

ผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ RAGE

นางสาว สาลิตา เอี่ยมบุญเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF APPLE EXTRACT ON RAGE-ASSOCIATED CANCER CELL INVASION

Miss Salita Eiamboonsert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492192

หัวข้อวิทยานิพนธ์                      ผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ  
RAGE  
โดย    นางสาว สาลิตา เอี่ยมบุญเสวีรัฐ  
สาขาวิชา                                    ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์  
อาจารย์ที่ปรึกษา                          รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม                    ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

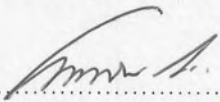


..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... นันทิ ใจงามภักดิ์ ..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิ ชาญชนะวงศาโรจน์)

..... รัชนา ศานติยานนท์ ..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....  ..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... รัชนีพร ดิยะวิสุทธิศรี ..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ดิยะวิสุทธิศรี)

สาลิตา เอี่ยมบุญเสริฐ : ผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ RAGE. (THE EFFECT OF APPLE EXTRACT ON RAGE-ASSOCIATED CANCER CELL INVASION) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ, 165 หน้า.

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษา ผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproducts) เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากเปลือกแอปเปิ้ล ไปบ่มกับเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa เพื่อดูผลของสารสกัดแอปเปิ้ลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTS พบว่าค่า IC<sub>50</sub> ของเซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa อยู่ที่ความเข้มข้น 5,019.48 ± 112.88 µg/ml และ 4,933.66 ± 51.21 µg/ml (mean ± SD) ตามลำดับ ซึ่งได้ใช้ค่าความเข้มข้นที่ได้ เป็นแนวทางในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งต่อไป ด้วยวิธี Matrigel invasion assay พบว่าทั้งเซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa มีค่า IC<sub>50</sub> ในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 911.40 ± 73.53 µg/ml และ 126.19 ± 11.91 µg/ml (mean ± SD) ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดจากแอปเปิ้ลในช่วงของความเข้มข้นที่ได้ไปทำการบ่มกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เพื่อศึกษาผลของสารสกัดแอปเปิ้ลต่อการแสดงออกของยีน RAGE พบว่าในเซลล์มะเร็ง SW480 มีการแสดงออกของยีน RAGE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) แม้จะไม่ได้เป็นการลดลงแบบ dose-dependent ก็ตาม แต่ในทางกลับกัน ไม่พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa

ภาควิชา.....เคมีคลินิก..... ลายมือชื่อนิติศ..... สาลิตา เอี่ยมบุญเสริฐ  
สาขาวิชา...ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์  
ปีการศึกษา 2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4877212337 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDECINE

KEY WORD: APPLE / INVASION / RAGE / CANCER CELL

SALITA EIAMBOONSERT : THE EFFECT OF APPLE EXTRACT ON RAGE-ASSOCIATED CANCER CELL INVASION. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. RACHANA SANTIYANONT, PhD., THESIS COADVISOR : ASST.PROF. TEWIN TENCOMNAO, PhD., 165 pp.

The aim of this study is to determine the effect of apple extract on RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproducts)-associated cancer cell invasion on SW480 and HeLa cell lines. Apple extract was incubated with both cancer cell lines at various concentrations for proliferation assay. The percentages of cell viability were evaluated by MTS method. The IC<sub>50</sub> of SW480 and HeLa with apple extract were 5,019.48 ± 112.88 µg/ml and 4,933.66 ± 51.21 µg/ml (mean ± SD) respectively. After proliferation assay, the concentrations of IC<sub>50</sub> were used as a guide to select the appropriate concentrations for Matrigel invasion assay, IC<sub>50</sub> of invasion assay for SW480 and HeLa were 911.40 ± 73.53 µg/ml and 126.19 ± 11.91 µg/ml (mean ± SD) respectively. RAGE expression with apple extract was determined by RT-PCR. It was found that RAGE expression of SW480 was reduced significantly (p < 0.05) although not in a dose-dependent manner. On the contrary, RAGE expression of HeLa with apple extract was still the same the control group.

Department.....	Clinical Chemistry.....	Student's signature.....	SALITA EIAMBOONSERT
Field of study.....	Clinical Biochemistry and.....	Advisor's signature.....	R. Santiyant
	.....Molecular Medicine.....		
Academic year	2006	Co-advisor's signature.....	Tewin Tencomnao

