บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. ในการคัดเลือกเซลล์มะเร็งที่จะนำมาใช้ในการทดลองนั้น ต้องเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE อยู่บนผิวเซลล์ โดยได้ทำการคัดเลือกเซลล์มะเร็ง จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 6 ชนิดด้วยกัน อันได้แก่ SW480, HeLa, HT-29, HepG2, HEp2 และ HaCaT ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าเซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa นั้น มีการแสดงออกของยีน RAGE สูงที่สุดตามลำดับ

2. ในการสกัดสารสกัดอย่างหยาบจากแอปเปิ้ลนั้น จะแบ่งการสกัดออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน คือส่วนของเปลือกและส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล โดยมีวิธีการสกัดเพื่อทำการเปรียบเทียบทั้งหมด 3 วิธี ซึ่งสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้งหมด 3 วิธี ประกอบด้วยสารสกัดเปลือกและเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1, สารสกัดเปลือกและเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 2 และสารสกัดเปลือกและเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 รวมทั้งสิ้นทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

3. จากการวัดค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมในกลุ่มของสารสกัดที่มาจากเนื้อแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธี พบว่า สารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 มีค่าโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุด (19,661.65 ppm GAE) เมื่อเทียบกับบรรดาสารสกัดที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธีการสกัด โดยสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 (11,390.98 ppm GAE) และ 2 (9,436.09 ppm GAE) จะมีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมน้อยลงมาตามลำดับ

4. นอกจากนี้ จากการวัดค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมในกลุ่มของสารสกัดที่มาจากเปลือกแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธีนั้น พบว่าสารสกัดจากเปลือกที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 (44,962.41 ppm GAE) จะมีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุด เมื่อเทียบกับบรรดาสารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธีการสกัด แต่ทั้งนี้ค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่ได้จากสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีที่ 3 (43,721.80 ppm GAE) ก็มีความใกล้เคียงกับสารสกัดที่ได้

จากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีที่ 1 เช่นกัน โดยสารสกัดจากเปลือกที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 2 นั้นให้ค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่น้อยที่สุด (18,609.02 ppm GAE)

5. เนื่องจากเหตุผลในข้อ 2 และข้อ 3 ผู้ทำการวิจัยจึงเลือกสารสกัดที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ลในวิธีที่ 1, สารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลในวิธีที่ 1 และ 3 มาทำเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นตั้งต้นโดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ซึ่งมีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 0.25, 0.5 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อนำมาใช้ทดลองกับเซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa ในขั้นตอนต่อไป

6. เมื่อนำสารสกัดอย่างหยาบจากเนื้อแอปเปิ้ลที่ทำการสกัดด้วยวิธีที่ 1 มาทำการบ่มกับเซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa พบว่าสารสกัดที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีที่ 1 นั้น แม้จะมีค่าโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุดในบรรดาสารสกัดที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ล แต่กลับไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ SW480 และ HeLa ดังนั้นความเข้มข้นของโพลีฟีนอลโดยรวมในระดับนี้ ไม่สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดได้

7. ส่วนสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลอย่างหยาบที่ได้จากวิธีที่ 1 แม้จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นแบบ Dose-dependent ก็ตามที แต่เนื่องจากเมื่อบ่มสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีที่ 1 กับเซลล์มะเร็งนั้น จะก่อให้เกิดตะกอนขึ้น ซึ่งอาจรบกวนการทดลองในขั้นตอนต่อไปได้

8. ในส่วนของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 แม้จะให้ค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่น้อยกว่าสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 ก็ตามที แต่ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นแบบ Dose-dependent เช่นเดียวกับสารสกัดอย่างหยาบจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 นั่นเอง นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดการตกตะกอนของสารสกัดแต่อย่างใด ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงเลือกสารสกัดอย่างหยาบจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 เป็นสารตัวอย่างที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อๆไป

