation; Synoptics

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI บริษัท Gibco
2. Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2, 5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate) บริษัท Sigma-Aldrich
3. Fetal bovine serum (FBS) บริษัท Merck Millipore Corp
4. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) บริษัท Sigma-Aldrich
5. 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide (JC-1) บริษัท Sigma-Aldrich
6. Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) บริษัท Sigma-Aldrich
7. Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท Merck Calbiochem
8. Guava Cell Cycle[®] reagent บริษัท Merck Millipore Corp
9. Antibody บริษัท Cell Signaling Technology, Inc.
10. สารgoniothalamine

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI โดยเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (flask) ขนาด 75 cm³ นำไปบ่มใน CO₂ incubator ที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และ

เปอร์เซ็นต์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่ 37°C และ 5% CO_2 ตามลำดับ ทำการ subculture และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน

2. การทดสอบความเป็นพิษของสาร goniothalamine ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanomaA375 ด้วยวิธี MTT (MTT assay)

MTT assay เป็นเทคนิคที่ใช้วัดความเป็นพิษของสารโดยที่วัดความอยู่รอดของเซลล์อาศัยการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial reductase ในเซลล์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารละลาย MTT (สีเหลือง) ไปเป็นผลึก formazan (สีม่วง) ใช้บอกว่าเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต/การแบ่งตัว โดยที่เซลล์อาจจะตายหรือไม่ก็ได้⁽¹⁰¹⁾

โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanomaA375 ใน 96-well plate (5×10^3 cells/well) และเพาะเลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำ goniothalamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ คือ 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับกลุ่มควบคุม (control) นั้นจะใช้ DMSO และทำการเพาะเลี้ยงใน CO_2 incubator อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำละลาย MTT ในทุกหลุมของ 96-well plate นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดสารละลาย MTT ที่เป็นส่วนเกินออก ในขั้นตอนนี้สาร MTT จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ mitochondrial reductase ในเซลล์ที่ยังมีชีวิต ทำให้เห็นเป็นผลึกสีม่วงที่ติดอยู่ที่ก้นหลุมของ plate จากนั้นเติม DMSO เพื่อละลายผลึกดังกล่าวลงไปในครกทุกหลุม หลุมละ 100 μL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา IC_{50} และเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์หรือ % cell viability

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางนิวเคลียสในเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma ด้วยวิธีการย้อม Hoechst (Hoechst staining assay)

เนื่องจากการเข้าทำงานของเอนไซม์ caspase ซึ่งเป็นกระบวนการสุดท้ายของกระบวนการตายแบบ apoptosis ทำให้ DNA เกิดการแตกหักออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ที่เรียกว่า apoptotic bodies โดยที่กระบวนการดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมสีเรืองแสง คือ Hoechst 33342 สำหรับการทำงานของ Hoechst 33342 นั้นจะทำหน้าที่เข้าจับกับ DNA ในบริเวณ minor groove ของ DNA สายคู่ และเมื่อสารเรืองแสงดังกล่าวถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 460-490 นาโนเมตร จะเกิดการเรืองแสงขึ้นทำให้สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้⁽¹⁰²⁾

โดยมีขั้นตอนการทำคือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง melanomaA375 จะถูกเลี้ยงใน 6-well plate ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำ goniothalamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 3, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับกลุ่มควบคุม (control) นั้น จะใช้ DMSO และทำการเพาะเลี้ยงใน CO_2 incubator อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลาสารเรืองแสง Hoechst 33342 จะถูกเติมเข้าไปในแต่ละหลุมของ 6-well plate ซึ่งความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่ใช้จะคงที่ไว้ที่ 5 $\mu\text{g/mL}$ ทำการบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิด apoptotic bodies ซึ่ง

เป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ apoptosis จากการทำงานของเอนไซม์ caspase ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 460-490 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) ด้วยวิธีการย้อม JC-1 (JC-1 staining assay)

สารเรืองแสง JC-1 เป็นสารเรืองแสงที่ถูกใช้ในการตรวจสอบสภาพของไมโทคอนเดรียในเซลล์ปกติที่ไมโทคอนเดรียมีสภาพสมบูรณ์ JC-1 จะสะสมอยู่ในรูปของโครงสร้างที่เรียกว่า J-aggregate ซึ่งจะแสดงผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เป็นสีแดง และในทางกลับกันเซลล์ที่เกิด apoptosis เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียจะอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ JC-1 จะอยู่ในรูปของ monomeric ซึ่งจะแสดงผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เป็นสีเขียว⁽¹⁰³⁾

โดยมีขั้นตอนการทำได้คือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง melanomaA375 จะถูกเลี้ยงใน 12-well plate ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมสาร goniothalamin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 3, 5 และ 10 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด JC-1 (5 µg/mL) จะถูกเติมลงใน 12-well plate และทำการบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์

5. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot (Western blot analysis)

Western blot เป็นเทคนิคที่ใช้ในการติดตามโปรตีนที่สนใจโดยใช้ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และใช้ไฟฟ้าเหนี่ยวนำให้โปรตีนเคลื่อนตัวไปบนเจล หลังจากนั้นโปรตีนจะถูกย้ายไปไว้บน polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane และใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการไว้ก่อนแล้ว หลังจากนั้นเป็นการตรวจจับ antibody-antigen complex โดยการใช้ secondary antigen แอปโปรตีนบน membrane จะถูกตรวจสอบโดยใช้ chemiluminescence signal และ CCD camera โดยขั้นตอนของการทดลองแบ่งได้เป็น

Sample preparation

เซลล์มะเร็งผิวหนัง melanomaA375 จะถูกเลี้ยงใน 6-well plate ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำ goniothalamin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 3, 5 และ 10 µg/mL และใช้ DMSO เป็นกลุ่มควบคุม และนำไปบ่มต่อใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และล้างด้วย PBS เย็น และ lyse cell ด้วย lysis buffer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใสของโปรตีนตัวอย่างออกจากตะกอน จากนั้นนำโปรตีนตัวอย่างไปวัดเพื่อหาความเข้มข้นต่อไป

Protein determination

ความเข้มข้นของโปรตีนสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีของ Bradford ซึ่งใช้ Bio-Rad protein assay และใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