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทั้งนี้เนื่องด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของศิษย์ แม้ว่าอาจารย์จะมีภาระต่างๆมากมาย แต่ในเวลาที่เกิดปัญหา อาจารย์พร้อมที่จะรับฟัง และพร้อมที่จะช่วยเหลืออยู่เสมอ ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการให้แง่คิด คำแนะนำในเรื่องต่างๆ ทั้งในเรื่องของการทำงาน หรือ การดำเนินชีวิตก็ตามที่ ศิษย์ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ที่กรุณารับเป็น อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมของศิษย์ และให้ความกรุณาในหลายๆเรื่อง ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของความขาดเหลืออันใดก็ตามที่ หรือในด้านการให้คำปรึกษาที่ดีเสมอ ศิษย์ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และ ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธ์ศรี ที่กรุณารับเป็นกรรมการ ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ศิษย์ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ ดร.กวิญ ลีละวัฒน์ และ คุณศิริลักษณ์ นารอง จากโรงพยาบาลราชวิถี ที่ได้ให้ความกรุณา และความหวังดีในเรื่องของคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ในเรื่องของการทดลองการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ศิษย์ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ บุคคลากรทุกท่าน ในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวก ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของอุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการวิจัย หรือแม้กระทั่งคำแนะนำที่ล้วนแต่มีประโยชน์ทั้งสิ้น จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกทั้งหมดในครอบครัว ที่คอยให้ความช่วยเหลือ อีกทั้งกำลังใจ และความเข้าใจที่มอบให้ตลอดการทำการวิจัยที่ผ่านมา ลูกขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และ น้อง ๆ ที่เป็นส่วนสำคัญของกำลังใจ คอยให้ความช่วยเหลือ และผลักดันจนสามารถมาถึงจุดนี้ได้ ขอขอบคุณที่ทำให้เข้าใจถึงความหวังดี และความรักของทุกคนที่มีให้เสมอ จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฎ
รายการคำย่อ.....	ด
บทที่	
1    บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
2    เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
แอปเปิ้ล.....	8
RAGE.....	19
ทฤษฎีและหลักการที่ใช้ในการวิจัย.....	26
เป้าหมายทางโมเลกุล (Molecular target) ที่นำมาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคมะเร็ง.....	31

3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	41
	แอปเปิ้ลที่ใช้ในการทดลอง.....	45
	การสกัดสารโพลีฟีนอลจากแอปเปิ้ล.....	46
	การกำจัดตัวทำละลายออกจากสารสกัดแอปเปิ้ล.....	48
	การวัดค่าโพลีฟีนอล.....	48
	การเตรียมสารสกัดให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นตั้งต้น.....	49
	การกรอง sterile.....	49
	เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	50
	การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง.....	51
	การคัดเลือกเซลล์มะเร็ง.....	55
	การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง.....	58
	การทดสอบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง.....	62
	การวัดการแสดงออกของเซลล์มะเร็ง.....	72
	การวิเคราะห์ข้อมูล.....	80
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	81
	การวัดค่าโพลีฟีนอลโดยรวม.....	81
	การคัดเลือกเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE.....	84
	การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง.....	86
	การทดสอบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง.....	102
5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	124
	สรุปผลการวิจัย.....	124
	อภิปรายผล.....	127
	ข้อเสนอแนะ.....	132
	รายการอ้างอิง.....	134
	ภาคผนวก.....	159
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	165



## สารบัญตาราง

### หน้า

1.	ลำดับเบสและขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก primer แต่ละตัวในขั้นตอนของภาคตัดเลือกเซลล์มะเร็ง.....	57
2	แสดงอุณหภูมิ, ระยะเวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการทำ RT-PCR.....	57
3	ตารางแสดง PCR condition.....	78
4	ลำดับเบสและขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก primer แต่ละตัวในขั้นตอนของกระบวนการ RT-PCR.....	78
5	ตารางแสดงความแตกต่างระหว่างแต่ละวิธีการสกัด.....	81
6	ตารางแสดงค่าโพสิทีฟคอนโทรลโดยรวมในแต่ละสารตัวอย่าง.....	83
7	ตารางแสดงค่าไควความเข้มข้นตั้งต้นในแต่ละสารตัวอย่าง.....	84
8	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเนื้อเยื่อเปิดด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1.....	88
9	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกเยื่อเปิดด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1.....	90
10	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกเยื่อเปิดด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3.....	91

11	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3.....	94
12	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1.....	96
13	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1.....	98
14	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง heLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3.....	99
15	แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3.....	101
16	แสดงค่า % invasion ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3.....	106
17	แสดงค่า % invasion ในรูปของค่า mean $\pm$ SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3.....	112
18	แสดงค่าสัดส่วน Optical Density จากแถบผลผลิต PCR ในยีน RAGE ต่อยีน $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็ง SW480 ในรูปของค่า mean $\pm$ SD เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม AlphaImager 2000.....	120

- 19 แสดงค่าสัดส่วน Optical Density จากแถบผลผลิต PCR ในยีน RAGE ต่อยีน  $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็ง HeLa ในรูปของค่า mean  $\pm$  SD เมื่อทำการปรบกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphamager 2000.....123

## สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนผังลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
2 ตัวอย่างโครงสร้างของสารเคมีในแอปเปิ้ลที่มีฤทธิ์ในด้านการเป็นสาร antioxidant .....	10
3 กราฟแสดง antioxidant activity ที่ได้จากผลไม้ประเภทต่างๆ.....	11
4 กราฟแสดงค่าของสารประกอบ phenolic ในแต่ละสายพันธุ์ของแอปเปิ้ล.....	13
5 กราฟแสดงค่าของสารประกอบ flavonoid ในแต่ละสายพันธุ์ของแอปเปิ้ล.....	14
6 ภาพแสดงส่วนต่างๆของ RAGE อันได้แก่ extracellular, transmembrane และ Intracellular domain.....	19
7 ภาพแสดงการจับกันระหว่าง AGE กับ RAGE บน macrophage ก่อให้เกิด oxidative stress และการกระตุ้นการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์.....	23
8 ภาพแสดงโครงสร้างของกรดแกลลิก.....	28
9 โครงสร้างของ MTS tetrazolium และ formazan product.....	29
10 molecular target ของ dietary agent.....	31
11 แอปเปิ้ลพันธุ์ Red Delicious ที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	45
12 ภาพ hemocytometer counting chamber.....	53

ภาพประกอบ	หน้า
13 ตัวอย่างแผนผังการบ่มเซลล์ในแต่ละชุดความเข้มข้น.....	61
14 ชุด invasion assay ของบริษัท Beckton-Dickinson.....	69
15 แสดงการขีดเซลล์ที่ด้านในของ insert.....	70
16 แสดงสไลด์ที่พร้อมนับจำนวนเซลล์ที่สามารถรุกราน.....	71
17 การแยกชั้นของสารละลายเมื่อทำการสกัด RNA ด้วยน้ำยา TRIZOL®.....	73
18 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก.....	82
19 การแสดงออกของยีน RAGE และ ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง.....	85
20 กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 2,500 $\mu\text{g/ml}$ .....	87
21 กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 5,000 $\mu\text{g/ml}$ .....	89
22 กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$ .....	91

## ภาพประกอบ

## หน้า

23	ตะกอนที่เกิดจากการบ่มสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 กับเซลล์มะเร็ง.....	92
24	กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 เมื่อทำการเจาะความเข้มข้นเพื่อหาค่า $IC_{50}$ ณ ความเข้มข้นที่ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$ .....	93
25	กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจาก ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 2,500 $\mu\text{g/ml}$ .....	95
26	กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 5,000 $\mu\text{g/ml}$ .....	97
27	กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$ .....	99
28	กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 เมื่อทำการเจาะความเข้มข้นเพื่อหาค่า $IC_{50}$ ณ ความเข้มข้นที่ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$ .....	100
29	เซลล์มะเร็ง SW480 ที่รุกรานลงมายังด้านล่างของ Insert เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X .....	103
30	เซลล์มะเร็ง HeLa ที่รุกรานลงมายังด้านล่างของ Insert เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 400X .....	104

ภาพประกอบ

หน้า

31 กราฟแสดง % Invasion ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 500, 750 และ 1,000 µg/ml.....106

32 เซลล์มะเร็ง SW480 ในกลุ่มควบคุมเมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....107

33 เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 500 µg/ml เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....108

34 เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 750 µg/ml เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....109

35 เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 1,000 µg/ml เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....110

36 กราฟแสดง %Invasion ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 100, 200 และ 400 µg/ml.....112

37 เซลล์มะเร็ง HeLa ในกลุ่มควบคุมเมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....113

38 เซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 100 µg/ml เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....114

39 เซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 200 µg/ml เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....115

## ภาพประกอบ

## หน้า

40	เซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X.....	116
41	การแสดงออกของยีน RAGE และ ยีน $\beta$ -actin ในเซลล์มะเร็ง SW480.....	118
42	กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดแอปเปิ้ลที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480.....	119
43	การแสดงออกของยีน RAGE และ ยีน $\beta$ -actin ในเซลล์มะเร็ง HeLa.....	121
44	กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดแอปเปิ้ลที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa.....	122
45	ตัวอย่างแสดงการเจือจางแบบลำดับขั้น (serial dilution).....	160



## คำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
%	percent
/	per
Abs.	Absorbance
B16F10	highly tumorigenic mouse melanoma
bp	base pair
Caco-2	Human Caucasian colon adenocarcinoma
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
dATP	deoxyadenosine triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
FBS	Fetal Bovine Serum
G	G-force
G82S	A glycine to serine change at position 82 on RAGE gene
GAE	Gallic Acid Equivalent
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HaCaT	Human keratinocyte

HeLa	Human cervical cancer cell
HEp-2	Human larynx carcinoma
HepG2	Human liver hepatoblastoma
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HT-29	Human colon adenocarcinoma
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration at 50%
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium Chloride
μl	Microlitre
μM	Micromolar
mM	millimolar
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
OD	Optical Density
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	part per million
RAGE	Receptor of Advanced Glycation Endproducts
RCF	Relative Centrifugal Force
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	revolution per minute
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SW480	Human colon adenocarcinoma
SW620	Human metastasis colon carcinoma
UV	Ultraviolet light
w/v	weight by volume