9. เมื่อได้สารตัวอย่างที่ต้องการแล้ว ซึ่งในที่นี้คือ สารสกัดอย่างหยาบจากเปลือกแอปเปิ้ล ด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 โดยนำสารตัวอย่างนี้มาทำการทดลองเรื่องการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW 480 และ HeLa อีกครั้ง เพื่อทำการหาค่า IC_{50} พบว่า ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่ได้จากการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลนั้น จะอยู่ที่ความเข้มข้นที่มีค่าเท่ากับ 5,019.48 ± 112.88 µg/ml (mean ± SD) และ พบว่า ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ได้จากการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลนั้น จะอยู่ที่ความเข้มข้น ที่มีค่าเท่ากับ 4,933.66 ± 51.21 µg/ml (mean ± SD)

10. จากนั้นเมื่อได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa ซึ่งค่า IC_{50} ที่ได้นี้ จะถูกนำมาใช้ในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งต่อไป แต่ก่อนหน้าที่จะทำการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 นั้น ผู้ทำการวิจัยได้ทำการคัดเลือกเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมอีกรอบหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เริ่มมีผลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่ไม่ส่งผลใดเลยต่อเซลล์มะเร็ง และ ได้ทำการหา condition ที่เหมาะสมในการรุกรานของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เนื่องมาจากเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด ก็จะมีความสามารถในการรุกรานที่ต่างกันออกไปนั่นเอง พบว่า condition ที่เหมาะสมในการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa คือ Matrigel ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และใช้เวลาในการรุกรานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ในขณะที่เซลล์มะเร็ง SW480 ต้องใช้ Matrigel ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และใช้เวลาในการรุกรานเป็นเวลาถึง 72 ชั่วโมง

11. เมื่อได้ทั้งความเข้มข้นของสารสกัด และ condition ที่เหมาะสมในการทดลองเรื่องของการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดแล้ว พบว่าในเรื่องผลของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่มีต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั้น ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็ง SW480 จะอยู่ที่ความเข้มข้น 911.40 ± 73.53 µg/ml (mean ± SD) ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 750 และ 1,000 µg/ml ส่วนค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็ง HeLa จะอยู่ที่ความเข้มข้น 126.19 ± 11.91 µg/ml (mean ± SD) ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 100 และ 200 µg/ml

12. เมื่อได้ช่วงความเข้มข้นของค่า IC_{50} ในเรื่องการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง Hela แล้ว จึงนำช่วงค่าของความเข้มข้นที่ได้ มาทำการทดลองเรื่องผลของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ด้วยวิธี RT-PCR โดยในเซลล์มะเร็ง SW480 นั้น ณ ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลทั้ง 2 ความเข้มข้น อันได้แก่ 750 และ 1,000 μg/ml นั้น พบว่ามีแนวโน้มการลดลงของการแสดงของยีน RAGE เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนในเซลล์มะเร็ง HeLa นั้น ณ ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลทั้ง 2 ความเข้มข้น อันได้แก่ 100 และ 200 μg/ml ไม่พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญใดๆ ในเรื่องการแสดงออกของยีน RAGE เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสิ้น

อภิปรายผล

ในเรื่องของการสกัดสารจากแอปเปิ้ลทั้งในส่วนของเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ลนั้น จะเห็นได้ว่า ไม่ว่าจะใช้วิธีการสกัดแบบไหนก็ตามที ต่างก็มีแนวโน้มของค่าโพลีฟีนอลโดยรวมไปในทิศทางเดียวกัน นั่นก็คือค่าโพลีฟีนอลโดยรวมที่พบในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ล จะมีค่าโพลีฟีนอลโดยรวมที่สูงกว่าค่าโพลีฟีนอลโดยรวมที่พบในเนื้อแอปเปิ้ลเสมอ ซึ่งตรงกับการศึกษาเรื่องของสารโพลีฟีนอลในแอปเปิ้ลที่ว่า ในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ลนั้น จะเป็นส่วนที่มีสารโพลีฟีนอลในอัตราส่วนที่สูงกว่าที่พบในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล (Escarpa and Gonzalez, 1998) ดังจะเห็นได้จากการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึง เปลือกแอปเปิ้ลนั้นจะมีสารประกอบจำพวก phenolics มากกว่าในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล 2-6 เท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดของแอปเปิ้ล และยังมีสารจำพวก flavonoids มากกว่า 2-3 เท่าอีกด้วย นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบกันในส่วนของด้านการออกฤทธิ์ antioxidant แล้ว จะพบว่าเปลือกแอปเปิ้ลนั้นมีค่าที่สูงกว่าเนื้อแอปเปิ้ล 2-6 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของแอปเปิ้ลเช่นกัน (Wolfe et al., 2003)