Preparation of SDS-PAGE

เจลมีส่วนประกอบคือ acrylamide, bisacrylamide และ Tris-HCl buffer เจลถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ stacking gel และ separating gel

Stacking gel จะอยู่ด้านบน เป็นส่วนที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ต่ำ pH ต่ำ มีความสามารถในการ resolve ต่ำ ตัวอย่างโปรตีนจะถูกใส่บริเวณ stacking gel และวิ่งลงสู่เจลด้านล่างต่อไปโดยอาศัยการแยกตามขนาดของโปรตีน

ตารางที่ 1 การเตรียม stacking gel

Stock solution	10%	12%
dH ₂ O	2.42 mL	2.17 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 mL	1.25 mL
10% SDS	50 µL	50 µL
40% acrylamide	1.25 mL	1.5 mL
10% ammonium persulfate	25 µL	25 µL
TEMED	2.5 µL	2.5 µL
Total volume	5 mL	5 mL

Separating gel เป็นเจลที่อยู่ส่วนล่าง ซึ่งเป็นบริเวณที่โปรตีนจะมีการแยกตัวกันตามขนาดของโปรตีน ซึ่งความเข้มข้นของ acrylamide ใน separating gel จะถูกปรับตามขนาดของโปรตีนที่ต้องการติดตาม

ตารางที่ 2 การเตรียม separating gel

Stock solution	Volume (per 1 gel)
dH ₂ O	1.52 mL
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	0.25 mL
10% SDS	20 µL
40% acrylamide	0.196 mL

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Stock solution	Volume (per 1 gel)
10% ammonium persulfate	10 μ L
TEMED	2 μ L
Total volume	2 mL

Running condition

นำโปรตีนตัวอย่างที่ได้ผสมกับ 5x buffer loading dye (60 mM Tris-HCl; pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol และ 0.1% bromophenol blue) และนำไปต้มเพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างของโปรตีน (denature) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำโปรตีนตัวอย่างที่ได้ไปทำการแยกด้วย SDS-PAGE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลลง PVDF membrane (Bio-Rad)

Protein detection

หลังจากการย้ายโปรตีนลงสู่ PVDF membrane ส่วนของ membrane จะถูก block ด้วย 5% non-fat milk in TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการลด non-specific protein ที่จะเกิดขึ้น จากนั้นโปรตีนตัวอย่างที่อยู่บน membrane จะถูกจับกับ primary antibody ที่ต้องการศึกษาโดยป่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาล้าง primary antibody ส่วนเกินด้วย TBST เป็นเวลา 10 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง และนำไปป่มกับ secondary antibody ที่จำเพาะต่อ primary antibody ที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง secondary antibody ส่วนเกินเหมือน primary antibody สำหรับการตรวจสอบนั้นจะใช้ chemiluminescence HRP substrate

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิตินั้น ผลการทดลองจะได้มาจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และแสดงค่า mean $\pm$ standard deviation (SD) ส่วนการทดสอบความแตกต่างทางสถิตินั้นจะใช้การทดสอบทางสถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS statistical software package (version 15) สำหรับการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของโปรตีนนั้นจะใช้โปรแกรม Image J densitometer เพื่อเป็นการคำนวณระดับความเข้มของแถบโปรตีนเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 4

ผลการศึกษา

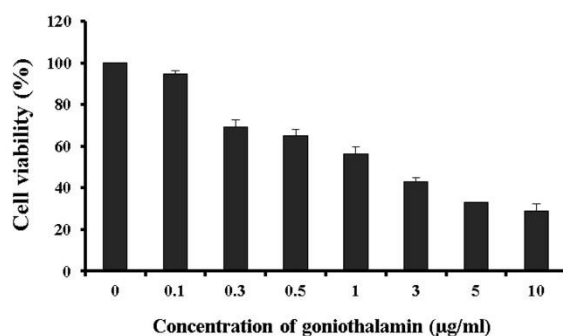
ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร goniothalamine ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma A375

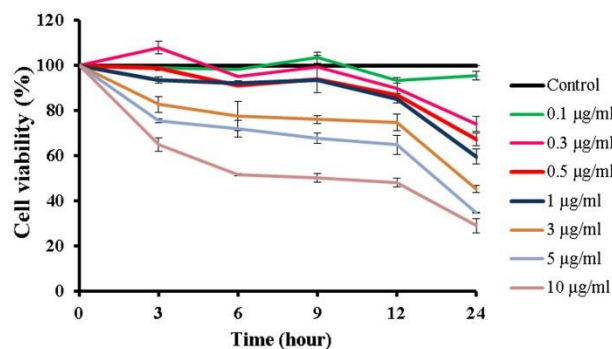
การศึกษาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง melanoma ใช้วิธี MTT (MTT assay) โดยใช้สาร goniothalamine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ และแปลผลที่ 24 ชั่วโมง พบว่าสาร goniothalamine สามารถยับยั้งและลดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ได้ โดยมี IC_{50} อยู่ที่ $1.7 \pm 0.627 \mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพประกอบ 27A และผลจากการทดสอบพบว่าสาร goniothalamine สามารถลดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง melanoma ได้โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของสาร goniothalamine ที่ใช้ (time- and dose-dependent manner) ดังแสดงในภาพประกอบ 27B



A



B



ภาพประกอบ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร goniothalamine ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma A375 (A) ผลการทดสอบความเป็นพิษที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร goniothalamine ที่ 24 ชั่วโมง (B) สาร goniothalamine สามารถยับยั้งและลดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง melanoma A375 โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่ใช้ โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