เมื่อทดลองนำสารสกัดที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 ซึ่งถือว่าเป็นสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลที่มีค่าโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุดในบรรดาสารสกัดที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ลทั้งหมด 3 วิธี พบว่าสารตัวอย่างที่ได้จากเนื้อแอปเปิ้ลนี้ ไม่สามารถส่งผลใดๆเลยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่ว่า ความเข้มข้นของโพลีฟีนอลโดยรวมในระดับนี้ไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ ดังจะเห็นได้จากการทดลองหนึ่งที่ได้แสดงให้เห็นว่า quercetin ซึ่ง

ถือว่าเป็นสารโพลีฟีนอลที่สำคัญและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในเรื่องของแอปเปิ้ลนั้น พบว่า ปริมาณของ quercetin ในระดับต่ำ จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ โดยในทางกลับกัน ปริมาณของ quercetin ในระดับต่ำนี้จะกลับกลายไปเป็นการกระตุ้นให้เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งอีกด้วย โดยพบการเพิ่มขึ้น 20% ในเซลล์มะเร็งตับ และมีการเพิ่มขึ้น 100% ในเซลล์มะเร็งทรวงอก (Van der Woude et al., 2003) ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงคัดสารตัวอย่างที่สกัดได้จากเนื้อแอปเปิ้ลทั้งหมดรวมทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง ออกไปจากสารตัวอย่างที่สนใจจะนำมาทดสอบนั่นเอง

เมื่อพิจารณาถึงบรรดาสารที่สกัดได้จากเปลือกแอปเปิ้ลนั้น แม้ว่าสารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 จะมีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุดก็ตามที แต่เมื่อนำสารสกัดตัวอย่างที่ได้นี้ไปทำการบ่มกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa พบว่า ผลของสารตัวอย่างที่มีต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 นั้น แม้จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มการลดลงเป็นแบบ dose-dependent ก็ตามที แต่เมื่อนำ 96 -well plate ที่ใช้ในการทดลองไปส่องด้วยกล้อง light microscope จะเห็นถึงการตกตะกอนของสารสกัดอยู่ที่ก้น plate โดยสัดส่วนของปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นนั้น จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งที่เพิ่มขึ้นด้วย แต่ในส่วนของสารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 นั้น พบว่าแม้จะมีค่าของสารโพลีฟีนอลโดยรวมน้อยกว่าที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 ก็ตามที แต่ก็มีค่าที่ใกล้เคียงกัน เมื่อนำสารสกัดตัวอย่างที่ว่า ไปทำการบ่มกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa พบว่า ผลของสารตัวอย่างนี้ที่มีต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้แบบ dose-dependent อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แม้ความเข้มข้นที่ใช้จะอยู่ในช่วงที่สูงกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ก็ตามที

ดังนั้นถ้าจะให้พิจารณาถึงความเหมาะสมระหว่างสารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดนี้แล้ว จะเห็นได้ว่า สารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 แม้จะมีฤทธิ์ในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด มากกว่าสารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลที่ได้จากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ก็ตามที แต่ตะกอนที่เกิดขึ้นนั้น อาจส่งผลกระทบต่อการทดลองในขั้นต่อๆไป โดยเฉพาะในการทดลองเรื่องผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่มีต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้เนื่องมาจากในขั้นตอนของการอ่านผลการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั้น จะต้องทำ

การนับจำนวนเซลล์มะเร็งที่เกิดการรุกรานทั้งหมด ด้วยกล้อง light microscope ซึ่งตะกอนที่เกิดขึ้นนี้ อาจรบกวนการอ่านผลได้นั่นเอง ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 นั้นน่าจะเป็นสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการทดลองนี้

จะเห็นได้ว่าจากการทดลองเรื่องการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้สนับสนุนการศึกษาในอดีตที่ว่า แอปเปิ้ลที่ปราศจากเปลือกจะมีฤทธิ์ในด้านของการเป็นสาร antioxidant น้อยกว่าแอปเปิ้ลที่มีเปลือก นอกจากนี้แอปเปิ้ลที่มีเปลือกนั้นจะมีความสามารถในยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับแอปเปิ้ลที่ปราศจากเปลือก (Eberhardt et al., 2000) ดังนั้นเปลือกแอปเปิ้ลจึงน่าจะมีฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าเนื้อของแอปเปิ้ลนั่นเอง

เมื่อได้ช่วงของความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งก็คือค่า IC_{50} ที่แสดงถึงความสามารถของสารสกัดที่นำมาทดสอบ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa ลงครึ่งหนึ่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของทั้ง 2 ชนิดแล้ว โดยความเข้มข้นที่ได้นี้จะถูกนำมาใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งก็คือ การทดลองในเรื่องของการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั่นเอง โดยความเข้มข้นที่จะนำมาใช้นี้ จะต้องมีค่าที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} เพราถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า IC_{50} แล้ว อาจส่งผลกระทบต่อจำนวนเซลล์ที่เกิดการรุกรานได้ อันเนื่องมาจากอัตราการตายของเซลล์มะเร็งที่สูงขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดที่นำมาใช้ในการทดลองนั่นเอง ทั้งนี้ความเข้มข้นในระดับที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} นั้น ยังถือเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์มะเร็งที่นำมาใช้ในการทดสอบมากเท่าไรนั่นเอง

โดยก่อนที่จะทำการทดสอบเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa นั้น ผู้ทำการวิจัยได้ทำการบ่มสารสกัดแอปเปิ้ลกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดอีกครั้งหนึ่ง ณ ความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ซึ่งความเข้มข้นที่เลือกนำมาใช้ในครั้งนี้ ล้วนเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} ทั้งสิ้น และทำการนับจำนวนเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอีกครั้งหนึ่ง เป็นการยืนยันว่าความเข้มข้นที่จะนำมาทำการทดสอบในขั้นต่อไปนั้น เป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อจำนวนเซลล์มะเร็งอย่างแท้จริง และเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์มะเร็งนั่นเอง โดยจากการนับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดพบว่า แม้ความเข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้ จะเป็นความเข้มข้นที่ต่ำ

กว่าค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดลองในเรื่องของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งก็ตามที แต่กลับพบว่า ณ ความเข้มข้นที่สูงขึ้นนั้น เซลล์มะเร็งที่นำมาใช้ในการทดสอบ แม้จะยังเป็นเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ แต่เมื่อนำเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ไปส่องดูด้วยกล้อง light microscope จะเห็นถึงการเปลี่ยนแปลงไปของรูปร่างเซลล์ ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงนี้ ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างเมื่อนำไปเทียบกับเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุม ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงคัดเลือกความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์มะเร็งที่จะนำมาทดสอบเรื่องการรุกรานนั้น มีความแข็งแรง และมีความสมบูรณ์พร้อม เพื่อเป็นการยืนยันว่าอัตราการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่ลดลงนั้น ไม่ได้เกิดจากจำนวนเซลล์มะเร็งที่ลดลงแต่อย่างใด

เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa แล้ว จึงนำค่าความเข้มข้นที่ได้ ไปทำการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งลงได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุม หรือที่เรียกว่าค่า IC_{50} เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปในเรื่องของผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ล ที่มีต่อความสัมพันธ์กับการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งว่ามีความเกี่ยวข้องกับ RAGE หรือไม่ โดยในขั้นตอนนี้จะพิจารณาในระดับการแสดงออกของยีน RAGE ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 นั้น มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แม้จะไม่ได้เป็นการลดลงแบบ dose-dependent ก็ตามที แต่ในทางกลับกัน กลับไม่พบการลดลงในเรื่องการแสดงออกของยีน RAGE อย่างมีนัยสำคัญใดเลยในเซลล์มะเร็ง HeLa