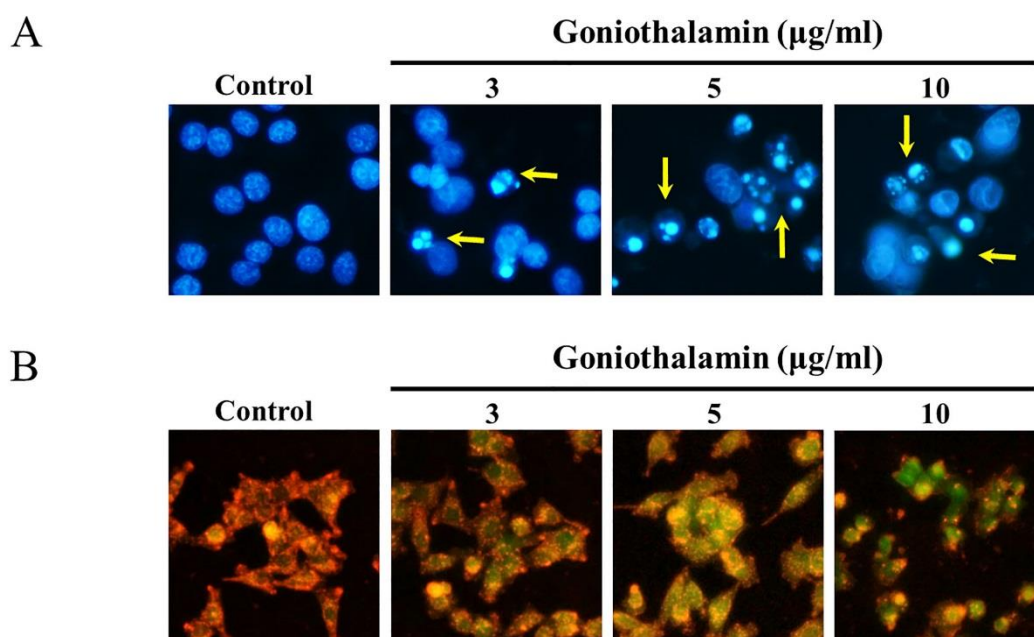
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของนิวเคลียสในเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ด้วยวิธีการย้อม Hoechst (Hoechst staining assay)

การตายแบบของเซลล์แบบ apoptosis นั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส ได้แก่ chromatin condensation และการแตกหักของดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นส่วนที่เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยใช้วิธีการย้อมดีเอ็นเอด้วยสีย้อม Hoechst ที่เป็นสีย้อมพิเศษที่จับกับ DNA ในนิวเคลียสได้อย่างจำเพาะจากการทดสอบพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับสาร goniothalamine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 3, 5 และ 10 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาร goniothalamine สามารถกระตุ้นให้กระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพประกอบ 28A

ผลการวิเคราะห์ mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) ด้วยวิธีการย้อม JC-

1 (JC-1 staining assay)

ผลจากการย้อม Hoechst พบว่าสาร goniothalamin สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ได้ เพื่อเป็นการทดสอบว่าสาร goniothalamin สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทางไมโทคอนเดรียหรือไม่โดยใช้สีย้อม JC-1 ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบสภาพของไมโทคอนเดรีย ผลการทดสอบพบว่าเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ที่ได้รับสาร goniothalamin ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเพิ่มขึ้นของ JC-1 ในรูปแบบของ monomeric form ซึ่งแสดงด้วยแสงสีเขียวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ JC-1 มีการสะสมในรูปแบบของ J-aggregate form ที่แสดงด้วยแสงสีแดง ดังแสดงในภาพประกอบ 28B จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร goniothalamin กระตุ้นให้เกิด apoptosis ผ่านทางไมโทคอนเดรีย

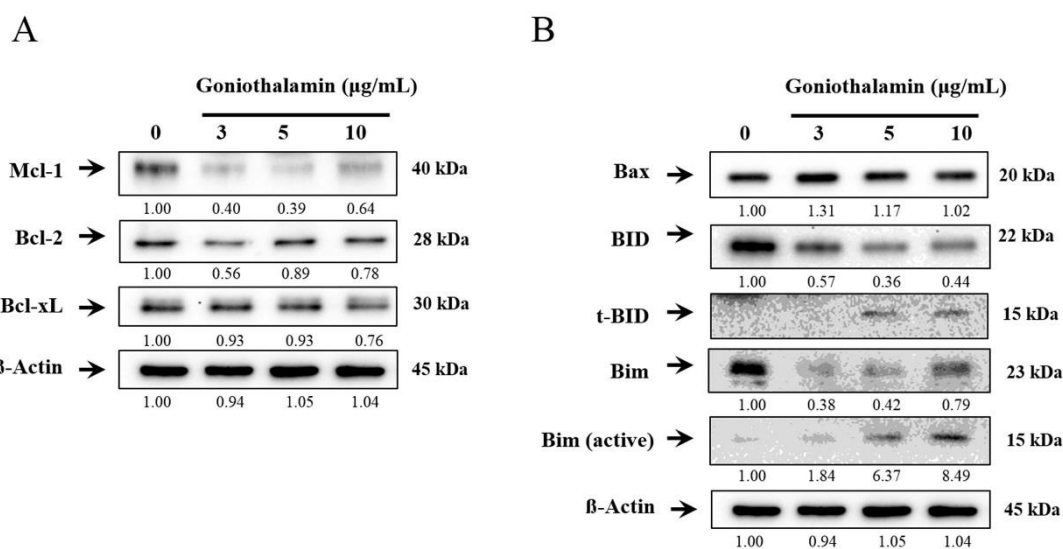


ภาพประกอบ 2 สาร goniothalamin กระตุ้นให้เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง melanoma A375 A) สาร goniothalamin กระตุ้นให้เกิด apoptotic bodies ในเซลล์ที่ได้รับสาร goniothalamin เทียบกับกลุ่มควบคุม B) สาร goniothalamin กระตุ้นให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียซึ่งนำไปสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot (Western blot analysis)

Western blot เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ โดย การศึกษานี้ได้ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้แก่ กลุ่มของ Bcl-2 family, caspases และ cleaved-PARP, MAPK signaling pathway และ Akt signaling pathway ผลของสาร goniothalamine ต่อ โปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family, caspase-7, caspase-9 และ cleaved-PARP