ในความเป็นจริงแล้ว มีปัจจัยมากมายที่เกี่ยวข้องกับการรุกรานของเซลล์มะเร็ง แต่ NF-κB นี่เองที่พบว่ามีการเกี่ยวข้องกับยีน RAGE โดยนอกจาก RAGE จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NF-κB ดังจะเห็นได้จากภาพที่ 7 แล้ว มีการพบว่าในส่วน promoter ของยีน RAGE นั้น ยังมี binding site ของ NF-κB อยู่ถึง 2 แห่งอีกด้วย ดังนั้น นอกจาก RAGE จะเป็นตัวการในการเพิ่มจำนวน NF-κB แล้ว NF-κB ยังเป็นตัวเพิ่มจำนวนของ RAGE อีกทางหนึ่งด้วยเช่นกัน (Rojasa and Morales, 2004) ซึ่งในปัจจุบัน RAGE ยังเป็นที่รู้กันว่า มีความสามารถในเรื่องของการเพิ่มการแสดงออกของตัวมันเอง โดยผ่านทางกระบวนการที่ขึ้นอยู่กับ NF-κB อีกด้วย (Li and Schmidt, 1997) ทั้งนี้จากในหลายๆการศึกษา ยังได้ยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน RAGE กับ MMP ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการเกิดการรุกรานของ

เซลล์มะเร็ง (Takada et al., 2004; Cipollone et al., 2003) หรือจะเป็นในเรื่องของการค้นพบที่ว่ายิ่งเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ RAGE ที่สูงขึ้นเท่าไหร่ เซลล์มะเร็งนั้นยิ่งมีความสามารถในการรุกรานสูงมากขึ้นตามไปด้วย (Hirata et al., 2003; Kuniyasu et al., 2003) ซึ่งจากผลการศึกษานี้เอง ที่ได้ทำการสนับสนุนแนวคิดในเรื่องของแนวทางการรักษามะเร็งที่ว่า RAGE จะกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสาร quercetin ที่เป็นสารโพลีฟีนอลที่สำคัญตัวหนึ่งที่พบในแอปเปิ้ลนั้น สามารถส่งผลให้เกิดการลดลงของ NF-κB ได้ ซึ่ง NF-κB นั้น มีการรายงานว่าเป็นหนึ่งในตัวการที่ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนมากกว่า 200 ยีน ซึ่งล้วนแต่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการลดการเกิด apoptosis, การเหนี่ยวนำให้เกิด cellular transformation, invasion, metastasis, chemo-resistance, radio-resistance และการเกิดการอักเสบ ซึ่งในหลายๆยีนเป้าหมายเลยทีเดียว ถ้าถูกกระตุ้นจะก่อให้เกิดการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งที่มีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ซึ่งก็รวมไปถึงการแสดงออกของ cyclin D1, apoptosis suppressor proteins อันได้แก่ Bcl-2 และ Bcl-XL ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด metastasis และ angiogenesis เช่น MMP เป็นต้น (Aggarwal and Shishodia, 2006) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า NF-κB นั้น มีความสัมพันธ์ในเรื่องของการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งเช่นกัน

เมื่อทำการพิจารณาถึง ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 กับอัตราการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งแล้ว พบว่าสารสกัดจากแอปเปิ้ลนั้น น่าจะมีแนวโน้มที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน RAGE โดยคาดว่าการแสดงออกของยีน RAGE ที่ลดลงนี้ น่าจะเกิดจากการที่สารเคมีบางอย่างในแอปเปิ้ล อันได้แก่ quercetin ไปส่งผลให้เกิดการลดจำนวนลงของ NF-κB (Aggarwal and Shishodia, 2006) เนื่องจากมีการศึกษาที่ได้รายงานว่า NF-κB เป็นตัวการหนึ่ง ที่สามารถเพิ่มจำนวนของ RAGE ได้ (Rojasa and Morales, 2004) ดังนั้น ถ้ามีการยับยั้งโดยทำให้เกิดการลดจำนวนลงของ NF-κB ได้ การแสดงออกของ RAGE ก็น่าจะลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้ยังอาจมีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการที่แอปเปิ้ล เป็นผลไม้ที่ขึ้นชื่อในเรื่องของการเป็นแหล่ง antioxidant ที่ดีอีกด้วย (Boyer and Liu, 2004) ด้วยเหตุผลที่ว่า NF-κB นั้นถือเป็น oxidant-sensitive transcription factor (Yan et al., 1994) ตัวหนึ่งนั่นเอง

สำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa นั้น แม้สารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลจะสามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการทดสอบในเรื่องของการแสดงออกของยีน