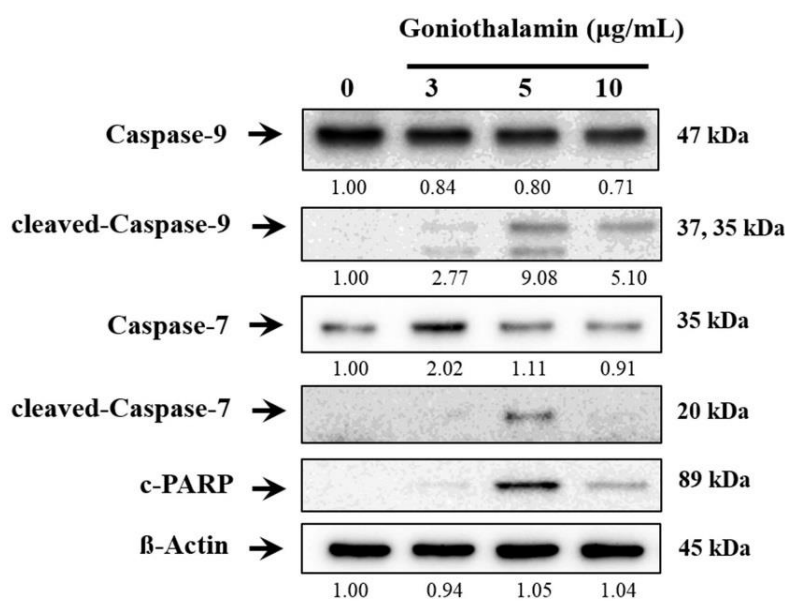
การศึกษาผลของสาร goniothalamine ต่อการเกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทางกลุ่มของโปรตีน Bcl-2 family พบว่าระดับของ Mcl-1, Bcl-2 และ Bcl-xL ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งเกิดการตายแบบ apoptosis (anti-apoptotic protein) ลดลง โดยแสดงตามภาพประกอบ 29A และระดับของ Bax, BID และ Bim ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นการเกิดการตายแบบ apoptosis (pro-apoptotic protein) เพิ่มขึ้นโดยแสดงตามภาพประกอบที่ 29B จากผลผ่านทาง Bcl-2 family protein ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาร goniothalamine สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้



ภาพประกอบ 3 แสดงผลของสาร goniothalamine ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 family ที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร goniothalamine ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 μg/ml (A) แสดงผลของ goniothalamine ต่อการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic protein (B) แสดงผลของ goniothalamine ต่อการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic protein โดยใช้ β-Actin เป็น loading control

การศึกษาโปรตีน caspase-7 และ caspase-9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการตายแบบ apoptosis โดย caspase-9 เป็น initiator caspase และ caspase-7 เป็น effector caspase

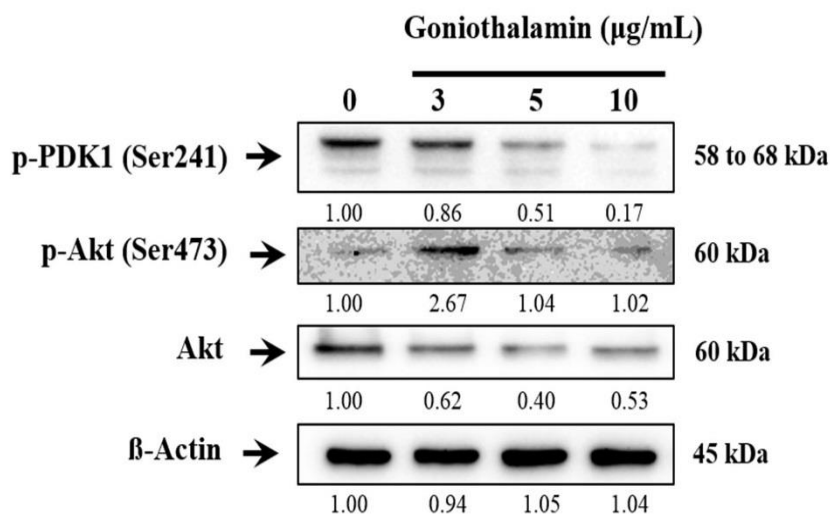
หลังได้รับสาร goniothalamin พบว่า caspase-9 และ caspase-7 รวมทั้ง cleaved-PARP ซึ่งเป็น downstream ของ caspase-7 มีระดับเพิ่มสูงขึ้นโดยสูงสุดที่ความเข้มข้นของสาร goniothalamin เท่ากับ 5 $\mu\text{g/mL}$ โดยแสดงตามภาพประกอบที่ 30 จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาร goniothalamin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านการทำงานของ caspase ได้



ภาพประกอบ 4 แสดงผลของสาร goniothalamin ต่อการแสดงออกของโปรตีน caspase-9, -7 และ cleaved-PARP ที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร goniothalamin ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้ β -Actin เป็น loading control

ผลของสาร goniothalamin ต่อ โปรตีนในกลุ่ม Akt และ MAPK signaling pathway

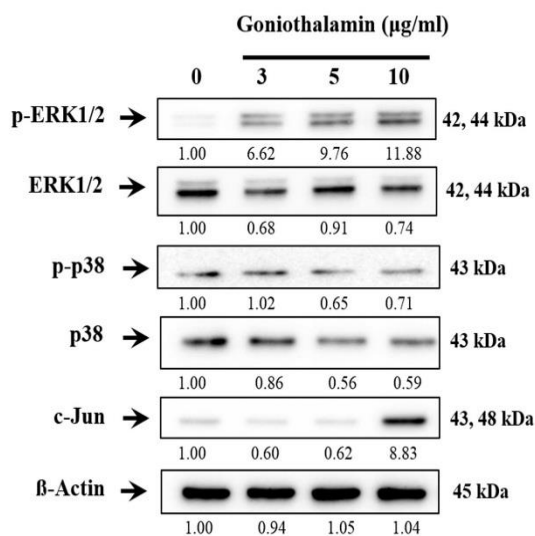
Akt เป็นโปรตีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ และการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ ผลจากการศึกษาพบว่าสาร goniothalamin สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน p-PDK1 (Ser241) และ p-Akt (Ser473) ในเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ดังแสดงในภาพประกอบ 31 จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาร goniothalamin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ได้



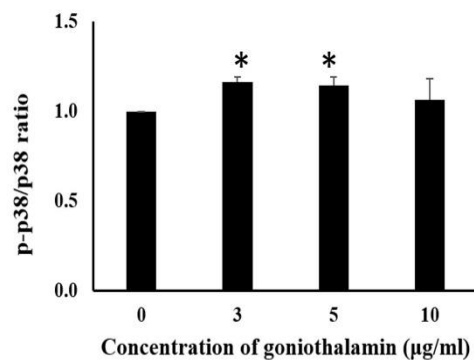
ภาพประกอบ 5 แสดงผลของสาร goniothalamin ต่อการแสดงออกของโปรตีน p-PDK1, p-Akt และ total Akt ที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับสาร goniothalamin ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้ β -Actin เป็น loading control

MAPK เป็นกลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับทั้งการเกิดการเจริญเติบโต และการเกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ ผลจากการศึกษาพบว่าสาร goniothalamin กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งผ่านการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน c-Jun ซึ่งเป็น downstream ของ JNK1/2 เพิ่มการแสดงออกของอัตราส่วนโปรตีน p-p38/p38 รวมถึงเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 ดังแสดงในภาพประกอบที่ 32 แสดงให้เห็นว่าสาร goniothalamin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทาง MAPK ได้

A



B



ภาพประกอบ 6 แสดงผลของสาร goniothalamin ต่อการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม MAPK (A) การแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม MAPK signaling pathway หลังจากเซลล์มะเร็งได้รับสาร goniothalamin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) ระดับของ p-p38 / p38 ratio ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ β -Actin เป็น loading control (*, $p < 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์ A375 ซึ่งถูกใช้เป็น model ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง melanoma มะเร็งผิวหนัง melanoma เป็นมะเร็งผิวหนังชนิดที่สัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตสูงที่สุดซึ่งพัฒนามาจากเซลล์ melanocytes การรักษา มะเร็งผิวหนัง melanoma ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค การผ่าตัดเป็นวิธีการรักษาหลัก แต่อย่างไรก็ตามในระยะของโรคที่รุนแรงขึ้นจำเป็นต้องมีการรักษาร่วม (adjuvant therapy) ร่วมด้วย แต่การรักษาร่วมส่วนใหญ่ยังมีผลข้างเคียงสูง อีกทั้งไม่ได้เพิ่มอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร goniothalamin มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และยังพบว่าสาร goniothalamin เหนียวน้ำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น H1299 (non-small cell lung cancer)⁽⁹⁴⁾, HepG2 (human hepatoblastoma)⁽⁹³⁾, SK-BR-3 (human breast cancer)⁽¹⁰⁰⁾, HL60 (promyelocytic leukemia)⁽⁹¹⁾, HT29 (colon cancer)⁽⁹⁷⁾, HeLa (cervical cancer)⁽¹⁰⁴⁾ และ MDA-MB-231 (invasive breast cancer)⁽⁹⁹⁾ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานถึงผลของสาร goniothalamin ต่อเซลล์ มะเร็งผิวหนัง melanoma (A375)

การศึกษานี้พบว่าสาร goniothalamin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่ใช้ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.7 ± 0.627 ug/mL ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับผลของสาร goniothalamin ในเซลล์อื่นๆ ได้แก่ Innajak และคณะได้ศึกษาพบว่าสาร goniothalamin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม SK-BR-3 โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่ใช้เช่นกัน และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10 ± 0.45 ug/mL⁽¹⁰⁰⁾ และพบว่าที่ 72 ชั่วโมง หลังได้รับสาร goniothalamin เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.46 ug/mL⁽⁹⁹⁾ เพื่อยืนยันการเกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง melanoma A375 หลังจากได้รับสาร goniothalamin คือการตรวจหารูปแบบการตายแบบ apoptosis โดยศึกษาผ่านการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างของนิวเคลียส ได้แก่ chromatin condensation และ apoptotic bodies ซึ่งใช้เทคนิคการย้อมนิวเคลียสด้วยสีย้อม Hoechst พบว่ามี chromatin condensation และ apoptotic bodies ในเซลล์ A375 หลังจากได้รับสาร goniothalamin ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Chen และคณะซึ่งทำการศึกษาเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 โดยเมื่อเซลล์ได้รับสาร goniothalamin ที่ความเข้มข้น 30 ug/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation ขึ้น⁽⁹⁹⁾

จากนั้นได้ศึกษาถึงฤทธิ์ของสาร goniothalamin ต่อเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ในการลดระดับของ $\Delta\Psi_m$ โดยใช้เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยสี JC-1 ซึ่งแปลผลด้วยการดูการเปลี่ยนแปลงของสีที่ย้อมติดเซลล์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ โดยในภาวะของเซลล์ปกติที่มีระดับของ $\Delta\Psi_m$

สูงจะสามารถมองเห็นเป็นสีแดง ในขณะที่เซลล์ที่เกิด apoptosis จะมีระดับของ $\Delta\Psi_m$ ที่ต่ำลงจึงทำให้สามารถมองเห็นเป็นสีเขียว ซึ่งเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ที่ได้รับสาร goniothalmin เมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์พบว่าการเพิ่มขึ้นของสีเขียว ซึ่งหมายถึงมีระดับของ $\Delta\Psi_m$ ที่ลดลง และมีการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้น

จากนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าสาร goniothalmin สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง melanoma A375 จึงได้ทำการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าว

ในกลุ่มของ Bcl-2 family ซึ่งแบ่งออกเป็น anti-apoptotic proteins และ pro-apoptotic proteins พบว่าในกลุ่มของ anti-apoptotic proteins ได้แก่ Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xL มีการแสดงออกที่ลดลง และในกลุ่ม pro-apoptotic proteins ได้แก่ Bax, t-BID and Bim พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับสาร goniothalmin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นอกจากนี้สาร goniothalmin ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านการทำงานของเอนไซม์ caspase คือ caspase-9 และ caspase-7 ในส่วนของ PARP ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA และเป็น downstream substrate ของ caspase-7 PARP สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยการทำงานของ caspase-7 หรือ caspase-3 เพื่อเป็นการกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสาร goniothalmin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ A375 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ที่มีการแสดงออกของ caspase-9 เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร goniothalmin⁽¹⁰⁴⁾ และยังสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่มีการแสดงออกของ cleaved-PARP ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของโปรตีน PARP ที่ถูกยับยั้งการทำงาน (สามารถแยกออกจากรูปแบบของ PARP ที่มีการทำงานแบบปกติได้ด้วยขนาด ซึ่ง cleaved-PARP มีขนาดอยู่ที่ 89 kDa) เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร goniothalmin ที่ความเข้มข้น 30 ug/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง⁽⁹⁹⁾ และยังมีการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม SK-BR-3 ซึ่งให้ผลการศึกษาลดลงกับการศึกษานี้คือเมื่อเซลล์มะเร็งเต้านม SK-BR-3 ได้รับสาร goniothalmin พบว่าการแสดงออกของ caspase-9 และ -7 เพิ่มขึ้น รวมทั้งการแสดงออกของ cleaved-PARP ที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน⁽¹⁰⁰⁾

Akt signaling pathway เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว เจริญเติบโต การอยู่รอด และยับยั้งการเกิดการตายแบบ apoptosis จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานว่สาร goniothalmin ลดการแสดงออกของ phosphorylated Akt (Ser477 และ Thr308) ในเซลล์มะเร็งเต้านม SK-BR-3 นำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis⁽¹⁰⁰⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้โดยเมื่อเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ได้รับสาร goniothalmin พบว่าการลดการแสดงออกของ phosphorylated Akt (Ser473) phosphorylated PDK1 (Ser241) ซึ่งหมายถึงเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ และยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ และนำไปสู่เกิดการตายแบบ apoptosis

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในส่วนของ MAPK signaling pathway โดยที่ MAPK เป็นกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งตัว เจริญเติบโต การอยู่รอดของเซลล์ รวมไปถึงการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ประกอบไปด้วยโปรตีน ERK1/2, JNK1/2 และ p38

p38 เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาร goniothalamin กระตุ้นให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ p-p38 / p38 ratio เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นของสาร goniothalamin 3 และ 5 ug/mL สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ระบุไว้ว่าสาร goniothalamin กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในมะเร็งหลายๆชนิด

สำหรับ ERK1/2 นอกจากจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต และกระบวนการอยู่รอดของเซลล์แล้ว ERK1/2 ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis ด้วยเช่นกัน โดยในงานวิจัยของ Bee-Jen Tan และคณะพบว่า ERK1/2 สามารถกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ได้ ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ได้รับสาร triptolide ผลจากงานวิจัยพบว่า triptolide กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ผ่านการลดการแสดงออกของ phosphorylatedAkt การเพิ่มการแสดงออกของ cleaved-PARP และ phosphorylated ERK1/2 นอกจากนี้ยังลดการแสดงออกของ anti-apoptotic protein Bcl-xL และเพิ่มการแสดงออกของ pro-apoptotic protein Bax เมื่อยืนยันผลผ่านการให้ inhibitor ของ ERK 1/2 (U0126) พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ไม่ได้เข้าสู่กระบวนการ apoptosis จึงสามารถยืนยันได้ว่า ERK1/2 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ได้จริง⁽⁹⁹⁾ สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่สาร goniothalamin สามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ผ่านการทำงานของ ERK1/2

ในส่วนของ JNK1/2 นั้นเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยที่ผลการทดลองพบว่าสาร goniothalamin สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ c-Jun ซึ่งเป็น transcription factor ของ JNK1/2 เมื่อ c-Jun ทำงานจะทำหน้าที่ในการ transcribe gene ที่ทำหน้าที่ผลิต Bim ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่สาร goniothalamin เพิ่มการแสดงออกของทั้ง c-Jun และ Bim

จากการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงผลของสาร goniothalamin ต่อเซลล์มะเร็ง melanoma A375 ในการลดการเจริญ และการอยู่รอดของเซลล์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านการทำงานของ pro-apoptotic protein และ caspase รวมทั้งลดการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม anti-apoptotic protein นอกจากนี้สาร goniothalamin ยังสามารถยับยั้งการเจริญ และการอยู่รอดของเซลล์ผ่านทางกระบวนการทำงานของ Akt signaling pathway และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทาง MAPK signaling pathway ดังนั้นสาร goniothalamin จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง melaoma ในอนาคต



บรรณานุกรม

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT and Murray CJ: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet* 367: 1747-1757, 2006.
2. Armstrong BK and Kricker A: The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63: 8-18, 2001.
3. Diepgen TL and Mahler V: The epidemiology of skin cancer. *British Journal of Dermatology* 146: 1-6, 2002.
4. Strickland PT, Vitasa BC, West SK, Rosenthal FS, Emmett EA and Taylor HR: Quantitative carcinogenesis in man: solar ultraviolet B dose dependence of skin cancer in Maryland watermen. *Journal of the National Cancer Institute* 81: 1910-1913, 1989.
5. Becker J, Schrama D and Houben R: Merkel cell carcinoma. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1-8, 2009.
6. Buitrago W and Joseph AK: Sebaceous carcinoma: the great masquerader. *Dermatologic therapy* 21: 459-466, 2008.
7. Rigel DS: Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58: S129-S132, 2008.
8. Scherer D and Kumar R: Genetics of pigmentation in skin cancer—a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705: 141-153, 2010.
9. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N and Ghosh AC: Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current medicinal chemistry* 8: 1467-1486, 2001.
10. Ellis RE, Yuan J and Horvitz HR: Mechanisms and functions of cell death. *Annual review of cell biology* 7: 663-698, 1991.
11. Wiederschain GY: Essentials of apoptosis. A guide for basic and clinical research. *Biochemistry (Moscow)* 70: 379-379, 2005.
12. Klein G: Cancer, apoptosis, and nonimmune surveillance. *Cell Death & Differentiation* 11: 13-17, 2004.
13. Deeb KK, Trump DL and Johnson CS: Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 7: 684-700, 2007.

14. Kanitakis J: Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology: EJD* 12: 390-9; quiz 400-1, 2001.
15. Tortora G and Derrickson B: *Principles of Anatomy and Physiology: Organisation, Support and Movement and Control Systems of the Human Body*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2009.
16. McLafferty E, Hendry C and Farley A: The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing standard* 27: 35-42, 2012.
17. Burr S and Penzer R: Promoting skin health. *Nursing Standard* 19: 57-65, 2005.
18. Thibodeau GA, Patton KT and Wills. *Structure & function of the body: Mosby Year Book*; 1992.
19. Pringle F, Penzer R and Penzer R. *Normal skin: its function and care: Butterworth-Heinemann London*; 2002.
20. Delicata M and Banerjee A: A rare presentation of Legionnaires' disease. *BMJ case reports* 2015: bcr2013201337, 2015.
21. Integumentary System Skin Diagram, Epidermis Skin Cell Layers & 5 Layers of Epidermis Diagram [Available from: <http://www.gridgit.com/post/dermis-layer-diagram/1407999/>].
22. Wilson D, Wong DL and Hockenberry MJ. *Wong's nursing care of infants and children: Mosby/Elsevier*; 2011.
23. Farley A, McLafferty E and Hendry C. *The Physiological Effects of Ageing: John Wiley & Sons*; 2011.
24. Elder DE and Murphy GF. *Melanocytic tumors of the skin: American Registry of Pathology*; 1991.
25. Murphy GF and Elder DE. *Non-melanocytic tumors of the skin: Armed Forces Institute of Pathology*; 1991.
26. Bray F, Ren JS, Masuyer E and Ferlay J: Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer* 132: 1133-1145, 2013.
27. SEER Stat Fact Sheets: Skin (excl. Basal and Squamous). [cited 2016 october]. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/skin.html>.
28. Skin cancer [Available from: <http://www.chop.edu/healthinfo/skin-cancer.html>].
29. Grossman D, Leffell D. Squamous cell carcinoma In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrist B, Paller A, Leffell D, editors. *Fitzpatrick 's Dermatology in general medicine* 7 th ed. New York McGraw-Hill 2008. p. 1028-36.

30. Stages of Skin Cancer [Available from: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/skin-treatment-pdq#section/all>.
31. 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.
32. NON-MELANOMA SKIN CANCERS (NMSC): BASAL CELL CARCINOMA (BCC) AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA (SCC) [Available from: <https://www.derm101.com/therapeutic/non-melanoma-skin-cancers-nmsc-basal-cell-carcinoma-bcc-and-squamous-cell-carcinoma-scc/initial-evaluation-basal-cell-carcinoma/>.
33. Chirino ME, Rossi Rodríguez V, Rodríguez Saa S and Villa R: Tumoración rosada en mama. Dermatología Argentina 21: 146-148, 2015.
34. 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.
35. Sexton M, Jones DB and Maloney ME: Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma: study of a series of 1039 consecutive neoplasms. Journal of the American Academy of Dermatology 23: 1118-1126, 1990.
36. Kimyai-Asadi A, Alam M, Goldberg LH, Peterson SR, Silapunt S and Jih MH: Efficacy of narrow-margin excision of well-demarcated primary facial basal cell carcinomas. Journal of the American Academy of Dermatology 53: 464-468, 2005.
37. Spiller WF and Spiller RF: Treatment of basal cell epithelioma by curettage and electrodesiccation. Journal of the American Academy of Dermatology 11: 808-814, 1984.
38. Bernstein SC, Lim KK, Brodland DG and Heidelberg KA: The many faces of squamous cell carcinoma. Dermatologic surgery 22: 243-254, 1996.
39. Mora RG and Perniciaro C: Cancer of the skin in blacks. I. A review of 163 black patients with cutaneous squamous cell carcinoma. Journal of the American Academy of Dermatology 5: 535-543, 1981.
40. Barlow JO, Zalla MJ, Kyle A, DiCaudo DJ, Lim KK and Yiannias JA: Treatment of basal cell carcinoma with curettage alone. Journal of the American Academy of Dermatology 54: 1039-1045, 2006.
41. Rowe DE, Carroll RJ and Day CL: Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip:

- implications for treatment modality selection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 26: 976-990, 1992.
42. กิตติศักดิ์ธรรมจริยา . Malignant skin tumors ใน :ปริยากุลละวณิชย์, ประวิตรพิศาลบุตร , บรรณิการ. ตำราโรคผิวหนังในเวชปฏิบัติปัจจุบัน *Dermatology* 2010 กรุงเทพฯ: โฮลิสติกพับลิชชิ่ง; 2548. หน้า 538-52.
 43. 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.
 44. Temple CL and Arlette JP: Mohs micrographic surgery in the treatment of lentigo maligna and melanoma. *Journal of surgical oncology* 94: 287-292, 2006.
 45. Clark WH, From L, Bernardino EA and Mihm MC: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research* 29: 705-727, 1969.
 46. Melanoma [Available from: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#section/all>.
 47. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26: 239, 1972.
 48. Lowe SW and Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495, 2000.
 49. Rastogi RP and Sinha RP: Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. 2010.
 50. Blazquez MA, Bermejo A, Zafra-Polo MC and Cortes D: Styryl-lactones from *Goniothalamus* species—A review. *Phytochemical analysis* 10: 161-170, 1999.
 51. Van Cruchten S and Van Den Broeck W: Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia* 31: 214-223, 2002.
 52. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P and Lipton SA: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 7162-7166, 1995.
 53. Fadeel B and Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of internal medicine* 258: 479-517, 2005.
 54. Porth C. *Pathophysiology: Concepts of altered health states*: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

55. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N and Kobayashi Y: Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology* 171: 4672-4679, 2003.
56. Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, Townsend P, Chen-Scarabelli C, Lawrence K, Gottlieb R, Latchman D and Narula J: Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Current problems in cardiology* 31: 181-264, 2006.
57. Leist M and Jäätelä M: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 2: 589-598, 2001.
58. Fan T-J, Han L-H, Cong R-S and Liang J: Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 37: 719-727, 2005.
59. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES: Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 277: 13430-13437, 2002.
60. Wang Z-B, Liu Y-Q and Cui Y-F: Pathways to caspase activation. *Cell biology international* 29: 489-496, 2005.
61. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X and Akey CW: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* 9: 423-432, 2002.
62. Nicholson D: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 6: 1028-1042, 1999.
63. Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ and Dixit VM: The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *Journal of Biological Chemistry* 271: 16443-16446, 1996.
64. Lippke JA, Gu Y, Sarnecki C, Caron PR and Su MS-S: Identification and characterization of CPP32/Mch2 homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP32. *Journal of Biological Chemistry* 271: 1825-1828, 1996.
65. Nguyen M, Millar D, Yong VW, Korsmeyer S and Shore G: Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *Journal of Biological Chemistry* 268: 25265-25268, 1993.
66. Yu S-W, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM and Dawson VL: Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297: 259-263, 2002.

67. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K and Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1. *Endocrine reviews* 22: 153-183, 2001.
68. Wilkinson MG and MILLAR JB: Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *The FASEB Journal* 14: 2147-2157, 2000.
69. Urushihara M and Kinoshita Y. Renin-Angiotensin System Activation and Extracellular Signal-Regulated Kinases in Glomerulonephritis 2011 2011-09-06.
70. Samatar AA and Poulikakos PI: Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature reviews Drug discovery* 13: 928-942, 2014.
71. Nishimoto S and Nishida E: MAPK Signalling: Erk5 versus Erk1/2. *EMBO reports* 7: 782-786, 2006.
72. Dunn KL, Espino PS, Drohic B, He S and Davie JR: The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochemistry and Cell Biology* 83: 1-14, 2005.
73. Weston CR and Davis RJ: The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology* 19: 142-149, 2007.
74. Bode AM and Dong Z: The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis* 46: 591-598, 2007.
75. Hommes D, Peppelenbosch M and Van Deventer S: Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52: 144-151, 2003.
76. Eferl R and Wagner EF: AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 3: 859-868, 2003.
77. Lei K and Davis RJ: JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 2432-2437, 2003.
78. Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace J, Albert J and Ashwell JD: Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle* 4: 1189-1192, 2005.
79. Wagner EF and Nebreda ÁR: Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer* 9: 537-549, 2009.
80. Bradham C and McClay DR: p38 MAPK in development and cancer. *Cell cycle* 5: 824-828, 2006.
81. Koul HK, Pal M and Koul S: Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes & cancer*: 1947601913507951, 2013.

82. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F and Hawkins PT: Dual role of phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277: 567-570, 1997.
83. Nicholson KM and Anderson NG: The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling* 14: 381-395, 2002.
84. Alabsi AM, Ali R, Ali AM, Al-Dubai SAR, Harun H, Kasim NHA and Alsalahi A: Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of goniothalamine in a cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13: 5131-5136, 2012.
85. Kim RPT, Bihud V, Bin Mohamad K, Leong KH, bin Mohamad J, bin Ahmad F, Hazni H, Kasim N, Halim SNA and Awang K: Cytotoxic and Antioxidant Compounds from the Stem Bark of *Goniothalamus tapisoides* Mat Salleh. *Molecules* 18: 128-139, 2012.
86. Inayat-Hussain SH, Osman AB, Din LB, Ali AM, Snowden RT, MacFarlane M and Cain K: Caspases-3 and-7 are activated in goniothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. *FEBS letters* 456: 379-383, 1999.
87. Barcelos RC, Pastre JC, Caixeta V, Vendramini-Costa DB, de Carvalho JE and Pilli RA: Synthesis of methoxylated goniothalamine, aza-goniothalamine and γ -pyrones and their in vitro evaluation against human cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* 20: 3635-3651, 2012.
88. Mosaddik MA and Haque ME: Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniothalamine isolated from *Bryonopsis laciniosa*. *Phytotherapy Research* 17: 1155-1157, 2003.
89. The Botanical Organization MoNRaE. Thailand 2014; Available from: http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2429.
90. Chiu C-C, Liu P-L, Huang K-J, Wang H-M, Chang K-F, Chou C-K, Chang F-R, Chong I-W, Fang K and Chen J-S: Goniothalamine inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 4288-4293, 2011.
91. Petsophonrakul P, Pompon W and Banjerdpongchai R: Apoptosis induction in human leukemic promyelocytic HL-60 and monocytic U937 cell lines by goniothalamine. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14: 2885-2889, 2013.

92. Inayat-Hussain S, Annuar B, Din L, Ali A and Ross D: Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniotalamin in HL-60 leukemia cells. *Toxicology in vitro* 17: 433-439, 2003.
93. Al-Qubaisi M, Rosli R, Subramani T, Omar AR, Yeap SK, Ali AM and Alitheen NB: Goniotalamin selectively induces apoptosis on human hepatoblastoma cells through caspase-3 activation. *Natural product research* 27: 2216-2218, 2013.
94. Pihie A, Stanslas J and Din LB: Non-steroid receptor-mediated antiproliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines. *Anticancer research* 18: 1739-1743, 1997.
95. Lin T and Pihie A: Goniotalamin-induced apoptosis in human ovarian cancer cell line. *Borneo Science* 14: 9-14, 2003.
96. Yen C-Y, Chiu C-C, Haung R-W, Yeh C-C, Huang K-J, Chang K-F, Hseu Y-C, Chang F-R, Chang H-W and Wu Y-C: Antiproliferative effects of goniotalamin on Ca9-22 oral cancer cells through apoptosis, DNA damage and ROS induction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 747: 253-258, 2012.
97. Vendramini-Costa DB, Alcaide A, Pelizzaro-Rocha KJ, Talero E, Ávila-Román J, Garcia-Mauriño S, Pilli RA, de Carvalho JE and Motilva V: Goniotalamin prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line. *Toxicology and applied pharmacology* 300: 1-12, 2016.
98. Sophonnithiprasert T, Nilwarangkoon S, Nakamura Y and Watanapokasin R: Goniotalamin enhances TRAIL-induced apoptosis in colorectal cancer cells through DR5 upregulation and cFLIP downregulation. *International journal of oncology* 47: 2188-2196, 2015.
99. Chen W-Y, Wu C-C, Lan Y-H, Chang F-R, Teng C-M and Wu Y-C: Goniotalamin induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. *European journal of pharmacology* 522: 20-29, 2005.
100. Innajak S, Mahabusrakum W and Watanapokasin R: Goniotalamin induces apoptosis associated with autophagy activation through MAPK signaling in SK-BR-3 cells. *Oncology reports* 35: 2851-2858, 2016.

101. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65: 55-63, 1983.
102. Portugal J and Waring MJ: Assignment of DNA binding sites for 4', 6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 949: 158-168, 1988.
103. Verhoven B, Schlegel R and Williamson P: Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 182: 1597-1601, 1995.
104. Alabsi AM, Ali R, Ali AM, Al-Dubai SAR, Harun H, Abu Kasim NH and Alsalahi A: Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of gonothalamin in a cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13: 5131-5136, 2012.

ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	ศุภกร ตั้งจิรคณัณฑ์
วัน เดือน ปี เกิด	28 มิถุนายน 2533
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	161 หมู่ 7 ต.บ่อพลับ อ.เมือง จ.นครปฐม
สถานที่ทำงานในปัจจุบัน	ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2550	มัธยมศึกษาตอนต้นและปลาย จากโรงเรียนอัสสัมชัญ ศรีราชา
พ.ศ. 2556	ปริญญาแพทยศาสตร จากคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2560	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