RAGE นั้น ไม่พบว่ามีการแสดงออกของยีน RAGE ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในความเข้มข้นใดเลย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็ง HeLa ในกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า อัตราการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ลดลงนั้น น่าจะไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ RAGE แต่อย่างใด แม้จะไม่ได้ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน RAGE โดยตรงแต่อัตราการเกิดการรุกรานที่ลดลงนั้น สารสกัดอาจจะไปส่งผลกระทบต่อปัจจัยอื่นในการรุกรานของเซลล์มะเร็งก็เป็นได้ ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการศึกษา quercetin น่าจะเป็นสารในกลุ่มของ flavonoids ตัวหนึ่งที่มีความสามารถในการต้านมะเร็งและยับยั้งการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยมีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการหลั่งเอนไซม์ MMP (Huang et al., 1999) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

ข้อเสนอแนะ

- แม้ในการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่มีต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจาก RAGE แล้ว แต่เป็นเพียงการศึกษาในระดับของ mRNA (Transcription level) เพียงเท่านั้น ดังนั้นจึงน่าจะมีการยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีน RAGE (Translation level) ด้วยวิธี Western Blot ในอีกทางหนึ่ง

- นอกจากนี้ยังมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาในเรื่องของ NF-κB และ MMPs ต่อไป เพราะทั้ง 2 ปัจจัยนี้ ล้วนมีความสัมพันธ์ทั้งในเรื่องของสารสกัดจากแอปเปิ้ลและการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ว่ามีแนวโน้มที่ลดลงจริงในเซลล์มะเร็ง SW480 หรือไม่ และในส่วนของเซลล์มะเร็ง HeLa นั้น แม้จะไม่ได้มีการลดลงของยีน RAGE อย่างมีนัยสำคัญ แต่การศึกษาในเรื่องของทั้ง 2 ปัจจัยนี้ จะทำให้สามารถเข้าใจจึงกลไกของสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่มีต่อการรุกรานที่ลดลงในเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ดียิ่งขึ้นกว่าเดิม ซึ่งในที่นี้รวมไปถึงเซลล์มะเร็ง SW480 อีกด้วย

- เนื่องจากการทดลองนี้ได้ทำการทดลองฤทธิ์ของสารสกัดจากแอปเปิ้ล ที่ส่งผลต่อเซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa ทั้งในเรื่องของการวัดการเจริญเติบโต การรุกราน และการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด โดยในขั้นตอนการทดลองนั้นจะเป็นไปตามแต่ละลำดับขั้นดังที่กล่าวมาข้างต้น ส่งผลให้การทดลองทั้ง 3 เรื่องนี้ล้วนแต่ถูกจัดขึ้นในแต่ละสภาวะการทดลอง ทั้งนี้มาจากเหตุสุดวิสัย อันเนื่องมาจาก

ในแต่ละการทดลองจำเป็นที่จะต้องทำไปตามลำดับขั้นตอน เพื่อนำผลที่ได้มาใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อๆไป ดังนั้น เพื่อเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของผลจากสารสกัดแอปเปิ้ลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การรุกรานของเซลล์มะเร็ง และการวัดการแสดงออกของเซลล์มะเร็ง ว่าเกี่ยวข้องกับ RAGE จริงหรือไม่ จึงควรที่จะทำการทดลองทั้ง 3 ขั้นตอนนี้อีกครั้งภายใต้สภาวะเดียวกันทั้งหมด ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของเซลล์มะเร็งที่นำมาใช้ในการทดลอง หรือสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันถึงความสัมพันธ์เหล่านี้ของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด กับการแสดงออกของ RAGE นั่นเอง

- ส่วนในเรื่องของการวัดเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW 480 และเซลล์มะเร็ง HeLa ด้วยวิธี MTS assay นั้น ค่า OD ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งตัวจริง หรืออาจเกิดจากการตายของเซลล์มะเร็งที่เพิ่มขึ้นก็เป็นได้ ดังนั้นจึงควรมีการทวนสอบซ้ำอีกครั้งในเรื่องฤทธิ์ของสารสกัดจากแอปเปิ้ล ว่ามีผลต่อ % viability ของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดนั้นเป็นอย่างไร ซึ่งอาจจะใช้วิธี Flow cytometry หรือ Comet assay ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้สามารถใช้ดูอัตราการตายของเซลล์มะเร็งได้ หรือแม้กระทั่งวิธีพื้นฐานอย่าง Trypan blue ก็สามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน