

ผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเพอรอกซามีน



นายอาทิตย์ อมรทวีชัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF RESVERATROL AND OXYRESVERATROL ON COBALT CHLORIDE AND DEFERO
XAMINE INDUCED STEM CELL MARKER EXPRESSION IN HEAD AND NECK CANCER CELL
CARCINOMA

Mr. Artid Amorntaveechai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลต่อ
การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดใน
เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์
คลอไรด์และดีเพอรอกซามีน

โดย

นายอาทิตย์ อมรทวีชัย

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ร้อยโทหญิง ดร. เนาวรัตน์ สุธัฒนาภพษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. อรุณวรรณ หล้าอุบล)

อาทิตย์ อมรทวีชัย : ผลของสารเรสเวราทรอลและออกซีเรสเวราทรอลต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์ และดีเฟอโรซามีน (EFFECT OF RESVERATROL AND OXYRESVERATROL ON COBALT CHLORIDE AND DEFEROXAMINE INDUCED STEM CELL MARKER EXPRESSION IN HEAD AND NECK CANCER CELL CARCINOMA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ทพ.ญ. ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ทพ. ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์, 133 หน้า.

สารเรสเวราทรอลและสารออกซีเรสเวราทรอลเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกคอมพาวนด์ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคได้หลากหลายชนิด ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจในประสิทธิภาพการต้านกิจกรรมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง โดยเฉพาะประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งซึ่งเป็นเซลล์ที่เปรียบเสมือนเป็นเมล็ดพันธุ์ไม่ดีที่จะก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ ภาวะพร่องออกซิเจนเป็นภาวะที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อต้องการศึกษาว่า สารเรสเวราทรอลและสารออกซีเรสเวราทรอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆ ภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจนได้หรือไม่ โดยในงานวิจัยนี้จะทำการจำลองภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนด้วยสารโคบอลต์คลอไรด์ และ สารดีเฟอโรซามีน ผลการทดลองพบว่าสารโคบอลต์คลอไรด์เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด *ออกซ์-4* *นานอก* *ซีดี-44* *ซีดี-105* และ *ซีดี-133* ผลที่ได้ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค RT-PCR ส่วนผลการทดลองของสารดีเฟอโรซามีนพบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *ออกซ์-4* *นานอก* *ซีดี-44* *ซีดี-105* และ *ซีดี-133* โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจวัด ผลของการวัดประสิทธิภาพของสารเรสเวราทรอลและออกซีเรสเวราทรอลพบว่า สารทั้งสองมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดต่างๆได้ จากการวัดด้วยเทคนิค Real-time PCR ในการยืนยันผลการทดลองในระดับโปรตีน ทำการตรวจวัดด้วย Flow cytometry พบว่าสารเรสเวราทรอลและออกซีเรสเวราทรอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของ *ซีดี-44* และ *ซีดี-105* ในระดับโปรตีนได้ จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าสารเรสเวราทรอลและออกซีเรสเวราทรอลมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะพร่องออกซิเจนได้

สาขาวิชา เกษัตริวิทยา

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5687159520 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: RESVERATROL / OXYRESVERATROL / HEAD AND NECK CANCER CELL CARCINOMA / CANCER STEM CELLS / COBALT CHLORIDE / DEFEROXAMINE

ARTID AMORNTAVEECHAI: EFFECT OF RESVERATROL AND OXYRESVERATROL ON COBALT CHLORIDE AND DEFEROXAMINE INDUCED STEM CELL MARKER EXPRESSION IN HEAD AND NECK CANCER CELL CARCINOMA. ADVISOR: ASST. PROF. SIREERAT SOOAMPON, D.D.S. Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. THANAPHUM OSATHANOON, D.D.S. Ph.D., 133 pp.

Resveratrol and Oxyresveratrol are naturally occurring phenolic compounds with various bioactivities. They are known to possess various anti-cancer activities, including anti-cancer stem cell. As hypoxia has been shown to favor the growth of cancer stem cell, this research aims to investigate whether Resveratrol and Oxyresveratrol can inhibit the expression of cancer stem cell under hypoxia. Cobalt Chloride (CoCl_2) and Deferoxamine (DFX) was used to mimic hypoxic condition. Using RT-PCR, we found that CoCl_2 dose-dependently induced the expression of cancer stem cell marker including *Oct-4*, *Nanog*, *CD-44*, *CD-105* and *CD-133*, the result is the same as using DFX. It dose-dependently induced the expression of *Oct-4*, *Nanog*, *CD-44*, *CD-105* and *CD-133*. Performing Real-time PCR, we showed that the induction of these cancer stem cells markers were inhibited by Resveratrol and Oxyresveratrol. Flow cytometry was used in to confirm the results in protein level. The results showed that the induction of *CD-44* and *CD-105* were inhibited by Resveratrol and Oxyresveratrol too. These results indicate that Resveratrol and Oxyresveratrol might be able to target cancer stem cells in hypoxia-associated tumor.

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ดังรายนามต่อไปนี้ ผศ.ทพ.ญ.ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ทพ.ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ คณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และสอบป้องกัน โครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำชี้แนะให้ทราบถึงข้อบกพร่องและแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ความใฝ่รู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า พี่ๆ และเพื่อนๆ ที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณ พี่ๆ น้องๆ และบุคลากรในภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ทุกกำลังใจ ความรัก คำปรึกษา ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่ได้ให้ความสนับสนุนในทุกๆ เรื่องเป็นอย่างดี ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ท
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	น
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามงานวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.4 สมมติฐาน	4
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	4
1.6 คำสำคัญ.....	4
1.7 รูปแบบงานวิจัย	4
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 สมมุติฐานเซลล์มะเร็ง (Cancer cells hypothesis).....	6
2.2 เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer stem cells).....	7
2.3 Cancer Stem Cell marker.....	8
2.3.1 CD-44	9
2.3.2 CD-105.....	9

2.3.3 CD-133.....	10
2.3.4 Oct-4.....	10
2.3.5 Nanog.....	11
2.3.6 ALDH.....	11
2.3.7 Interleukin 1 (IL-1).....	12
2.3.8 Interleukin 6 (IL-6).....	12
2.3.9 Interleukin 8 (IL-8).....	12
2.4 ภาวะพร่องออกซิเจนกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง	13
2.5 กลไกในการจำลองภาวะพร่องออกซิเจนของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีน	14
2.6 สมุนไพรกับการรักษามะเร็ง	15
2.6.1 เรสเวอราทรอล (Resveratrol).....	15
2.6.2 ออกซีเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol)	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	19
3.1.1 สารทดสอบ	19
3.1.2 สารเคมีและชุดทดสอบ	19
3.1.3 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์.....	20
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	21
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30	21
3.2.2 การวัดค่าความเป็นพิษของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีนด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)	22
3.2.3 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน <i>ซีดี-44</i> , <i>ซีดี-105</i> , <i>ซีดี-133</i> , <i>ออกซ์-4</i> และ <i>นานอก</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์ด้วย วิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	22

3.2.4 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน <i>ซีดี-44</i> , <i>ซีดี-105</i> , <i>ซีดี-133</i> , <i>ออกซ์-4</i> และ <i>นานอก</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	23
3.2.5 การยืนยันผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลต่อการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน <i>ซีดี-44</i> , <i>ซีดี-105</i> , <i>ซีดี-133</i> , <i>ออกซ์-4</i> และ <i>นานอก</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	24
3.2.6 การวัดผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลที่กระทำต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน <i>ซีดี-44</i> และ <i>ซีดี-105</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี Flow cytometry.....	24
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ (Data Analysis).....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	27
4.1 ผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์	27
4.2 ผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง	29
4.3 สารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของ <i>ออกซ์-4</i> <i>นานอก</i> <i>ซีดี-44</i> <i>ซีดี-105</i> <i>ซีดี 133</i> และ <i>วีจีเอฟ</i> ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนด้วยโคบอลต์คลอไรด์หรือดีเฟอรอกซามีน.....	33
4.4 สารเรสเวอราทรอลมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ <i>ซีดี-44</i> และ <i>ซีดี-105</i> ในภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเฟอรอกซามีน.....	37
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย	39
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	39
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	45
ภาคผนวก.....	46
รายการอ้างอิง	119
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	120

ญ

หน้า

รายการอ้างอิง 131

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 133



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทดสอบ.....	25
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni.....	47
ตารางที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	48
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni.....	50
ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	50
ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni.....	52
ตารางที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA	

และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 53

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni..... 55

ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 56

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วีอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 58

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วีอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 59

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วีอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเฟอรอกซามีนความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 61

- ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-44 ออกซ์-4 ซิตี-105 ซิตี-133 นานอก และ วีจีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเพอรอกซามีนความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 69
- ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 76
- ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 77
- ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 80
- ตารางที่ 17 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่

- ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอล หรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดย กำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทาง สถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 80
- ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีตี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดย กำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทาง สถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 83
- ตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีตี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดย กำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทาง สถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 84
- ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดย กำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทาง สถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 86
- ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอล

ทรอลหรือออกซิเรสเวอราทอรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 87

ตารางที่ 22 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทอรอลหรือออกซิเรสเวอราทอรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 89

ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทอรอลหรือออกซิเรสเวอราทอรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 90

ตารางที่ 24 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วีอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทอรอลหรือออกซิเรสเวอราทอรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 93

ตารางที่ 25 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วีอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทอรอลหรือออกซิเรสเวอราทอรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดย

กำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	93
ตารางที่ 26 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	96
ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	97
ตารางที่ 28 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	99
ตารางที่ 29 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น	

- 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 100
- ตารางที่ 30 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 103
- ตารางที่ 31 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 103
- ตารางที่ 32 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 106
- ตารางที่ 33 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น

1	ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	107
ตารางที่ 34	แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของนานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	109
ตารางที่ 35	แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	110
ตารางที่ 36	แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni	113
ตารางที่ 37	แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น	

1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 113

ตารางที่ 38 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด ซิตี-44 และ ซิตี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 116

ตารางที่ 39 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนบ่งชี้ การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด ซิตี-44 และ ซิตี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโคร โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 ไมโคร โมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความ แตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni 117

สารบัญรูปภาพ

- ภาพที่ 1.1 กลไกในการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนของโคบอลต์คลอไรด์และตีเฟอรอกซามีน..... 14
- ภาพที่ 4.2 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์ HN-30 ที่เติมสารโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 50 และ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 (A) และ 24 (C) ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และศึกษาเชิงปริมาณของยีนต่างๆโดยโปรแกรมไบโอโปรไฟล์ ที่ 6 (B) และ 24 ชั่วโมง (D) โดยใช้ยีน 18 เอส เป็นยีนควบคุม..... 30
- ภาพที่ 4.3 ผลของตีเฟอรอกซามีนต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์ HN-30 ที่เติมสารตีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 0 50 และ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 (A) และ 24 (B) ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Real-time RT-PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยใช้ยีน 18 เอส เป็นยีนควบคุม..... 32
- ภาพที่ 4.4 ผลของสารเรสเวอราทรอลและสารออกซิเรสเวอราทรอล ต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆที่อยู่ในภาวะเสมือนพร่องออกซิเจน เซลล์ HN-30 จะถูกบ่มด้วยสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ หรือสารออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ จากนั้นบ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง การแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอถูกตรวจวัดด้วยเทคนิค Real-time PCR. : Res; resresvertrol Oxy; oxyresresvertrol. *p < 0.05 เทียบกับ 0.1% DMSO (ตัวควบคุม)..... 34
- ภาพที่ 4.5 ผลของสารเรสเวอราทรอลและสารออกซิเรสเวอราทรอล ต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆที่อยู่ในภาวะเสมือนพร่องออกซิเจน เซลล์ HN-30 จะถูกบ่มด้วยสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ หรือสารออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ จากนั้นบ่มด้วยตีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง การแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอจะตรวจวัดด้วยเทคนิค

Real-time PCR. : Res; resveratrol Oxy; oxyresveratrol. *p < 0.05
 เทียบกับ 0.1% DMSO (ตัวควบคุม) 36

ภาพที่ 4.6 ผลของสารเรสเวราทรอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของ
 ของยีน ซีดี-44 และ ซีดี-105 ที่บริเวณผิวเซลล์ ในภาวะเสมือนพร้อมออกซิเจน
 เซลล์ HN-30 ถูกบ่มด้วยเรสเวราทรอลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ แล้วบ่มต่อ
 ด้วยดีเฟอโรซามีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
 การแสดงออกในระดับโปรตีนจะตรวจวัดด้วยเทคนิค Flow cytometry : DFX;
 deferoxamine Res; resveratrol *p < 0.05 เทียบกับ 0.1%DMSO (ตัว
 ควบคุม)..... 38



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	Percentage
Ab/Am	Antibiotic/Amphopericin
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ANOVA	Analysis of variance
ASCs	Adult stem cells
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Carbon dioxide
CoCl ₂	Cobalt chloride
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EMTs	Epithelial-mesenchymal transitions
ESCs	Embryonic stem cells
FBS	Fetal bovine serum
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1 hydroxylase
GLUT-1	Glucose transporter 1
HIF- α	Hypoxia inducible factor -alpha
HIF- β	Hypoxia inducible factor -beta
HPV	Human papilloma virus
HRE	Hypoxia responsive element
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IC ₅₀	Half maximal inhibitor concentration
ICM	Inner cell mass
L-glu	L-glutamine
LSD	Least Significant Difference
mRNA	Massenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymal stem cell

MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
O ₂	Oxygen
<i>OCT-4</i>	Octamer binding transcription factor 4
OD	Optical density
TNF- α	Tumor necrosis factor -alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
p	Probability
PBS	Phosphate buffer saline
PHDs	prolyl hydroxylases
<i>REX-1</i>	Reduced expression 1
RHAMM	Receptor for hyaluronan-mediated motility
SALL4	Sal-like 4
SD	Standard deviation
THZ	Thioridazine
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TIG-1	Human lung embryonic fibroblasts
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel Lindau

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบันการรักษามะเร็งเป็นสิ่งที่ยากอย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วย สาเหตุหนึ่งที่ทำให้การรักษาไม่ได้ผลคือการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรคอันเนื่องมาจากการคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ในการรักษาโรคมะเร็งให้มีประสิทธิภาพสูงสุดนั้น การทำความเข้าใจถึงกระบวนการเกิดมะเร็งถือเป็นสิ่งสำคัญมากต่อการพัฒนาวิธีหรือสารใหม่ๆในการรักษาโรคมะเร็ง

ในปี 2006 ได้มีการประชุมเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells) และได้กำหนดนิยามของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งไว้ว่าเป็นกลุ่มเซลล์ที่พบภายในเนื้องอก (tumor) โดยเซลล์กลุ่มนี้มีความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง (self-renewal) และสามารถก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งรุ่นต่อไป (Clarke et al., 2006) ซึ่งตามทฤษฎีของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนั้น เซลล์ทุกเซลล์ไม่ได้มีความเท่าเทียมกันในการก่อมะเร็ง เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นเซลล์ที่พบได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยในก้อนมะเร็ง แต่มีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและก่อให้เกิดก้อนมะเร็งใหม่ (Tannishtha et al., 2001) นอกจากนี้เซลล์กลุ่มนี้ยังมีกลไกในการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดีออกซีและต้านการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งเป็นผลให้เซลล์มะเร็งยังคงอยู่รอด (Shankar et al., 2011) ดังนั้นการค้นหาลำดับที่มียุทธศาสตร์ในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจึงมีความสำคัญและน่าสนใจเป็นอย่างมาก

สมุนไพรถือเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการพัฒนายาชนิดใหม่ๆ มีการสกัดพบสารสำคัญในสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการเติบโตของก้อนมะเร็ง หนึ่งในสารสมุนไพรที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง คือสารเรสเวอราทรอล (resveratrol : trans-3,4',5-trimethoxystilbene) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) พบอยู่ในพืชหลากหลายชนิด เช่น องุ่น ถั่วลิสง และพีชตระกูลเบอร์รี่ จากการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาในปัจจุบันพบว่าสารเรสเวอราทรอลมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันโรคมะเร็ง (Aggarwal et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสและต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Sun A. Y. et al., 2010) จากงานวิจัยของ Cui และคณะ (2010) ได้ทำการทดลองในเซลล์ไลน์มะเร็งตับอ่อนชนิด PANC-1, BxPC-3 และ AsPC-1 เพื่อดูกิจกรรมการต้านมะเร็งของสารเรสเวอราทรอล พบว่าสารเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิด และเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการกระตุ้นโปรตีน Bcl-2, Bcl-xL, XIAP และ Bax และยังพบอีกว่าเซลล์ไลน์ต่างชนิดกันมีความไวต่อสารเรสเวอราทรอลต่างกันกล่าวคือ PANC-1 และ BxPC-3 มีความไวต่อสารเรสเวอราทรอลมากกว่า AsPC-1

การศึกษาเบื้องต้นในห้องวิจัยโดยใช้เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มัสเซลล์ ชนิด HSC-3, HN-8 และ HN-30 พบว่าสารเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและลดการแสดงออกของ *วีกีเอฟ* ซึ่งเป็นยีนที่สนับสนุนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Sintuyan et al., 2014) ผลที่คล้ายกันยังพบในสารออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol : trans-2,3,4,5-tetramethoxystilbene) ซึ่งเป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล และเป็นสารอนุพันธ์ของสารเรสเวอราทรอล (Sun H. Y. et al., 2010) โดยพบได้มากในไม้ของตระกูลหม่อน (mulberry) และที่แก่นของต้นมะหาด (*A.lakoocha heartwood*) (Supawatchara et al. 2010).

การศึกษาผลของเรสเวอราทรอลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งโดย Shankar และคณะ (2011) พบว่าสารเรสเวอราทรอลสามารถนำไปบริหารจัดการในการรักษามะเร็งตับอ่อนได้ โดยไปยับยั้งการทำงานต่างๆของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตับอ่อนทั้งในมนุษย์และหนูไมซ์ KrasG12D กล่าวคือไปยับยั้งการแบ่งแทนตัวเอง เพิ่มการอะพอพโทซิสผ่านทางกระตุ้น *capase-3/7* ยับยั้ง pluripotency maintaining factors อันได้แก่ *นานอก ออกซ์-2 c-Myc ออกซ์-4* และ epithelial-mesenchymal transition อันได้แก่ *Zeb-1 Slug Snail* ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pandey และคณะ (2011) ซึ่งพบว่า สารเรสเวอราทรอลเหนี่ยวนำกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านม โดยลดการสร้างยีนของ fatty acid synthase (FAS) ซึ่งมักมีการแสดงออกที่มากในเซลล์มะเร็งเต้านม ร่วมกับการเพิ่มยีน pro-apoptotic DAPK2 และ BNIP3 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านม นอกจากนี้สารเรสเวอราทรอลยังมีผลยับยั้ง การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมในการทดลองในสัตว์อีกด้วย

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภาวะพร่องออกซิเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Heddleston และคณะ (2009) ได้ทำการทดสอบการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมอง พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมองมีการแสดงออกของ hypoxia inducible factors (HIFs) หรือ ฮีฟ ซึ่งเป็น transcription factors ที่สำคัญในภาวะพร่องออกซิเจน มากกว่า เซลล์มะเร็งทั่วไปหรือเซลล์ประสาทปกติ การยับยั้ง ฮีฟ ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมองนั้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแบ่งแทนตัวเอง การแบ่งเซลล์ และการอยู่รอดในระดับ *in vitro* ส่วนในระดับ *in vivo* พบว่าก้อนมะเร็งที่มาจากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมองมีขนาดเล็กลง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2010) ซึ่งพบว่า ภาวะพร่องออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งในการกระตุ้นการแบ่งแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนมาตรฐานที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น *ออกซ์-4 c-Myc* และ *นานอก* ผ่านทาง ฮีฟ-อัลฟาร์

การศึกษาเบื้องต้นในห้องวิจัยถึงผลของภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้แก่ ซีดี-44 ซีดี-73 ซีดี-90 ซีดี-105 ออกซ์-4 ไรท์-1 นานอก และ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ไลน์ 3 ชนิดคือ HSC-3, HN-8 และ HN-30 พบว่าภาวะพร่องออกซิเจนเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดใน HN-30 ได้ดีที่สุด (Ketkaew et al., 2016) ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงทำการทดสอบว่าโคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2) และดีเฟอโรซามีน (Deferoxamine) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้จำลองภาวะพร่องออกซิเจนอย่างแพร่หลายนั้นสามารถเหนี่ยวนำยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดใน HN-30 ได้หรือไม่ นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอลมีผลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีนหรือไม่ โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของสารเรสเวอราทรอลกับออกซีเรสเวอราทรอล ต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานที่บ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

1.2 คำถามงานวิจัย

สารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอลมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอภายใต้ภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีนได้หรือไม่

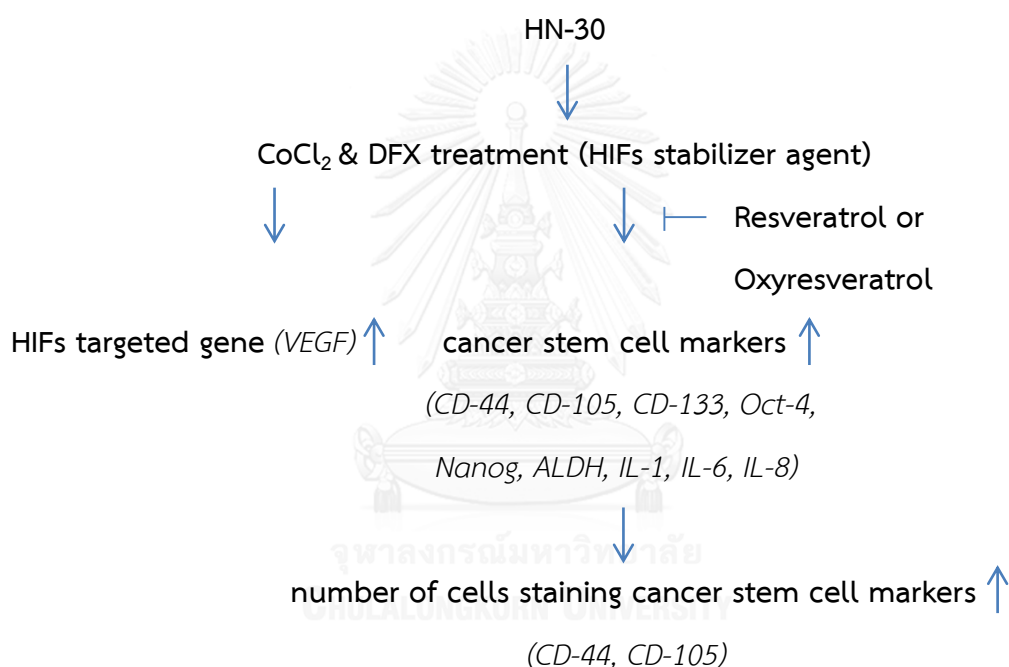
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีนที่มีต่อการแสดงออกของยีนต่างๆในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีน

1.4 สมมติฐาน

1. โคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีนมีผลไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่างๆในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอได้
2. ทั้งสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอล มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีน

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย



1.6 คำสำคัญ

resveratrol, oxyresveratrol, head and neck cancer cell carcinoma, cancer stem cells, cobalt chloride, deferoxamine

1.7 รูปแบบงานวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Experimental research)

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คาดว่าผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเพอรอกซามีนในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอลในเซลล์มะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มีสเซลล์ จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อไปศึกษาต่อเชิงลึกในประสิทธิภาพเชิงเภสัชวิทยาของสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอล และนำไปพัฒนาในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอต่อไป



บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งศีรษะและลำคอชนิด head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) จัดเป็นมะเร็งที่พบบากถึงร้อยละ 90 ซึ่งพบบากที่สุดในมะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ (head and neck cancer) (Sunar, 2013) มะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอนั้นจัดเป็นมะเร็งชนิดที่พบบากเป็นอันดับที่ 5 ของโลก ในทุกๆปีจะมีผู้ป่วยรายใหม่เกิดขึ้นประมาณ 780,000 คน ผู้ป่วยร้อยละ 40-50 จะเสียชีวิตภายใน 5 ปีหลังตรวจพบ บริเวณที่มักพบมะเร็งชนิดนี้ ได้แก่ ช่องปาก (oral cavity) โพรงจมูก (nasal cavity) คอหอย (pharynx) และกล่องเสียง (larynx) เป็นต้น วิธีการรักษาที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ วิธีการผ่าตัด (surgery) การฉายรังสี (radiotherapy) หรือใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกัน และการใช้ยาเคมีบำบัด โดยเฉพาะยาในกลุ่ม platinum-based chemotherapeutic เป็นหลัก แต่การรักษาที่กล่าวมาข้างต้นมีข้อจำกัดหลายประการ ผลการรักษาที่ให้ผลแบบหายขาดจึงมีไม่มาก โอกาสที่ผู้ป่วยจะกลับมาเป็นซ้ำก็มีสูง (Burri et al., 2009) การคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนั้นเป็นสาเหตุหนึ่งของการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรคมะเร็งได้ แม้จะพบประชากรของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้เพียงปริมาณน้อยในก้อนมะเร็ง (tumors) แต่การคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีผลต่อความรุนแรงของโรค (aggressiveness) การแพร่กระจาย (metastasis) และการต้านต่อการรักษา (therapy resistance) (Vinogradov et al., 2012)

ในปัจจุบันการรักษามะเร็งจึงเป็นสิ่งที่ท้าทายอย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วย การรักษาโรคมะเร็งแบบดั้งเดิม มีเป้าหมายสุดท้ายในการกำจัดเซลล์มะเร็งให้มากที่สุด ด้วยเหตุผลนี้ทำให้วิธีการรักษาดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การทำลายเซลล์ปกติของร่างกายโดยเฉพาะเซลล์ที่แบ่งตัวเร็ว เช่น เซลล์เม็ดเลือดในไขกระดูก ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง เม็ดเลือดขาวต่ำ ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เกิดการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจากเซลล์มะเร็งมีกลไกสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และเกิดการแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อใกล้เคียง ในที่สุดก็ลุกลามไปสู่อวัยวะที่ไกลออกไป นอกจากนี้อีกปัญหาหนึ่งที่สำคัญและทำให้การรักษาไม่ได้ผลคือการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรค ดังนั้นเพื่อให้การรักษาโรคมะเร็งให้มีประสิทธิภาพสูงสุด การทำความเข้าใจถึงกระบวนการเกิดมะเร็งถือเป็นสิ่งสำคัญมาก โดยเฉพาะการศึกษาสมมุติฐานการเกิดเซลล์มะเร็งต่อการพัฒนาวิธีหรือสารใหม่ๆในการรักษาโรคมะเร็ง

2.1 สมมุติฐานเซลล์มะเร็ง (Cancer cells hypothesis)

สมมุติฐานการกำเนิดเซลล์มะเร็งที่ยอมรับกันทั่วไปในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 สมมุติฐาน คือ สมมุติฐานการวิวัฒนาการของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาไปจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือ clonal evolution

hypothesis สมมุติฐานนี้เชื่อว่าเซลล์มะเร็งทุกเซลล์มีความสามารถกระตุ้นให้เกิดก้อนมะเร็งได้ ผ่านทางการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ที่เกิดจากความผิดปกติของการซ่อมแซมดีเอ็นเอและจุดตรวจการแบ่งเซลล์ (mitotic checkpoints) ในเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม (Singh et al., 2004) อีกสมมุติฐานที่ได้รับการยอมรับมากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน คือสมมุติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง หรือ cancer stem cells hypothesis สมมุติฐานนี้กล่าวว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเปรียบเสมือนเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ดีที่ให้กำเนิดเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถเพิ่มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ความรุนแรง และการต่อการรักษาในเซลล์มะเร็ง งานวิจัยใหม่ๆ จำนวนมากที่ศึกษาหาวิธีการรักษาโรคมะเร็งโดยมุ่งไปที่การทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในผู้ป่วย

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะพบหลักฐานที่สนับสนุนสมมุติฐานเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมากขึ้นเรื่อยๆ แต่หลักฐานที่สนับสนุนสมมุติฐานการวิวัฒนาการของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาไปจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวก็ยังคงได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายอยู่ จึงควรจะมีการศึกษาทฤษฎีทั้งสองดังกล่าวร่วมกันไป

2.2 เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer stem cells)

ในปี 2006 ได้มีการประชุมเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer Stem Cells) และได้กำหนดนิยามของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งไว้ว่าเป็นกลุ่มประชากรเซลล์กลุ่มเล็กๆ ที่พบภายในเนื้องอก (tumor) โดยเซลล์กลุ่มนี้มีความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง (self-renewal) และสามารถก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งรุ่นต่อไป (Clarke et al., 2006) โดยการแบ่งตัวทดแทนตัวเองนั้นเซลล์ลูก (daughter cell) ที่เกิดขึ้นอย่างน้อย 1 เซลล์จะมีคุณสมบัติเหมือนเซลล์แม่ (parental cell) กล่าวคือมีความสามารถในการจำลองตัวเอง (replicate) และแปรสภาพเป็นเซลล์จำเพาะ ซึ่งตามทฤษฎีของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนั้น เซลล์มะเร็งทุกเซลล์ไม่ได้มีความเท่าเทียมกันในการแบ่งตัวเพื่อทำให้เกิดก้อนมะเร็งใหม่ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นเซลล์ที่พบได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยในก้อนมะเร็ง แต่มีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและก่อให้เกิดมะเร็งใหม่ การศึกษาล่าสุดยังพบอีกว่าสามารถจัดระดับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งออกเป็น 3 ลำดับชั้น คือ เซลล์ชั้นสูงสุดเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) สามารถเจริญเติบโตเป็นกลุ่มเซลล์ชั้นถัดลงมา จนเป็นเซลล์บรรพบุรุษ (progenitor cells) ในลำดับล่างสุด และยังพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชั้นสูงสุดเป็นเซลล์รูปร่างกลมที่มีการแบ่งตัวซ้ำ แต่ให้ก้อนเนื้องอกที่โตเร็วในสัตว์ทดลอง ส่วนกลุ่มเซลล์ที่อยู่ลำดับชั้นล่างสุดจะแบ่งตัวเร็ว แต่ให้ก้อนเนื้องอกที่โตช้าในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งแบ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer Stem Cells) ที่อยู่ลำดับชั้นสูงสุดสามารถฟอร์มเซลล์รูปร่างกลม (spheres) ได้ (Singh et al., 2004) และเซลล์บรรพบุรุษมะเร็ง (cancer progenitor cells) ในลำดับชั้นล่างไม่สามารถฟอร์มเซลล์รูปร่างกลมได้ แต่ยังคงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกได้ (Read et al., 2009)

ลักษณะพื้นฐานของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งประกอบด้วย (Prince et al., 2008)

1. การทดลองปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดเข้าสู่หนูทดลองที่ถูกกดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้ม พบว่าเซลล์กลุ่มนี้ยังคงมีความสามารถในการก่อให้เกิดมะเร็ง
2. พบการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งบนบริเวณผิวเซลล์ (cell surface marker)
3. ในก้อนมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง สามารถพบได้ทั้งเซลล์ที่มีความสามารถในการก่อมะเร็ง (tumorigenic cells) และ เซลล์ที่ไม่มีความสามารถในการก่อมะเร็ง (nontumorigenic cells)
4. เมื่อถูกปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในรุ่นต่อไปพบว่า ยังมีความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง (self-renewal) อยู่

ในปัจจุบันจึงเชื่อว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุการล้มเหลวของการรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีกลไกในการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดีออยาและต้านการตายแบบอะพอพโทซิส รวมไปถึงการที่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมักอยู่ในระยะพักของวงจรเซลล์ทำให้ออกจากยาเคมีบำบัดที่มักออกฤทธิ์กับเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว เป็นผลให้เซลล์มะเร็งยังคงอยู่รอด (Shankar et al., 2011) เกิดการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) การต้านต่อการรักษา (therapy resistance) รวมถึงการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง (relapse) ดังนั้นการหาสารหรือวิธีในการทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจึงเป็นสิ่งสำคัญในการรักษาโรคมะเร็งให้หายขาด (Goodwin Jinesh et al., 2014)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3 Cancer Stem Cell marker

การตรวจวัดการแสดงออกของ Cancer Stem Cell marker หรือยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งออกจากเซลล์อื่นๆ โดยมะเร็งแต่ละชนิดก็จะมี การแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุได้ว่ายีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดไหนจำเพาะต่อมะเร็งชนิดใด จึงนิยมใช้วิธีศึกษา ยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งหลายๆตัวร่วมกัน ในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มักพบในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของมะเร็งศีรษะและลำคอ ดังนี้ (Krishnamurthy et al., 2012)

2.3.1 CD-44

ซีดี-44 เป็นไกลโคโปรตีน ที่พบได้มากบนผิวของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (cell adhesion และ migration) นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ความมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ซีดี-44 เกี่ยวข้องกับกระบวนการการดำเนินรอยโรค (progression) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง ผ่านทางบทบาทการกระตุ้นการเจริญ การอยู่รอด การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่น และการอพยพของเซลล์มะเร็ง โดยการทำปฏิกิริยากันระหว่าง hyaluronic acid (HA), chondroitin sulphate และ heparan sulphate ยังมีหลักฐานปรากฏว่าเมื่อ ซีดี-44 เข้าจับกับ growth factors และ metalloproteinase-9 (MMP-9) พบการทำให้เกิดการยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส การลดปริมาณคอลลาเจน การจับตัวของเซลล์มะเร็งที่อวัยวะบริเวณอื่น และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Bourguignon et al., 2012) ซีดี-44 ยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอ (HNSCC) โดย ซีดี-44 จะส่งผลให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ ความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง การแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น และยังพบว่าระดับความรุนแรงของโรคมะเร็งมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ ซีดี-44 เช่น การต้านการรักษาด้วยการฉายรังสี เพิ่มความเสี่ยงในการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งศีรษะและลำคอ (Serena et al., 2012) ในปี 2007 งานวิจัยของ Prince และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองในมะเร็งศีรษะและลำคอของหนูที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน (immunodeficient mouse) พบว่ามีการแสดงออกของ ซีดี-44 และเมื่อทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคองี้ไปยังหนูทดลองตัวอื่นก็ยังคงพบการแสดงออกของ ซีดี-44 เช่นเดียวกันงานวิจัยของ Harper และคณะ (2007) ก็ยังพบการแสดงออกของ ซีดี-44 ซีดี-29 และ ซีดี-133 ในเซลล์ไลน์มะเร็งศีรษะและลำคอ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ ซีดี-44 มีความสัมพันธ์กับการขยายจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งศีรษะและลำคอ

2.3.2 CD-105

ซีดี-105 หรือ Endoglin เป็นไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์แบบ homodimeric มีขนาด 180 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ที่มีความจำเพาะกับ transforming growth factor beta (TGF- β) มักแสดงออกที่ผิวเซลล์เยื่อ โดยเฉพาะเซลล์หลอดเลือด (vascular endothelium) Endoglin มีความสำคัญในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่เช่นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่, vascular homeostasis, การสร้าง cardiovascular และกระบวนการสร้างโลหิต (hematopoiesis) เป็นต้น มักพบการแสดงออกที่สูงขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์เยื่อของหลอดเลือดฝอย โดยทำให้เกิดการแบ่งตัวและวางโครงสร้างให้เป็นหลอดเลือดของเซลล์เยื่อ เมื่อจับกับ TGF- β ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่ทราบกระบวนการที่ชัดเจนของ ซีดี-105 แต่การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ซีดี-

105 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆของเซลล์มะเร็ง (Hou et al., 2013) ซึ่งสามารถบ่งบอกการมีอยู่ของเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิดได้และยังสามารถใช้แสดงการมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดได้อีกด้วย (Nassiri et al., 2011) งานวิจัยของ Marioni และคณะ (2005) พบว่า *ซีดี-105* มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เยื่อบุมะเร็งศีรษะและลำคอชนิด Basaloid squamous cell carcinoma ที่กำลังแบ่งตัวอีกทั้งยังพบการแสดงออกในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนมะเร็งในระดับสูง

2.3.3 CD-133

ซีดี-133 หรือ Prominin-1 เป็นไกลโคโปรตีนแบบ pentaspan transmembrane ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง มักแสดงออกในมะเร็งสมอง ต่อมลูกหมาก ปอด ผิวหนัง ตับ ลำไส้ใหญ่ และมะเร็งศีรษะและลำคอ มีการศึกษาพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ *ซีดี-133* ในเซลล์ไลน์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มีส มีผลเพิ่มความสามารถในการสร้างโคโลนี สร้างก้อนมะเร็ง แบ่งทดแทนตัวเอง การเพิ่มจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนไปเป็นเซลล์อื่น และความสามารถในการก่อมะเร็ง เป็นต้น (Harper et al., 2007) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Zhang และคณะ (2010) ในเซลล์ไลน์ชนิด oral squamous cell carcinoma พบการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งรวมถึง *ซีดี-133* พบการสร้างก้อนมะเร็งที่เพิ่มขึ้น และ การเพิ่ม clonogenicity ทั้งในเซลล์ไลน์ oral squamous cell carcinoma และเซลล์จากผู้ป่วย จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (LaBarge et al., 2008) ยังพบอีกว่า *ซีดี-133* มักแสดงออกได้ดีในมะเร็งระยะ stages III และ IV มากกว่า stages I และ II

2.3.4 Oct-4

ออกซ์-4 (octamer binding transcription factor 4) หรือ POU5F1 เป็น homeodomain transcription factor ของกลุ่ม POU ซึ่งสมาชิกกลุ่ม POU จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยเข้าจับกับ octameric sequence motif ที่ประกอบไปด้วย AGTCAAAT consensus sequence โปรตีน *ออกซ์-4* ประกอบไปด้วย 3 functional domains คือ POU (pit-Oct-Unc), DNA binding domain, N-terminal transactivation domain และ C-terminal cell type-specific transactivation domain ซึ่ง *ออกซ์-4* ถูกจัดให้เป็น stem cell-specific และ germ line-specific transcription factor ในหนูไมซ์ ส่วนในมนุษย์นั้น *ออกซ์-4* เกิดจากยีน *OTF-3* เป็นตัวคงความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ต้นกำเนิดชนิด pluripotent ส่วนหน้าที่สำคัญของ *ออกซ์-4* คือการพัฒนาของ early embryonic และทำหน้าที่คล้ายเป็น regulator หลักสำหรับช่วงเริ่มต้นและคงสภาพของเซลล์ pluripotent ในช่วงระหว่างการพัฒนาเอ็มบริโอ *ออกซ์-4* มักจะมีปฏิสัมพันธ์กับ embryonic regulators เช่น *นานอก* และ *ซีออกซ์-2* เพื่อการคง

สภาพ pluripotency และยับยั้งการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น (Bourguignon et al., 2012) ออกซ์-4 มักทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจำลองตัวเอง (self-renewal) และการควบคุมการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น (pluripotent) และการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Niwa et al., 2000) งานวิจัยของ Reers และคณะ (2014) ได้ทำการทดลองในเซลล์ไลน์และเนื้อเยื่อมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับยาเคมีบำบัด แต่กลับพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ออกซ์-4 ผู้วิจัยจึงสรุปว่า ออกซ์-4 น่าจะมีความสัมพันธ์กับการต้านการตายแบบอะพอพโทซิสและการต่ออายุเคมีบำบัด

2.3.5 Nanog

นานอก เป็น transcription factor สำคัญที่เกี่ยวกับการแบ่งทดแทนตัวเองและคงสภาพความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น (pluripotency) และการแบ่งทดแทนตัวเอง (self-renewal) ในเซลล์ต้นกำเนิด embryos และ embryonic ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การส่งสัญญาณของ **นานอก** ถูกกระตุ้นโดยปฏิสัมพันธ์ระหว่าง pluripotent stem cell regulators หลากหลายชนิดร่วมกัน เช่น *เร็กซ์-1* *ช็อกซ์-2* และ *ออกซ์-4* เป็นต้น ในการควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนเป้าหมายสำหรับการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นของเซลล์ embryonic มักพบว่า **นานอก** เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด ยังพบว่าเมื่อ hyaluronic acid (HA) ซึ่งจำเพาะกับ *ซีดี-44* ส่งผลไปสนับสนุนการสร้าง **นานอก** และการแสดงออกของ regulators ต่างๆที่เกี่ยวกับการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นของเซลล์ต้นกำเนิด สิ่งที่สำคัญคือทั้งสัญญาณจาก HA-*ซีดี-44* และการทำงานของ **นานอก** ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การต้านการตายแบบอะพอพโทซิสการอยู่รอดของเซลล์ และ ต้านยาเคมีบำบัด สำหรับเซลล์ HNSCC (Bourguignon et al., 2012) งานวิจัยของ Huang และคณะ (2014) ในเซลล์ไลน์และชิ้นตัวอย่างมะเร็งศีรษะและลำคอพบการแสดงออกของ **นานอก** ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์เยื่อช่องปากปกติและยังพบว่าการยับยั้ง **นานอก** สามารถยับยั้งความสามารถในการก่อมะเร็งของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ และเพิ่มความไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดซิสพลาติน

2.3.6 ALDH

ALDH หรือ *aldehyde dehydrogenase* เป็น cytosolic isoenzymes มักพบการแสดงออกที่สูงในเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ progenitor หลายชนิด มีหน้าที่ในช่วงต้นของเซลล์ต้นกำเนิดที่กำลังจะกลายเป็นเซลล์อื่น **ALDH** ทำหน้าที่เปลี่ยน retinol เป็นกรด retinoic และเร่งปฏิกิริยาการ oxidation สาร aldehyde metabolites ที่เป็นพิษภายในเซลล์ให้เป็น carboxylic acid ในปัจจุบัน **ALDH** จัดเป็นยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มัส เช่นเดียวกับ *ซีดี-44* นอกจากนี้ยังพบ **ALDH** ได้ในก้อนมะเร็ง

เต้านม ลำไส้ใหญ่ ตับ ปอด เป็นต้น (Major et al., 2013) งานวิจัยของ Clay และคณะพบว่า (2010) เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มัสและตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ *ALDH-1* มีการสร้างก้อนมะเร็ง เพิ่มการแพร่กระจาย แบ่งทดแทนตัวเอง และต้านต่อยาเคมีบำบัด ส่วนงานวิจัยของ Chen และคณะ (2009) พบการแสดงออกของ *ALDH* ที่เพิ่มขึ้น แปรผันตรงกับ ระยะรอยโรคที่รุนแรงขึ้นในก้อนมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็ง

2.3.7 Interleukin 1 (IL-1)

Interleukin-1 (IL-1) ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยคือ *IL-1 α* และ *IL-1 β* เมื่อ *IL-1* เข้าจับกับ receptors จะทำให้เกิดการกระตุ้น NF- κ B เป็นผลให้เกิดการแสดงออกของ *IL-6* และ *IL-8* ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง และ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง งานวิจัยก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยมะเร็งพบว่าการแสดงออกของ *IL-1* ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งในขั้น advanced metastatic disease นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ *IL-1* ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมอีกด้วย

2.3.8 Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin 6 (IL-6) เป็น pleiotropic cytokine ซึ่งปล่อยออกมาจากเซลล์หลากหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunoregulation) *IL-6* ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการอักเสบแบบเรื้อรัง ความดันโลหิตสูง อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งที่ลดลง เพิ่มปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างก้อนมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งผ่านทาง การสนับสนุนการสร้างก้อนมะเร็ง (tumorigenesis) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และ การแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) *IL-6* นั้นเป็นตัวกระตุ้นการแบ่งทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมผ่านทาง การกระตุ้น *IL-6* receptor/GP130 complex ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้น Stat3 ต่อมา ในเซลล์ที่เกิดการอักเสบทำให้เกิดกระบวนการทรานสคริปชันไปกระตุ้น NF- κ B ทำให้เกิดการปล่อย *IL-6* และ *IL-8* ที่มีบทบาทกับเซลล์มะเร็งตามที่กล่าวข้างต้น จึงสรุปได้ว่า *IL-6* สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ในหลากหลายวิธี

2.3.9 Interleukin 8 (IL-8)

Interleukin 8 (IL-8) คือ pro-inflammatory cytokine ที่สามารถปล่อยออกมาจากเซลล์หลายชนิด เช่น mesenchymal cells, macrophages และ immune cells อื่นๆ มีหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ *IL-8* สามารถส่งสัญญาณได้หลากหลายเส้นทางโดยการเข้าจับกับตัวรับ CXCR1 และ CXCR2 ปริมาณ *IL-8* ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งมีความสัมพันธ์กับการรักษาที่ไม่ได้ผล จากการศึกษาในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ CXCR1

เกี่ยวข้องกับการแบ่งทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมและการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของก้อนมะเร็งด้วย

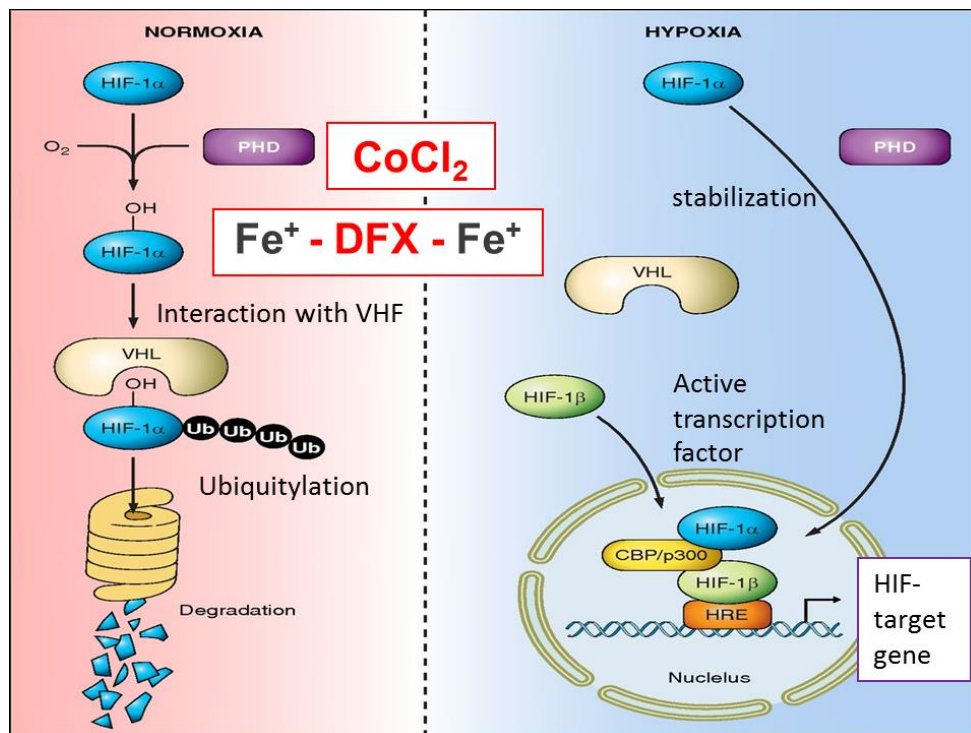
2.4 ภาวะพร่องออกซิเจนกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

ภาวะพร่องออกซิเจนคือภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนลดลงกว่าระดับปกติ พบได้ในมะเร็งทุกชนิดที่มีลักษณะเป็นก้อน โดยมีสาเหตุจากการที่เซลล์มะเร็งแบ่งตัวออกไปไกลกว่าหลอดเลือดที่มาเลี้ยงทำให้เซลล์ดังกล่าวได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ (Li et al., 2010) จากภาวะดังกล่าว เซลล์มะเร็งจึงต้องมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด โดยอาศัยกลุ่มโปรตีนชื่อ hypoxia inducible factors (HIFs) หรือ ฮีฟ ซึ่งในภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ (normoxia) ฮีฟ-อัลฟา ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นถูกทำลายอย่างรวดเร็ว โดย ฮีฟ-อัลฟา จะถูก hydroxylate ด้วย prolyl hydroxylase domain (PHD) ซึ่งอาศัยออกซิเจนเป็น co-factor หลังจากนั้น VHL complex จะเข้ามาจับที่ตำแหน่ง -OH ส่งผลให้เกิด ubiquitylation ขึ้นซึ่งเป็นสัญญาณให้เกิดการทำลาย ฮีฟ-อัลฟา โดยโปรติเอสโมในที่สุด ในทางกลับกันที่ภาวะพร่องออกซิเจน PHD ไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากขาดออกซิเจนเป็น co-factor ทำให้ ฮีฟ-อัลฟา ไม่ถูกทำลาย ฮีฟ-อัลฟา จึงสามารถเข้าไปภายในนิวเคลียสรวมตัวกับ ฮีฟ-เบต้า จนกลายเป็น transcription factor หลักที่ควบคุมการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ (Kim et al., 2009) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในภาวะพร่องออกซิเจน เช่น กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ การแบ่งตัวของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น และการควบคุมการตายแบบ apoptosis เป็นต้น (Li et al., 2013) ปัจจุบันเป็นที่ทราบแน่ชัดว่าภาวะพร่องออกซิเจนเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง การกระจายของเซลล์มะเร็ง และเพิ่มความเสี่ยงในการเสียชีวิตของผู้ป่วย

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภาวะพร่องออกซิเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Li และคณะ (2009) ได้ทำการทดสอบการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมอง พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมองมีการแสดงออกของ ฮีฟส์ มากกว่าเซลล์มะเร็งทั่วไปหรือเซลล์ประสาทปกติ การยับยั้ง ฮีฟส์ ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมองนั้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง การแบ่งเซลล์ และการอยู่รอดในระดับ *in vitro* ส่วนในระดับ *in vivo* พบว่าก้อนมะเร็งที่มาจากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสมองมีขนาดเล็กลง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และ Rich (2010) ซึ่งพบว่า ภาวะพร่องออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งในการกระตุ้นการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนมาตรฐานที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น *ออกซ์-4 c-Myc* และ *นาโนเอก* ผ่านทาง ฮีฟส์

2.5 กลไกในการจำลองภาวะพร่องออกซิเจนของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีน

ในปัจจุบันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนนั้น อาจจำลองภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการโดยวิธีทางกายภาพ คือ การลดปริมาณออกซิเจนในภาชนะปิด โดยการแทนที่ก๊าซออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน จนปริมาณออกซิเจนลดถึงค่าระดับที่ต้องการ โดยอาศัยการตรวจวัดจากเครื่องตรวจวัดออกซิเจน อีกวิธีหนึ่งคือการเติมสารเคมี เช่น โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2) ดีเฟอโรซามีน ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) สารกลุ่มไอรอนคีเลเตอร์ (iron chelator agent) เป็นต้น ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 1.1 กลไกในการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอโรซามีน
ดัดแปลงจาก: (Shimoda, 2012)

โคบอลต์คลอไรด์ถือเป็นสารเคมีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการจำลองภาวะพร่องออกซิเจน โดยโคบอลต์จะเข้าไปแทนที่เหล็กในตำแหน่งของไอรอนบายดิงโดเมน (iron binding domain) ของเอนไซม์โพรลิวไฮดรอกซิเลส (PHD) ทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ให้แก่ ฮีฟ-อัลฟ่า ได้ นอกจากนี้โคบอลต์ยังสามารถจับกับ ฮีฟ-อัลฟ่า ที่ผ่านกระบวนการไฮดรอกซิเลชันแล้ว และยับยั้งการจับกันระหว่าง ฮีฟ-อัลฟ่า และโปรตีนวีเอชแอล (von-Hippel-Lindau tumor suppressor protein หรือ VHL) ทำให้ไม่เกิดการย่อยสลายของ ฮีฟ-1-อัลฟ่า และ ฮีฟ-2-อัลฟ่า ในสภาวะที่มีออกซิเจน (รูปที่ 1.1)

ส่วนดีเฟอโรซามีน (deferoxamine หรือ DFX) มีสมบัติเป็นไอรอนคีเลเตอร์ (iron chelators) ถือเป็นอีกหนึ่งสารเคมีที่นิยมใช้ในการจำลองภาวะพร่องออกซิเจน โดยดีเฟอโรซามีน จะเข้าไปแย่งจับกับเหล็กที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์โพรลิวไฮดรอกซีเลส (PHD) ทำให้เอนไซม์นี้สูญเสียการทำงานไม่สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ให้ ฮีพ-อัลฟาร์ ส่งผลให้ ฮีพ-อัลฟาร์ ไม่ถูกย่อยสลายโดยโปรติเอส (รูปที่ 1.1) (Triantafyllou et al., 2006)

2.6 สมุนไพรกับการรักษามะเร็ง

สมุนไพรถือเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการพัฒนายาชนิดใหม่ๆ มีการสกัดพบโดยอาศัยสารสำคัญในสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการเติบโตของก้อนมะเร็ง สารสมุนไพรที่ผู้วิจัยสนใจและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง คือสารเรสเวอราทรอล (resveratrol) และ ออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol)

2.6.1 เรสเวอราทรอล (Resveratrol)

Resveratrol (*trans*-3,4',5-trimethoxystilbene) เป็นสารในกลุ่ม phytoalexin ซึ่งอยู่ในพืชกว่า 70 ชนิด เช่น องุ่น ถั่วลิสง และ ตระกูลเบอร์รี่ ในทางการแพทย์แผนจีนจะใช้การสกัดสารเรสเวอราทรอลออกมาจากรากของพืช white hellebore (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) เพื่อนำมาใช้รักษาโรคทางผิวหนัง สารเรสเวอราทรอลละลายได้ในเอทานอล (ethanol) และไดเมทิลซัลโฟไซด์ (dimethylsulphoxide; DMSO) จากการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาในปัจจุบันพบว่าสารเรสเวอราทรอลมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันโรคมะเร็ง (prevention of cancers) โรคหัวใจ และการอักเสบ เป็นต้น (Aggarwal et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส (antiviral) และต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) อีกด้วย (Sun A. Y. et al., 2010) การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารเรสเวอราทรอลที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็ง มีดังนี้

- สารเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (oral squamous cell carcinoma) ชนิด SCC-25 (ElAttar et al., 1999) ได้โดยการทดลองให้ความเข้มข้นของสารเรสเวอราทรอลที่ 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับพบว่าทำให้สารเรสเวอราทรอลร่วมกับ quercetin นั้นมีการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มากกว่าให้สารเรสเวอราทรอลเดี่ยว

- การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของ JANG และคณะ (1999) พบว่า สารเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง ROS ในเซลล์ RAW 264.7 ซึ่งเป็นเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ของหนูแรท เซลล์โมโนไซด์ (monocyte) และนิวโทรฟิล (neutrophils) ของมนุษย์ มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 17 18 และ 23 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งกลไกยับยั้งการสร้าง ROS ของสารเรสเวอราทรอลเกี่ยวข้องกับกลไกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย และยังพบว่าความแรงในการยับยั้งการสร้าง ROS ขึ้นกับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ hydroxyl (-OH) บนโครงสร้างทางเคมี ดังนั้นสารเรสเวอราทรอลและสารอนุพันธ์จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป หนึ่งในอนุพันธ์ของสารเรสเวอราทรอลคือสารออกซีเรสเวอราทรอล

- การศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อผนังลำไส้ปกติและชิ้นเนื้อมะเร็ง ในช่วงก่อนและหลังได้รับสารเรสเวอราทรอล (Nguyen et al., 2009) โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสารเรสเวอราทรอล 20 มิลลิกรัมต่อวัน และ 80 มิลลิกรัมต่อวัน กับกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสารเรสเวอราทรอลในรูปผงโดยการรับประทาน 80 กรัมต่อวัน และ 120 กรัมต่อวัน ผู้วิจัยใช้ Wnt signaling pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งในการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายปริมาณสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติจริง ผลการทดลองสรุปได้ว่าสารเรสเวอราทรอลกับผงไปลดการแสดงออกของยีน Wnt ในผนังลำไส้ปกติ ซึ่งได้ส่วนมากเป็นผลที่เกิดจากผงอยู่ในขนาดต่ำ

- การศึกษาฤทธิ์ต่อขนาดของก้อนมะเร็ง (Oi et al., 2010) โดยผู้วิจัยทำการฉีดเซลล์มะเร็งระดับอ่อนของมนุษย์ (PaCa-2) เข้าไปยังหนูทดลองชนิด Swiss nude mice เพื่อให้เกิดการสร้างมะเร็งระดับอ่อนภายในร่างกายหนู หลังจากนั้นให้สารเรสเวอราทรอลทางปาก 10 หรือ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าสารเรสเวอราทรอลสามารถไปลดขนาดและจำนวนของก้อนมะเร็งแบบขึ้นกับขนาดของยาเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าผลยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการอักเสบอีกด้วย

- งานวิจัยของ Cui และคณะ (2010) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านมะเร็งของสารเรสเวอราทรอลในเซลล์ไลน์มะเร็งระดับอ่อนชนิด PANC-1 BxPC-3 และ AsPC-1 ผลการทดลองพบว่าสารเรสเวอราทรอลไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งระดับอ่อนแบบขึ้นกับขนาดของยาและเวลา ยังพบอีกว่าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ PANC-1 BxPC-3 และ AsPC-1 ด้วยค่า IC₅₀ ที่ 48 ชั่วโมง และพบว่าไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งระดับอ่อนผ่านการเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสโดยการเพิ่มแสดงออกของโปรตีนในการต้านการตายแบบอะพอพโทซิสคือ Bcl-2 Bcl-xL XIAP และโปรตีนกลุ่ม proapoptotic protein คือ Bax ซึ่งเซลล์ไลน์ PANC-1 และ BxPC-3 มีความไวต่อสารเรสเวอราทรอลมากกว่า AsPC-1

- การศึกษาฤทธิ์ที่ก่อให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของ Howells และคณะ (2011) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่แพร่กระจายไปยังตับ 9 ราย ผลจากการศึกษาพบว่า การให้สารเรสเวอร่าทรอลขนาด 5 กรัมต่อวัน มีผลไปเพิ่มการแสดงออกของ cleaved caspase-3 ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับ ซึ่งเป็นผลไปเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ยาหลอก

ผลของสารเรสเวอร่าทรอลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

- งานวิจัยของ Shankar และคณะ (2011) ได้ทดลองในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตับอ่อนของมนุษย์ชนิดที่มีการแสดงออกของ *ซีดี-133(+)* *ซีดี-44(+)* *ซีดี-24(+)* *ESA(+)* และ *aldehyde dehydrogenase* ในระดับสูงมาก *นานอก ออกซ์-4 Notch1 MDR1* และ *ABCG2* ในระดับสูง และมีความสามารถในการก่อมะเร็งสูง เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจากหนู *KrasG12D* ก็มีการแสดงออกของ *นานอก* และ *ออกซ์-4* ในระดับสูงเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองพบว่าสารเรสเวอร่าทรอลยับยั้งการแบ่งแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตับอ่อนทั้งในมนุษย์และหนู *KrasG12D* (วัดได้จากขนาดและน้ำหนักของมะเร็งตับอ่อนในหนู *KrasG12D*) เพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิส ยับยั้ง pluripotency maintaining factors (*นานอก ซีออกซ์-2 c-Myc* และ *ออกซ์-4*) และยีนดี้อาย (*ABCG2*) อีกทั้งไปยับยั้งการแพร่กระจาย การบุกรุกและ markers of epithelial-mesenchymal transition (*Zeb-1 Slug* และ *Snail*) อีกด้วย

- งานวิจัยของ Pandey และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลของสารเรสเวอร่าทรอลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด (*ซีดี-24(-)/ซีดี-44(+)/อีเอสเอ(+)*) จากเซลล์โล้นมะเร็งเต้านมทั้งชนิด อีอาร์+ และ อีอาร์- พบว่าสารเรสเวอร่าทรอลไปลดอัตราความอยู่รอดของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและการสร้างเซลล์ต่อมน้ำนม โดยเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสอันเป็นผลมาจากการลดการสร้างไขมันของเอนไซม์ fatty acid synthase (FAS) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้พยาธิสภาพของการเป็นมะเร็ง ตามด้วยการเพิ่มยีน pro-apoptotic genes *DAPK2* และ *BNIP3* การกระตุ้น apoptotic pathway สรุปได้ว่าสารเรสเวอร่าทรอลไปลด FAS-mediated cell survival signaling เป็นผลไปเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิส ผู้วิจัยยังพบอีกว่าสารเรสเวอร่าทรอลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งใน xenograft ของสัตว์ทดลองโดยปราศจากความเป็นพิษอีกด้วย

2.6.2 ออกซีเรสเวอร่าทรอล (Oxyresveratrol)

Oxyresveratrol (trans-2,3,4,5-tetramethoxystilbene) จัดเป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอลิก และเป็นสารอนุพันธ์ของเรสเวอร่าทรอลซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกันมาก พบได้มากในไม้ของตระกูลหม่อน (mulberry) และที่แก่นของต้นมะหาด (*A.lakoocha* heartwood) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่น

ของทวีปเอเชีย ออกซิเรสเวอราทอรอลมักใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง อาการทางสมอง ใช้ใน
อุตสาหกรรมอาหารเป็นต้น (Sun H. Y. et al., 2010 : Supawatchara et al. 2010) และยังมี
การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารออกซิเรสเวอราทอรอลที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็ง ได้แก่

- การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบระหว่างสารออกซิเรสเวอราทอรอลกับสาร
เรสเวอราทอรอล ของ Lorenz และคณะ (2003) ทำการทดสอบในเซลล์ microglial ที่ถูกเหนี่ยวนำให้
เกิด ROS/RNS ผลการทดลองสรุปว่าสารออกซิเรสเวอราทอรอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารเรส
เวอราทอรอล แต่ในทางกลับกันสารเรสเวอราทอรอลสามารถลดการสร้าง NO ได้ดีกว่าสารออกซิเรสเว
อราทอรอล เทียบจากค่า IC₅₀ อย่างไรก็ตามสารออกซิเรสเวอราทอรอลนั้นไม่มีผลต่อการทำงานของ
เอนไซม์ iNOS และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า จึงสรุปว่าสารออกซิเรสเวอราทอรอลเป็นสารที่มี
คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารเรสเวอราทอรอล

- งานวิจัยของ Rebecca และ Neal (2009) ได้ศึกษาผลของสารออกซิเรสเวอราทอรอลต่อ
เซลล์ไลน์ชนิด HCT-116 (มะเร็งลำไส้ใหญ่) MDA-MB-231 (มะเร็งเต้านมแบบ ER-) และ PC-3
(มะเร็งต่อมลูกหมาก) โดยวัดการต้านอนุมูลอิสระผ่านทางกิจกรรมของ *Sirtuin-1 (SIRT-1) histone
deacetylase (HDAC) cyclooxygenase 1 และ 2 (COX-1 และ COX-2)* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองพบว่าสารออกซิเรสเวอราทอรอลมีผลต่อกิจกรรม
การต้านมะเร็งแบบขึ้นกับขนาดของยา พบการกระตุ้น SIRT-1 การยับยั้ง HDAC COX-1 และ COX-
2 ซึ่งสรุปได้ว่าสารออกซิเรสเวอราทอรอลออกฤทธิ์ทั้งการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งด้วย

- การศึกษาสารสกัดออกซิเรสเวอราทอรอลจากแก่นมะหาด (Nasapon Povichit et al.,
2010) ด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ anti-glycation ด้วยวิธี DPPH และ TBARS พบว่าค่า IC₅₀
เท่ากับ 0.1±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.0±0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยได้
นำไปเทียบกับการทดลองที่ผ่านมาของผู้วิจัยเองพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ anti-glycation ของ
สารสกัดออกซิเรสเวอราทอรอล มีค่าเป็นสองเท่าของสารเรสเวอราทอรอล

- งานวิจัยของ S.M. (2014) สนใจศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรรำข้าวเย็นเหนือ ซึ่งมีสาร
ออกฤทธิ์ที่สำคัญคือสารออกซิเรสเวอราทอรอลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2) และมะเร็งตับ
(HepG-2) ผลการทดลองที่ได้คือพบการแบ่งตัวที่ลดลงใน Caco-2 และ HepG-2 แบบขึ้นกับขนาด
ของยา แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน HepG-2 ส่วนสารสกัดเอทานอลของ
รำข้าวเย็นเหนือให้ผลเหมือนกับสารออกซิเรสเวอราทอรอล คือเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผ่าน
ทางการเพิ่ม mitochondrial dysfunction แต่การสร้าง ROS ที่เพิ่มขึ้นพบเพียงในสารสกัดเอทา
นอลของรำข้าวเย็นเหนือเท่านั้น

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารทดสอบ

- เรสเวอราทรอล (Resveratrol) (Sigma, Italy)
- ออกซีเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol) (Sigma, USA)

3.1.2 สารเคมีและชุดทดสอบ

- อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM, Gibco, USA)
- ซีรัมจากฟิโตสัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)
- แอลกลูตามีน (L-glutamine) (Invitrogen, USA)
- สเตربتอไมซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate, Invitrogen, USA)
- เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium, Invitrogen, USA)
- แอมโฟเพอริซินบี (Amphopericin, Invitrogen, USA)
- เอนไซม์ทริปซินอีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA, Gibco, USA)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยนที่ปราศจากเชื้อ (Sterile Phosphate Buffer Saline; PBS)
- น้ำกลั่น
- สารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ (Glycine buffer)
- ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO, PAN™ Biotech GmbH, USA)
- เอ็มทีที (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT, USB, USA)
- สารละลายไตรซอล (TRIzol, 5 prime, Germany)
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform, Roche Diagnostics, USA)
- ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, Sigma, USA)
- อะกาโรส (Agarose, Axygen Biosciences, USA)
- เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 (70% Ethanol, Hayman, UK)
- ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (ImProm-IITM Reverse Transcription system, Promega, USA)
- เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase, Invitrogen, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน 18 เอส (Primer for 18S, Sigma, USA)

- โพรเมอร์สำหรับยีน ออกซ์-4 (Primer for *OCT-4*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน นานอก (Primer for *NANOG*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ซีดี44 (Primer for *CD44*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ซีดี105 (Primer for *CD105*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ซีดี133 (Primer for *CD133*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ไอแอล1 (Primer for *IL1*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ไอแอล6 (Primer for *IL6*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ไอแอล8 (Primer for *IL8*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน VEGF (Primer for *VEGF*, Sigma, USA)
- แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ซีดี44 (FITC-conjugated anti-CD44 antibody, BD Biosciences Pharmingen)
- แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ซีดี105 (PE-conjugated anti-CD105 antibody, BD Biosciences Pharmingen)
- เซกคันดารีแอนติบอดีจากแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีจากหนู (Goat secondary antibody against mouse antibody, Millipore, USA)
- APC Streptavidin (BD Biosciences Pharmingen)
- แอนติบอดี ซีดี-3 / ซีดี-8 / ซีดี-45 (CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP antibody, BD Biosciences Pharmingen)

3.1.3 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์

- ตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator)
- ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar flow hood, Thermo electron corporation, USA)
- เครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลท (Microplate reader, ELxx800; BOI-TEK®)
- เครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรม (Nanodrop, Thermo electron corporation, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Sigma, 101; Western Germany)
- เครื่องปั่นไฟฟ้า (Vortex, Genie2; Scientific Industries, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge; Hero lab, Microcen 13, Hero Lab GmbH, Germany)
- เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer, BOECO, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast light microscope, Nikon, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction; PCR, PCR system Tpersonal, Biometra)
- เครื่องแยกปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน (Horizontal Electrophoresis apparatus)
- เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ (Real-time Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR, Mini Opticon™ Real-time PCR, BIO-RAD, Singapore)
- เครื่อง FACS caliber™ flow cytometer ด้วยโปรแกรม CellQuest™ software (FACSCalibur regarding the CellQuest software (BD Bioscience))
- เครื่องชั่งไฟฟ้า (Analytical balance)
- เครื่องควบคุมสภาวะพร้อมออกซิเจน (Modular incubator chamber, Billups-Rothenberg, CA, USA)
- เครื่องวัดระดับออกซิเจน (Oxygen detector)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette, Lio lab, USA)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube, Axygen, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube, Axygen, USA)
- ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปตขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (disposable pipette tip, Axygen, USA)
- จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35, 60 และ 100 มิลลิเมตร (35, 60 and 100 mm. plate, Corning, USA)
- จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 และ 24 หลุม (6 and 24-wells plate, Corning, USA)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30

เซลล์ head and neck squamous cell carcinoma ชนิด HN-30 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่พบได้บริเวณหลอดอาหาร เพาะเลี้ยงใน dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% FBS 1% Ab/Am และ 1% L-glu ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ 95% humidity และทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

3.2.2 การวัดค่าความเป็นพิษของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

ใช้เพื่อตรวจสอบค่าความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี MTT assay และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 12 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 3.0×10^5 เซลล์ เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM ที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 , 95% humidity เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 2) เติมนสารโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 100, 200, 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 , 95%humidity
- 3) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 500 ไมโครลิตร
- 4) เติมนสารละลายเอ็มทีทีที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที
- 5) ดูดสารละลายเอ็มทีทีทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 500 ไมโครลิตร
- 6) เติมนสารละลายสำหรับละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น (glycine buffer และ DMSO) หลุมละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้สีละลายเข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

3.2.3 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน *ซีดี-44*, *ซีดี-105*, *ซีดี-133*, *ออกซ์-4* และ *นานอก* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ใช้เพื่อตรวจสอบผลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *CD-44*, *CD-105*, *CD-133*, *Oct-4* และ *Nanog* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์ นอกจากนี้ยังตรวจสอบการแสดงออกของ *VEGF* ซึ่งเป็น HIF- α targeted gene เพื่อเป็นการยืนยันว่าในภาวะดังกล่าวโคบอลต์คลอไรด์สามารถจำลองภาวะพร่องออกซิเจนโดยยับยั้งการสลายตัวของ HIF- α โดยใช้วิธี RT-PCR ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำเซลล์ชนิด HN-30 มาทำการทดสอบต่อ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 5.0×10^5 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM ที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 , 95%humidity เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- 2) บ่มเซลล์ในสภาวะปกติ (อุณหภูมิ 37°C, 5%CO₂, 95%humidity) หรือบ่มในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง
- 3) นำเซลล์มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol reagent
- 4) วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
- 5) นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcribed เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription system
- 6) นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ และใช้ยีน 18S เป็น internal control เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณของ RNA ตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน
- 7) แสดงผลโดยการทำ gel electrophoresis และบันทึกภาพด้วย fluorescence microscope เพื่อวิเคราะห์ผลจากความเข้มของแถบ DNA

3.2.4 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน *ซีดี-44*, *ซีดี-105*, *ซีดี-133*, *ออกซ์-4* และ *นานอก* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ใช้เพื่อตรวจสอบผลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *CD-44*, *CD-105*, *CD-133*, *Oct-4* และ *Nanog* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยดีเฟอรอกซามีน นอกจากนี้ยังตรวจสอบการแสดงออกของ *VEGF* ซึ่งเป็น HIF- α targeted gene เพื่อเป็นการยืนยันว่าในภาวะดังกล่าวดีเฟอรอกซามีนสามารถจำลองภาวะพร่องออกซิเจนโดยยับยั้งการสลายตัวของ HIF- α โดยใช้วิธี RT-PCR ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำเซลล์ชนิด HN-30 มาทำการทดสอบต่อ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 5.0×10^5 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM ที่อุณหภูมิ 37°C, 5%CO₂, 95%humidity เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) บ่มเซลล์ในสภาวะปกติ (อุณหภูมิ 37°C, 5%CO₂, 95%humidity) หรือบ่มในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำโดยดีเฟอรอกซามีน 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง
- 3) นำเซลล์มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol reagent
- 4) วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
- 5) นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcribed เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription system

- 6) นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดยการทำให้ qRT-PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีนต่างๆและใช้ยีน *18S* เป็น internal control

3.2.5 การยืนยันผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลต่อการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน *ซีดี-44*, *ซีดี-105*, *ซีดี-133*, *ออกซ์-4* และ *นานอก* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ใช้เพื่อยืนยันผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลต่อการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่พบการกวดการแสดงออกซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี qRT-PCR ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำเซลล์ชนิด HN-30 มาทำการทดสอบต่อ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 5.0×10^5 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM ที่อุณหภูมิ 37°C , $5\% \text{CO}_2$, $95\% \text{humidity}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) เติมสารทดสอบสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 หรือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนเติมสารเหนี่ยวนำภาวะเสมือนพร่องออกซิเจน 1 ชั่วโมง
- 3) บ่มเซลล์ในสภาวะปกติ (อุณหภูมิ 37°C , $5\% \text{CO}_2$, $95\% \text{humidity}$) หรือบ่มในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีน 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำเซลล์มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol reagent
- 4) วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
- 5) นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcribed เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription system
- 6) นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดยการทำให้ qRT-PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีนต่างๆและใช้ยีน *18S* เป็น internal control

3.2.6 การวัดผลของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลที่กระทำต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน *ซีดี-44* และ *ซีดี-105* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนด้วยวิธี Flow cytometry

- 1) เพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30 ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยปริมาณเซลล์จานละ 5.0×10^5 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM โดยทดสอบด้วย 0.1% DMSO หรือสารเรสเวอรา

ทรอลและออกซิเรสเวราทรอล 5 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงที่สภาวะถูกเหนี่ยวนำโดยโคบอลต์ คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีน 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2) นำเซลล์มาบ่มด้วยโมโนโครนัลแอนติบอดีและเนกาทีฟคอนโทรลแอนติบอดีที่เป็นตัวบ่งชี้ คือ mouse anti-human *CD-44* 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (BD Biosciences Pharmingen) และ mouse anti-human *CD-105* 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (BD Biosciences Pharmingen) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3) นำเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย FAC buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร

4) บั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 2000 รอบ ดูดสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำเติมอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดสารละลายเติมทิ้งและเติมสารละลาย FAC buffer หลอดละ 300 ไมโครลิตร

5) วิเคราะห์ผลการแสดงออกระดับโปรตีนด้วย Becton Dickinson FACScan flow cytometer

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับเบสของยีนที่ใช้ในการทดลอง	Primer sequences
<i>18S</i>	For : 5'-GTGATGCCCTTAGATGTCC-3' Rev : 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGC-3'
<i>CD-44</i>	For : 5'-AGAAGGTGTGGGCAGAAGAA-3' Rev : 5'-AAATGCACCATTTCTGAGA-3'
<i>CD-105</i>	For : 5'-TGTCTCACTTCATGCCTCCAGCT-3' Rev : 5'-AGGCTGTCCATGTTGAGGCAGT-3'
<i>CD-133</i>	For : 5'-TCTTGACCGACTGAGACCCAAC-3' Rev : 5'-ACTTGATGGATGC ACCAAGCAC-3'
<i>Oct-4</i>	For : 5'-CCTGAAGCAGAAGAGGATCA-3' Rev : 5'-CCGCAGCTTACACATGTTCT-3'
<i>Nanog</i>	For : 5'-AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG-3' Rev : 5'-CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG-3'
<i>VEGF</i>	For : 5'-CTTGCTGCTCTACCTCCACCAT-3' Rev : 5'-CACCGCCTCGGCTTGTC-3'

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ (Data Analysis)

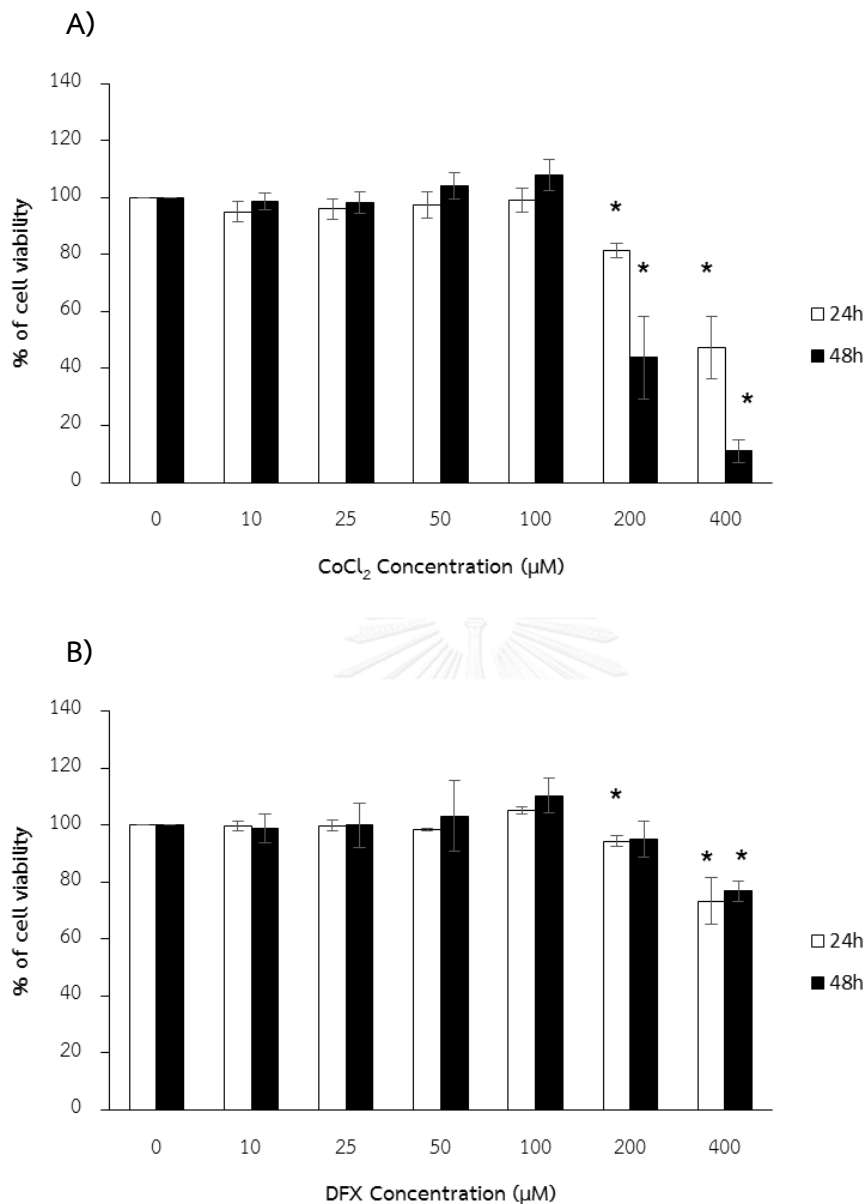
ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองทั้งหมดจะแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูลแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองเป็นรายคู่ด้วยวิธีของบอนเฟอรรินี (Bonferroni) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปไอบีเอ็ม เอสพีเอสเอส เวอร์ชัน 20.0 (IBM SPSS version 20.0, SPSS Inc., USA)



บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์

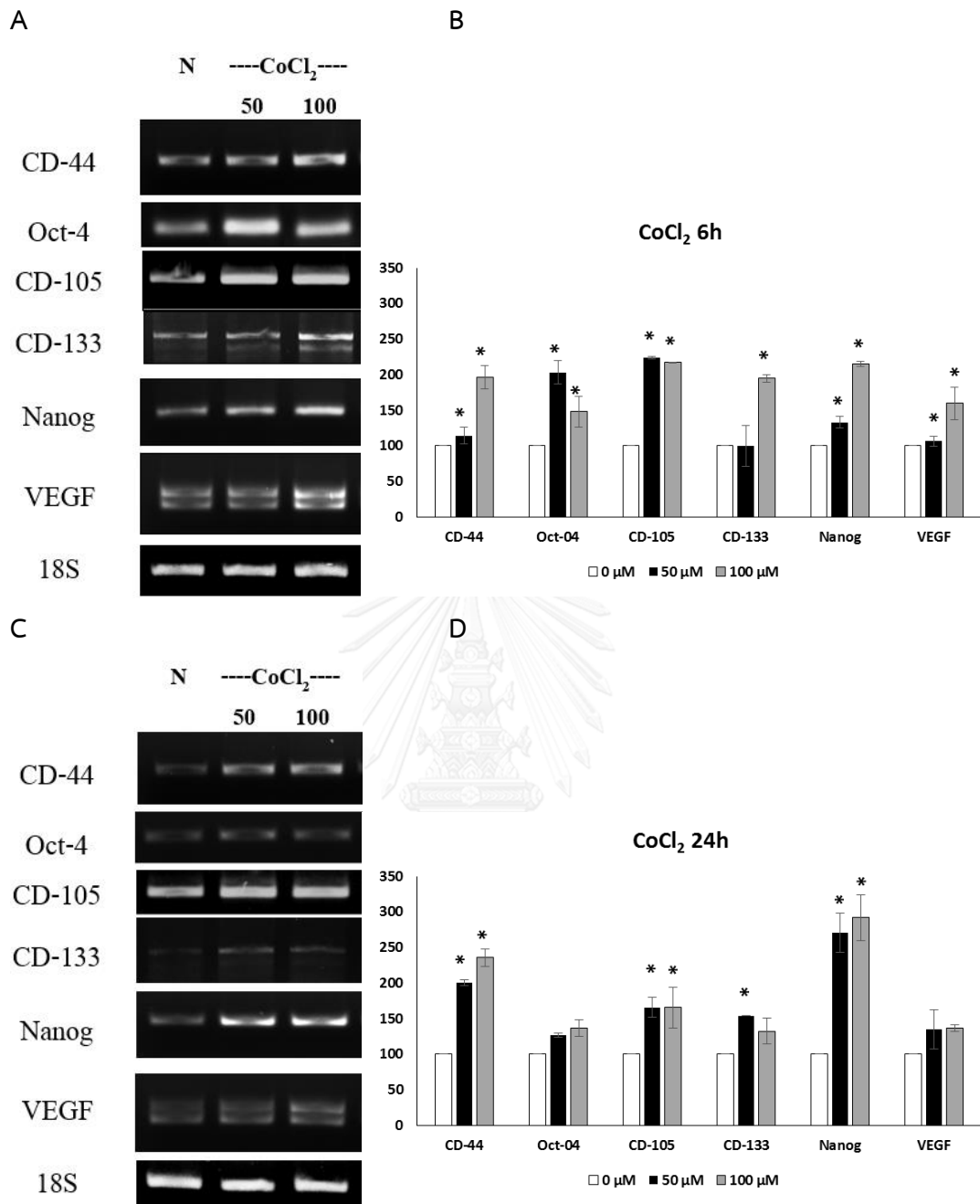
จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของยุวกรณ์และคณะ (Ketkaew et al., 2016) ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ 3 ชนิดได้แก่เซลล์ HSC-3 และ HN-8 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มาจากบริเวณลิ้นและหลอดอาหาร ส่วนชนิด HN-30 เป็นเซลล์มะเร็งที่มาจากบริเวณคอหอย พบว่าเซลล์ HN-30 สามารถตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ดีที่สุดภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจน ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงเลือกทำการศึกษาในเซลล์ชนิดนี้ เซลล์ HN-30 จะถูกบ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์หรือดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 10, 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที จากผลการทดลองในภาพที่ 4.1A แสดงให้เห็นว่าการใส่สารโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการใส่สารโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200-400 ไมโครโมลาร์และบ่มเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ลดความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1A) ผลที่คล้ายคลึงกันพบได้ในการทดลองด้วยดีเฟอรอกซามีน กล่าวคือดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีผลลดความมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 200-400 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.1B) อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับโคบอลต์คลอไรด์แล้วพบว่าดีเฟอรอกซามีนมีความเป็นพิษที่น้อยกว่า โดยเซลล์ที่ได้รับโคบอลต์คลอไรด์มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการให้ดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 200-400 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.1) จากผลการทดลองที่ได้ ผู้วิจัยจึงเลือกทำการศึกษาโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้นที่ 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.1 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ (A) และดีเฟอรอกซามีน (B) ต่อความอยู่รอดของเซลล์ โดย ใช้วิธีเอ็มทีทีในการวิเคราะห์เซลล์ HN-30 ถูกบ่มด้วยสารโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีน ที่ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 100, 200 หรือ 400 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง *เทียบกับความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนที่ 0 ไมโครโมลาร์ แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ $p \leq 0.05$

4.2 ผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

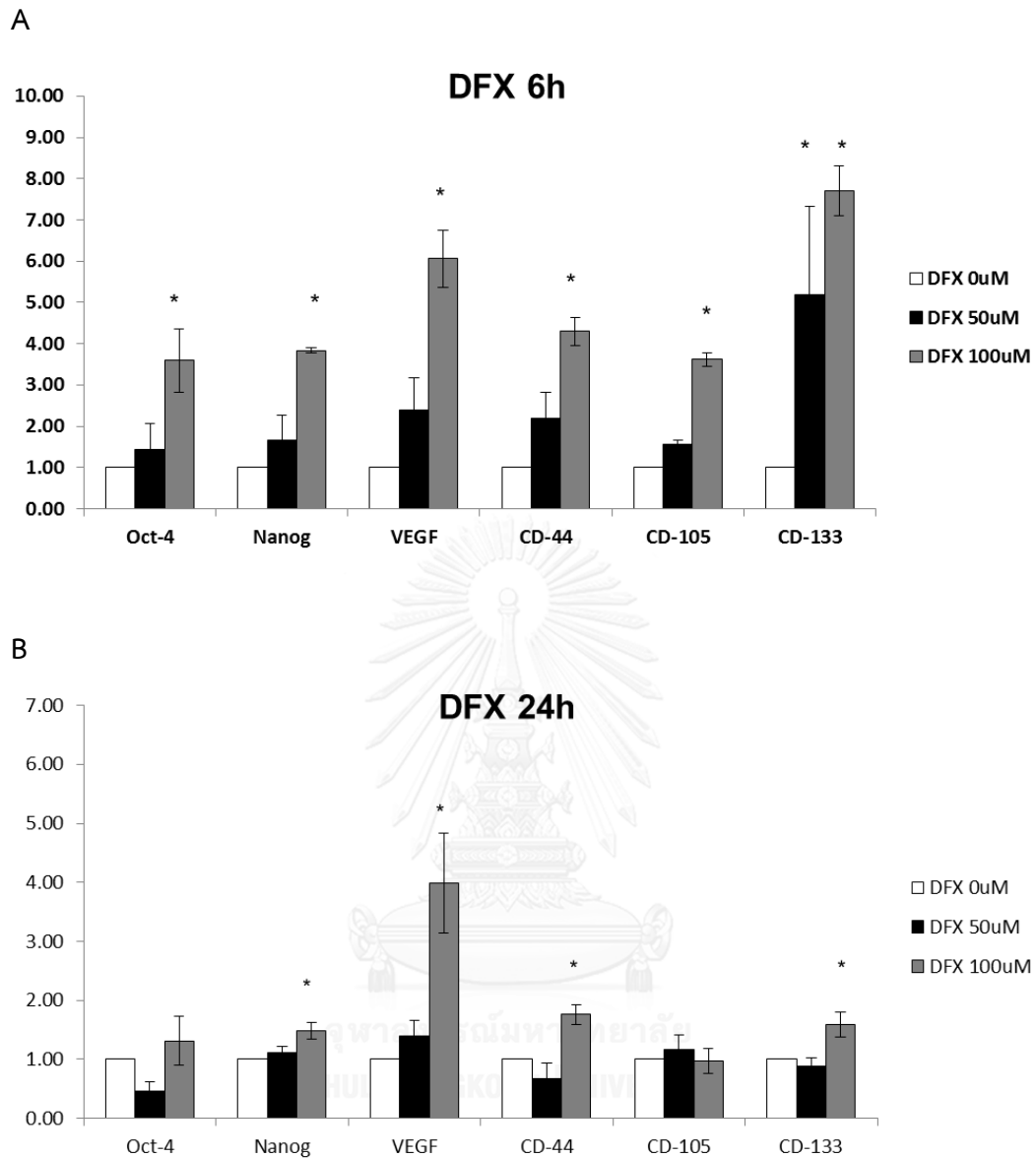
การทดลองนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาถึงความสามารถของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยการบ่มเซลล์ HN-30 ด้วยโคบอลต์คลอไรด์หรือดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นระยะเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาการแสดงออกของยีน *วีสจีโอฟ* เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า *วีสจีโอฟ* เป็นยีนเป้าหมายของ ฮีพ-อัลฟาร์ และจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในภาวะพร่องออกซิเจน (Liang et al., 2008) การทดสอบผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนของ *ออกซ์-4* *นانون* *ซีดี-44* *ซีดี-105* และ *ซีดี-133* รวมถึง *วีสจีโอฟ* ในเซลล์ที่บ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ทั้งที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาที่เวลา 6 ชั่วโมงพบว่าโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนต่างๆ ได้ดีกว่าที่ 50 ไมโครโมลาร์ ยกเว้น *ออกซ์-4* (ภาพที่ 4.2A) ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคบอลต์คลอไรด์ทั้งที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *นانون* *ซีดี-44* และ *ซีดี-105* ได้ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.2C) สอดคล้องกับการศึกษาในเชิงปริมาณของยีนต่างๆ โดยโปรแกรมไบโอโปรไฟล์ (Bioprofil, Vilber Lourmat Inc., Germany) (ภาพที่ 4.2B และ 4.2D)



ภาพที่ 4.2 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์ HN-30 ที่เติมสารโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 50 และ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 (A) และ 24 (C) ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และศึกษาเชิงปริมาณของยีนต่างๆโดยโปรแกรมไบโอโปรฟิล ที่ 6 (B) และ 24 ชั่วโมง (D) *โดยใช้ยีน 18 เอส เป็นยีนควบคุม แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ $p \leq 0.05$

สำหรับผลของสารดีเฟอรอกซามีนต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนั้น ผู้วิจัยทำการทดลองด้วยเทคนิค Real-time ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูงกว่า และใช้ *วี้จีไอเอฟ* เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกเช่นกัน ผลการทดลองที่ได้พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ *ออกซ์-4* *นานอก* *ซีดี-44* *ซีดี-105* และ *ซีดี-133* รวมถึง *วี้จีไอเอฟ* ในเซลล์ที่บ่มด้วยดีเฟอรอกซามีน ทั้งที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.3A) สำหรับที่เวลา 24 ชั่วโมง พบการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *นานอก* *ซีดี-44* *ซีดี-133* และ *วี้จีไอเอฟ* ที่ดีเฟอรอกซามีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เท่านั้น (ภาพที่ 4.3B) เนื่องจากการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ที่บ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง นั้นชัดเจนกว่าที่ 24 ชั่วโมง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการบ่มเซลล์ 6 ชั่วโมง ในการทดลองต่อไป

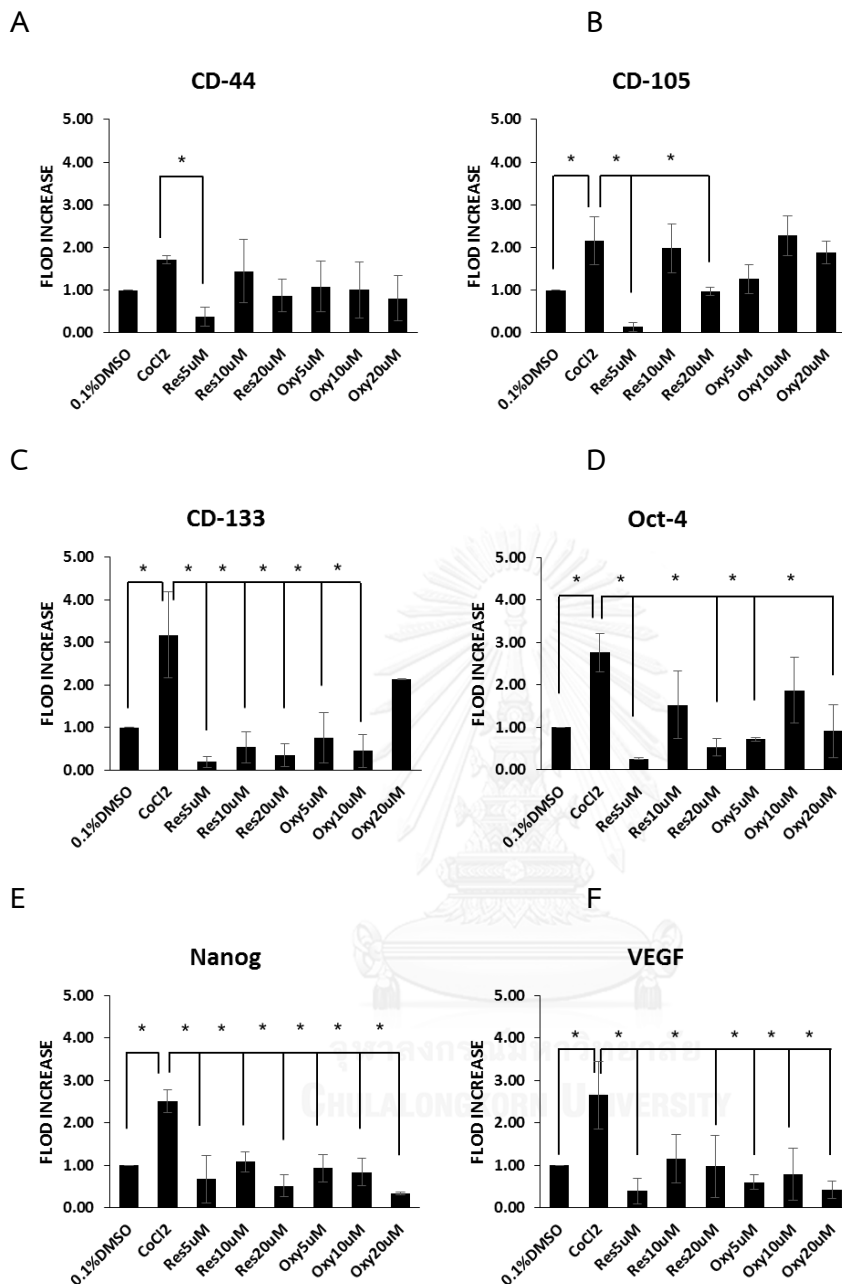




ภาพที่ 4.3 ผลของดีเฟอรอกซามีนต่อการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์ HN-30 ที่เติมสารดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 0 50 และ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 (A) และ 24 (B) ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Real-time RT-PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ *โดยใช้ยีน 18 เอส เป็นยีนควบคุม แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ $p \leq 0.05$

4.3 สารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของ ออกซ์-4 นานอก ซิติ-44 ซิติ-105 ซิติ 133 และ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด ภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนด้วยโคบอลต์คลอไรด์หรือดีเฟอรอกซามีน

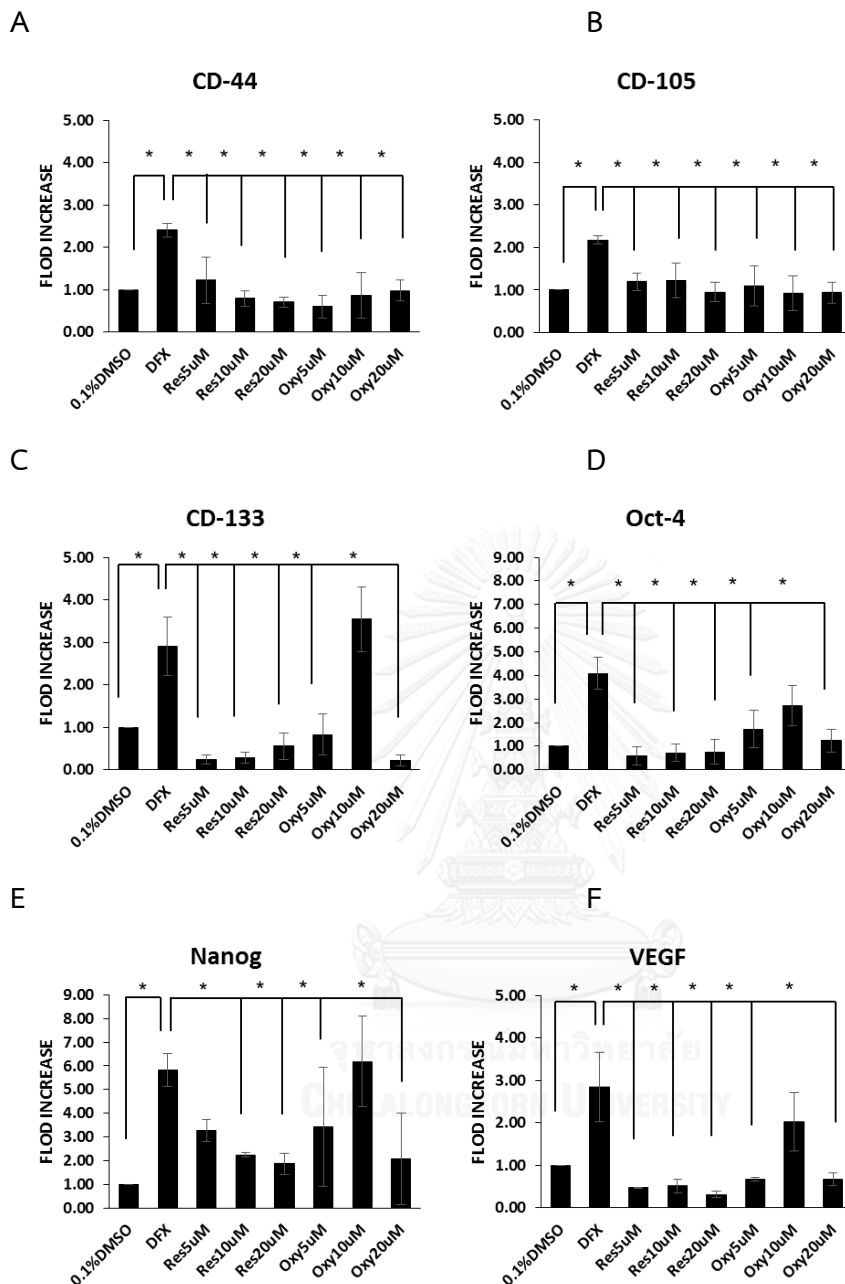
ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารเรสเวอราทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลในการยับยั้ง การแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนั้น ผู้วิจัยนำเซลล์ HN-30 มาบ่ม ด้วยสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็น ระยะเวลา 30 นาที ก่อนการเติมโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และบ่มเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์พบว่า สารเรสเวอรา ทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของ ซิติ-44 ซิติ-105 ซิติ- 133 ออกซ์-4 และ นานอก รวมถึง วิอีจีเอฟ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการทดลองพบว่าสาร เรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของ ทุกยีนที่กล่าวมาข้างต้น โดยสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆได้ดีที่สุด ส่วนกลุ่มทดลองเติมสารออกซิเรสเวอราทรอลพบว่า ออกซิ เรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของ ซิติ-133 ออกซ์-4 นานอก และ วิอีจีเอฟ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.4) ที่น่าสนใจคือทั้งสารเรสเวอรา ทรอลและออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้นต่ำคือที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพใน การกวดการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆ มากกว่าที่ความ เข้มข้นสูง (ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์) กล่าวได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออก ของสารทดสอบไม่แปรผันตามความเข้มข้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโดยภาพรวมสารเรสเวอราทรอล มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆมากกว่าสารออกซิเรสเวอราทรอล



ภาพที่ 4.4 ผลของสารเรสเวราทรอลและสารออกซิเรสเวราทรอล ต่อการแสดงออกของยีน

มาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆที่อยู่ในภาวะเสมือนพร่องออกซิเจน เซลล์ HN-30 จะถูกบ่มด้วยสารเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ หรือสารออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ จากนั้น บ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง การแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอถูกตรวจวัดด้วยเทคนิค Real-time PCR. : Res; resvertol Oxy; oxyresvertol. *เทียบกับ 0.1% DMSO เป็นตัวควบคุม แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ $p \leq 0.05$

ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเพอรอกซามีน ซึ่งเป็นสารอีกชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนได้ พบว่าสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของ *ซีดี-44* *ซีดี-105* *ซีดี-133* *ออกซ์-4* และ *นانون* รวมถึง *วีอีจีเอฟ* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของทุกยีนที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนในกลุ่มทดลองที่ยับยั้งการแสดงออกด้วยสารออกซีเรสเวอราทรอลพบว่า ออกซีเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของทุกยีนที่กล่าวมาข้างต้น (ภาพที่ 4.5) ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับผลการทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยโคบอลต์ กล่าวคือทั้งสารเรสเวอราทรอลและออกซีเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้นต่ำคือที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการกวดการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆ มากกว่าที่ความเข้มข้นสูง (ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์) กล่าวได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของสารทดสอบไม่แปรผันตามความเข้มข้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโดยภาพรวม สารเรสเวอราทรอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆมากกว่าสารออกซีเรสเวอราทรอลเช่นเดียวกับการทดลองที่เหนี่ยวนำภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนด้วยโคบอลต์คลอไรด์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในการทดลองต่อไป



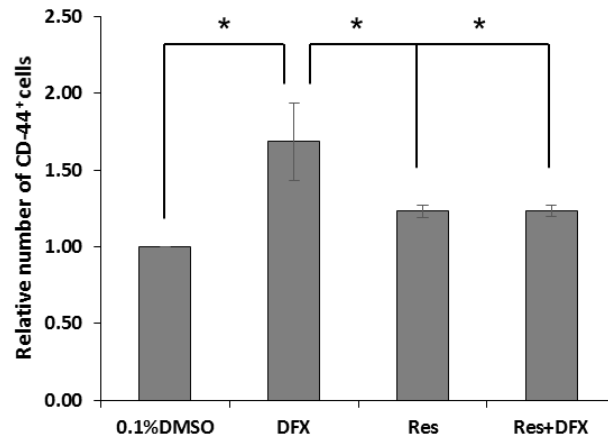
ภาพที่ 4.5 ผลของสารเรสเวราทรอลและสารออกซิเรสเวราทรอล ต่อการแสดงออกของยีน

มาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆที่อยู่ในภาวะเสมือนพร้อมออกซิเจน เซลล์ HN-30 จะถูกบ่มด้วยสารเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ หรือสารออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ จากนั้น บ่มด้วยดีเฟอโรซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง การแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอจะตรวจวัดด้วยเทคนิค Real-time PCR. : Res; resvertol Oxy; oxyresvertol. *เทียบกับ 0.1% DMSO เป็นตัวควบคุม แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ $p \leq 0.05$

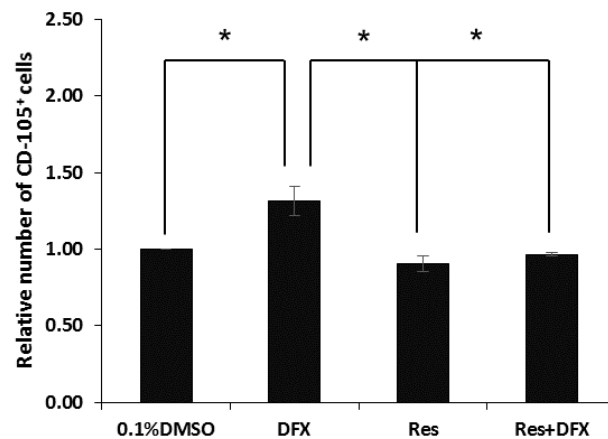
4.4 สารเรสเวอราทรอลมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-44 และ ซีดี-105 ในภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเฟอรอกซามีน

จากการทดลองที่ผ่านมาผู้วิจัยได้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารเรสเวอราทรอลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าสารออกซิเรสเวอราทรอล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารเรสเวอราทรอลในการศึกษาประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ผู้วิจัยเลือกศึกษาในมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดที่แสดงออกบริเวณผิวเซลล์ (Cell Surface Markers) คือ ซีดี-44 และ ซีดี-105 โดยนำเซลล์ HN-30 บ่มด้วยสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ ซีดี-44 และ ซีดี-105 ได้ดี จากนั้นนำเซลล์ข้างต้นมาจำลองภาวะเสมือนพร้อมออกซิเจน โดยการเติมสารดีเฟอรอกซามีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดผลการทดลองด้วยเทคนิค Flow Cytometry ผลการทดลองที่ได้พบว่าสารดีเฟอรอกซามีนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-44 (ภาพที่ 4.6A) และเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-105 (ภาพที่ 4.6B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลที่พบในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ การเติมสารเรสเวอราทรอลเพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-44 (ภาพที่ 4.6A) และเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-105 (ภาพที่ 4.6B) เมื่อเทียบกับภาวะระดับออกซิเจนปกติ แต่จะสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-44 (ภาพที่ 4.6A) และเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ซีดี-105 (ภาพที่ 4.6B) ได้ในภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารดีเฟอรอกซามีน

A



B



ภาพที่ 4.6 ผลของสารเรสเวอราทรอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของของ ยีน ซีดี-44 และ ซีดี-105 ที่บริเวณผิวเซลล์ ในภาวะเสมือนพร่องออกซิเจน เซลล์ HN-30 ถูกบ่มด้วยเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ แล้วบ่มต่อด้วยทีเฟอร์ ออกซามีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง การแสดงออกใน ระดับโปรตีนจะตรวจวัดด้วยเทคนิค Flow cytometry : DFX; deferoxamine Res; resvertol *เทียบกับ 0.1% DMSO เป็นตัวควบคุม แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและความ เบี่ยงเบนมาตรฐานที่ $p \leq 0.05$

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การรักษามะเร็งในปัจจุบันยังคงเป็นสิ่งท้าทายเป็นอย่างมาก สาเหตุหนึ่งที่สำคัญของการรักษาที่ไม่ได้ผลนั้นเกิดจากการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรค อันเนื่องมาจากการคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยในก้อนมะเร็ง แต่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและก่อให้เกิดก้อนมะเร็งใหม่สูง (Tannishtha et al., 2001) อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการดื้อยาและด้านการตายแบบอะพอพโตซิส เป็นผลให้เซลล์มะเร็งยังคงอยู่รอดต่อไปได้ (Jin et al., 2010) ดังนั้นการพัฒนารูปแบบหรือสารใหม่ๆ ในการรักษาโรคนั้นควรมุ่งเป้าในการฆ่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งด้วย

การอยู่รอดของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ตัวเซลล์จะต้องอาศัยอยู่ในภาวะแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตด้วย ภาวะนั้นเรียกว่า นิชของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งมีบทบาทในการรักษาคุณสมบัติเฉพาะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น การแบ่งตัวทดแทนตนเอง การแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น การแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ เป็นต้น ตัวอย่างนิชที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ วัสคูลาร์นิช (Yi-Fang Ping et al., 2015) รวมถึง ภาวะพร่องออกซิเจน ซึ่งจัดเป็นนิชที่สำคัญมากต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Li et al., 2010) พบได้ในมะเร็งที่มีลักษณะเป็นก้อนทุกชนิด เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การสร้างหลอดเลือดมีขนาดไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหรือมีลักษณะผิดปกติ ทำให้บริเวณแกนกลางก้อนมะเร็งขาดสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยง เกิดเป็นภาวะพร่องออกซิเจน ซึ่งเป็นภาวะที่ระดับออกซิเจนลดลงจากสภาวะปกติ ภาวะดังกล่าวมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มากขึ้น กระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ และส่งผลให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาเคมีบำบัดในที่สุด (Keith et al., 2007) การศึกษาของ Das และคณะ (2008) พบว่าภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนประชากรกลุ่มย่อยที่มีความสามารถในการก่อมะเร็ง และส่งผลให้ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด *ออกซ์-4* ในประชากรกลุ่มดังกล่าวอีกด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ketkaew (2016) ซึ่งพบว่าภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอได้

การศึกษาภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่เป็นนิยมคือการใช้อุปกรณ์ เช่น Hypoxic chamber ร่วมกับเครื่องวัดระดับออกซิเจน เพื่อจำลองระดับออกซิเจนในบรรยากาศ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากไม่สามารถ

เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ในภาวะพร่องออกซิเจนได้ ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการใช้ Hypoxia Incubator Glove Chamber เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ในตัว Incubator ที่ควบคุมบรรยากาศให้เป็นภาวะพร่องออกซิเจนได้ แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกใช้อีกวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการศึกษาภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการคือการจำลองด้วยสารเคมีซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกสามารถเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ได้ง่าย สารโคบอลท์คลอไรด์เป็นหนึ่งในสารที่ยอมรับใช้ในทดลองในปัจจุบัน ทำหน้าที่จำลองภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนโดยทำให้เกิดการคงอยู่ของ ฮีฟ-อัลฟาร์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกในภาวะพร่องออกซิเจน โดยโคบอลท์ไอออนมีคุณสมบัติในการเข้าจับกับเอนไซม์พีเอชดีที่ตำแหน่งไฮดรอกซีเมทิลไลซีน (Epstein et al., 2001; Yong et al., 2003) และเข้าจับกับ ฮีฟ-อัลฟาร์ โดยตรงที่ตำแหน่งออกซิเจนดีเพนเดนซ์ทีเกรเดชันโดเมน เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการทำลาย ฮีฟ-อัลฟาร์ โดยโปรตีนเอโซม (Yong et al., 2003) ส่วนสารอีกชนิดที่นิยมนำมาทำการทดลองคือสารดีเฟอรอกซามีนซึ่งมีสมบัติเป็นไฮดรอกซีเลเทอร์ โดยสารดีเฟอรอกซามีนจะเข้าไปแย่งจับกับเหล็ก (Keberle, 1964) ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์โพรลิวไฮดรอกซีเลส ทำให้เอนไซม์นี้สูญเสียการทำงาน ไม่สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้ ฮีฟ-อัลฟาร์ได้ ส่งผลให้ ฮีฟ-อัลฟาร์ ไม่ถูกย่อยสลายโดยโปรตีนเอโซมเช่นกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Woo และคณะซึ่งพบว่าปริมาณไอออนอิสระของเหล็กที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์แปรผกผันกับปริมาณของ ฮีฟ-อัลฟาร์ (Woo et al., 2006)

การทดสอบความเข้มข้นของโคบอลท์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ HN-30 พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 100 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Triantafyllou และคณะ (2006) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ฮีฟ-อัลฟาร์ ในเซลล์เฮลาร์ ด้วยสารโคบอลท์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีน พบว่าความเข้มข้นของทั้งโคบอลท์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนที่ใช้ทดลองกับเซลล์มะเร็ง ควรอยู่ที่ประมาณ 50-200 ไมโครโมลาร์ โคบอลท์ถือเป็นโลหะที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถลดความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากหนูและทำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิสได้เมื่อใช้ในความเข้มข้นสูง (Lee et al., 2013) ส่วนความเข้มข้นของดีเฟอรอกซามีนที่ 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดประสาท สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Milosevic et al., 2009) ซึ่งจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้พบว่า ความเข้มข้นของโคบอลท์คลอไรด์ที่ 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ HN-30 ลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้มากกว่าดีเฟอรอกซามีน จึงอาจสรุปได้ว่าสารโคบอลท์คลอไรด์มีความเป็นพิษสูงกว่าสารดีเฟอรอกซามีน

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยคาดว่าสารโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนน่าจะเหนี่ยวนำการ แสดงออกของยีนต่างๆผ่านทางกลไกการคงสภาพ ฮิพ-อัลฟาร์ จึงทำการยืนยันผลโดยวัดการ แสดงออกของ *วีสจีเอฟ* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของ ฮิพ-อัลฟาร์ และมีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง (Plate et al., 1992) ทำให้เซลล์มะเร็งปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในภาวะ พร่องออกซิเจนและเกิดการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรคได้ การศึกษาในเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดส แควมัสพบว่ายีน *วีสจีเอฟ* มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนภายใต้ ภาวะพร่องออกซิเจน (Liang et al., 2008) ในการศึกษาที่พบว่าทั้งโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *วีสจีเอฟ* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wahl และคณะ (2016) ซึ่งได้ทำการทดลองในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดมีเซนไคมอลพบว่าการ แสดงออกของยีน *วีสจีเอฟ* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารดีเฟอรอกซามีน

งานวิจัยก่อนหน้าของ Ketkaew และคณะ (2016) ซึ่งทำการจำลองภาวะพร่องออกซิเจน ด้วย Hypoxic chamber พบว่าภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การ มีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ *ซีดี-44* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการระบุการมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด มะเร็งศีรษะและลำคอ (Kokko et al., 2011; Pries et al., 2008) *ซีดี-105* เป็นยีนที่เหนี่ยวนำให้เกิด การสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Duff et al., 2003; Gomez-Esquer et al., 2004; Takase et al., 2010) และยังเป็นยีนที่บ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่โตด้วย (Bussolati et al., 2008) รวมถึง *ซีดี-133* *นานอก* และ *ออกซ์-4* ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ ต้นกำเนิดมะเร็งช่องปาก (Chiou et al., 2008) ในเซลล์ HN-30 ได้ดี ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าทั้งโค บอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเหล่านี้เช่นกัน ทั้งนี้ โคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนจำลองภาวะพร่องออกซิเจนโดยการคงสภาพ ฮิพ-อัลฟาร์ จึง อาจจะเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีนมาตรฐานบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเหล่านี้เกิดผ่าน ฮิพ-อัลฟาร์ อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Ketkaew (2016) พบการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน ดังกล่าวภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจนนั้นเกิดขึ้นที่ 6 และ 24 ชั่วโมงขึ้นกับชนิดของยีน ส่วนงานวิจัยนี้ พบว่าผลการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่างๆด้วยโคบอลต์คลอไรด์ ได้ผลเหมือนการ เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่างๆด้วย Hypoxic chamber ในงานวิจัยของ Ketkaew (2016) ทั้งชนิดของยีนและระยะเวลาที่ทำให้ยีนแสดงออก ในขณะที่ดีเฟอรอกซามีนพบการแสดงออก ของยีนดังกล่าวที่ 6 ชั่วโมง มากกว่าที่ 24 ชั่วโมง อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของดีเฟอรอกซามีนที่ ใช้ในการทดลองนี้เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะพร่องออกซิเจนที่แตกต่างจากงานวิจัยของ Ketkaew (2016) ซึ่งทำการศึกษาในปริมาณออกซิเจนเข้มข้น 0.5-1% นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังพบการแสดงออกที่ เพิ่มขึ้นของ *ซีดี-133* ซึ่งมีความสามารถในการเพิ่มการสร้างโคโลนี เป็นผลให้เกิดการสร้างก้อนมะเร็ง

และยังมีความสามารถในการก่อกำเนิดมะเร็งของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ (Chiou et al., 2008) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bauer และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าโคบอลต์คลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *ซีดี-44* และ *ซีดี-133* ในซีโนกราฟทิซเซลล์มะเร็งตับอ่อนของมนุษย์ที่ปลูกถ่ายไปยังตัวอ่อนของไก่ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนดังกล่าวถือเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการทำนายการรักษาโรค โดยมีการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของ *ซีดี-133* *นานอก* และ *ออกซ์-4* สัมพันธ์กับการดื้อยาซิสพาทินในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณช่องปาก (Tsai et al., 2011)

สมุนไพรถือเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการพัฒนายาชนิดใหม่ๆ ในงานวิจัยนี้ต้องการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยผู้วิจัยสนใจศึกษาสารเรสเวอราทรอลซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอลิกและมีบทบาทสำคัญทั้งในเชิงการรักษาและป้องกันโรคมะเร็ง (Aggarwal et al., 2004) นอกจากฤทธิ์ดังกล่าวแล้ว การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HN-30 (Sintuyanon et al., 2014) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ *ซีดี-44* *ซีดี-105* *ซีดี-133* *ออกซ์-4* *นานอก* และ *วีสทีเจฟ* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของสารเรสเวอราทรอลนี้น่าจะเกิดผ่าน อิฟ-อัลฟาร์ เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการทำงานของ อิฟ-อัลฟาร์ ผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ mitogen-activated protein kinases (MAPKs) IKK kinase (IKK) และ protein kinase C (PKC) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Bishayee, 2009; Varoni et al., 2016) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาผลของเรสเวอราทรอลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตับอ่อนในมนุษย์และหนู ซึ่งพบว่าสารเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการแบ่งตัวทดแทนตัวเองและเพิ่มการตายแบบอะพอโทสิส อีกทั้งยังยับยั้งการแสดงออกของ *นานอก* และ *ออกซ์-4* (Shankar et al., 2011) นอกจากนี้สารเรสเวอราทรอลยังสามารถเหนี่ยวนำกระบวนการตายแบบอะพอโทสิสและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมได้อีกด้วย (Pandey et al., 2011) ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ของสารออกซิเรสเวอราทรอลซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเรสเวอราทรอล (Sun H. Y. et al., 2010) มีความใกล้เคียงกับผลที่ได้จากสารเรสเวอราทรอล กล่าวคือสารออกซิเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของ *ซีดี-44* *ซีดี-105* *ซีดี-133* *ออกซ์-4* *นานอก* และ *วีสทีเจฟ* ภายใต้ภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์และดีเฟอรอกซามีนได้ ถึงแม้ว่าสารออกซิเรสเวอราทรอลไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *ซีดี-44* และ *ซีดี-105* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองโดยรวมสารออกซิเรสเวอราทรอลมีแนวโน้มที่จะกีดกันการแสดงออกของยีนทั้งสองได้เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

ต่างๆของทั้งเรสเวราทรอลและออกซิเรสเวราทรอลพบว่า สารเรสเวราทรอลมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงกว่าสารออกซิเรสเวราทรอล อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าสารออกซิเรสเวราทรอลมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งมากกว่าสารเรสเวราทรอล (Lorenz et al., 2003; Nasapon P. et al., 2010; Wang et al., 2011) และมากกว่าถึง 2 เท่าในงานวิจัยของ Nasapon และคณะ (2010) แต่ประสิทธิภาพดังกล่าวเป็นประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีฤทธิ์ในเชิงการป้องกันการเกิดก่อมะเร็ง ทั้งนี้ในปัจจุบันการศึกษาผลของสารออกซิเรสเวราทรอลต่อเซลล์มะเร็งยังมีอยู่อย่างจำกัด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาที่มากขึ้นในอนาคตถึงฤทธิ์ของออกซิเรสเวราทรอลในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นรวมถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งอื่นๆ เช่น การเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส การต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การทำลายเซลล์มะเร็งของสารออกซิเรสเวราทรอล เป็นต้น

ที่น่าสนใจคือทั้งสารเรสเวราทรอลและออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้นต่ำคือที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการกวดการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆมากกว่าที่ความเข้มข้นสูง (10 และ 20 ไมโครโมลาร์) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารเรสเวราทรอลและออกซิเรสเวราทรอลไม่ได้แปรผันตามความเข้มข้น แต่ละช่วงความเข้มข้นน่าจะมีความจำเพาะต่อกลไกต่างๆของเซลล์ที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mukherjee และคณะ (2010) ซึ่งได้ศึกษาการแสดงออกของ *p-Akt Bcl2* และ *Ref-1* ซึ่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความอยู่รอดของเซลล์หลอดเลือดใหญ่พบว่า สารเรสเวราทรอลขนาดต่ำมีผลไปเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวมากกว่าที่ความเข้มข้นสูง โดยสารเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพในการต้านการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ร่างกาย ทำให้หลอดเลือดมีประสิทธิภาพที่ดี เพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความอยู่รอดของร่างกาย รวมถึงต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารก่อมะเร็ง เป็นต้น (Aggarwal et al., 2004; Lee et al., 2006) ในขณะที่สารเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้นสูงคือที่ประมาณ 50 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ โปรตีน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง (In et al., 2006; Trincheri et al., 2008; Trincheri et al., 2007; van Ginkel et al., 2007)

นอกจากสารเรสเวราทรอลจะยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ แล้วยังมีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *ซีดี-44* และ *ซีดี-105* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang และคณะ (2015) ซึ่งพบว่าสารเรสเวราทรอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *ซีดี-44* และ *ซีดี-133* รวมถึงไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และเพิ่มอัตราการตายแบบอะพอพโทซิสของ

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ การที่สารเรสเวอราทรอลสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ซีดี-44 บนผิวเซลล์แสดงให้เห็นว่าสารเรสเวอราทรอลน่าจะมีศักยภาพในการลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งศีรษะและลำคอ ผู้วิจัยคาดว่า การใช้สารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้นต่ำเพื่อลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ร่วมกับการใช้ยาเคมีบำบัดชนิดดั้งเดิมเพื่อไปทำลายเซลล์มะเร็งอื่นๆ น่าจะสามารถช่วยลดขนาดก้อนมะเร็งและป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ โดยควรมีการศึกษาต่อไปในสัตว์ทดลองถึงผลของเรสเวอราทรอลในการยับยั้งการก่อให้เกิดก้อนมะเร็งใหม่ในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

ในด้านความปลอดภัยสำหรับการใช้สารเรสเวอราทรอลนั้น ปัจจุบันยังไม่มีการวิจัยที่รายงานถึงผลข้างเคียงชนิดรุนแรงที่เกิดจากการใช้สารดังกล่าวทั้งในผู้ที่เพิ่งเริ่มใช้สารหรือใช้สารมาแล้วเป็นเวลานาน รวมถึงในสัตว์ทดลอง จึงถือว่าเรสเวอราทรอลเป็นสารที่ค่อนข้างปลอดภัยสำหรับใช้ทั้งในเชิงการรักษาและเชิงเป็นสารเสริมอาหาร (Markus et al., 2008) อย่างไรก็ตามมีการพบอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้สารเรสเวอราทรอล เช่น พบความเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในเลือด ใช้หัวใจ และผื่นที่ผิวหนัง ในคนไข้กลุ่มทดลองที่ได้รับสารเรสเวอราทรอล 400 มิลลิกรัม โดยการให้สารดังกล่าวเพียงครั้งเดียว (Vaz-da-Silva et al., 2008) และยังพบอาการเวียนศีรษะ ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ อ่อนเพลีย ในอาสาสมัครสุขภาพดีที่ได้รับสารเรสเวอราทรอลทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Almeida et al., 2009) ส่วนสารออกซิเรสเวอราทรอลนั้นยังไม่มีการรายงานถึงผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากการศึกษาสารออกซิเรสเวอราทรอลยังไม่เป็นที่แพร่หลายในปัจจุบัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงของสารดังกล่าวต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ต้นกำเนิดปกติ

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้สรุปได้ว่า สารเรสเวอราทรอลและสารออกซีเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและลดจำนวนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ ฤทธิ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองน่าจะทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและกลับมาเป็นซ้ำของก้อนมะเร็ง ผู้วิจัยคาดว่าจากผลดังกล่าว ทั้งสารเรสเวอราทรอลและสารออกซีเรสเวอราทรอล น่าจะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารที่ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคมะเร็งในอนาคตได้





รายละเอียดการวิเคราะห์ทางสถิติ

1 ผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเพอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CoCl₂24h

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
N	9	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000
CoCl ₂ 10uM	9	94.9322	3.71732	1.23911	92.0748	97.7896
CoCl ₂ 25uM	9	96.0133	3.69282	1.23094	93.1748	98.8519
CoCl ₂ 50uM	9	97.4022	4.58670	1.52890	93.8766	100.9279
CoCl ₂ 100uM	9	99.0178	4.44516	1.48172	95.6009	102.4346
CoCl ₂ 200uM	9	81.3089	2.68989	.89663	79.2413	83.3765
CoCl ₂ 400uM	9	47.3711	11.28260	3.76087	38.6985	56.0437
Total	63	88.0065	18.43740	2.32289	83.3631	92.6499

ตารางที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CoCl₂24h

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19453.857	6	3242.310	111.922	.000
Within Groups	1622.282	56	28.969		
Total	21076.140	62			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CoCl₂24h

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	CoCl ₂ 10uM	5.06778	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 25uM	3.98667	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 50uM	2.59778	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 100uM	.98222	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 200uM	18.69111*	2.53725	.000
	CoCl ₂ 400uM	52.62889*	2.53725	.000
CoCl ₂ 10uM	N	-5.06778	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 25uM	-1.08111	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 50uM	-2.47000	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 100uM	-4.08556	2.53725	1.000
	CoCl ₂ 200uM	13.62333*	2.53725	.000

	CoCl2 400uM	47.56111*	2.53725	.000
CoCl2 25uM	N	-3.98667	2.53725	1.000
	CoCl2 10uM	1.08111	2.53725	1.000
	CoCl2 50uM	-1.38889	2.53725	1.000
	CoCl2 100uM	-3.00444	2.53725	1.000
	CoCl2 200uM	14.70444*	2.53725	.000
	CoCl2 400uM	48.64222*	2.53725	.000
CoCl2 50uM	N	-2.59778	2.53725	1.000
	CoCl2 10uM	2.47000	2.53725	1.000
	CoCl2 25uM	1.38889	2.53725	1.000
	CoCl2 100uM	-1.61556	2.53725	1.000
	CoCl2 200uM	16.09333*	2.53725	.000
	CoCl2 400uM	50.03111*	2.53725	.000
CoCl2 100uM	N	-9.98222	2.53725	1.000
	CoCl2 10uM	4.08556	2.53725	1.000
	CoCl2 25uM	3.00444	2.53725	1.000
	CoCl2 50uM	1.61556	2.53725	1.000
	CoCl2 200uM	17.70889*	2.53725	.000
	CoCl2 400uM	51.64667*	2.53725	.000
CoCl2 200uM	N	-18.69111*	2.53725	.000
	CoCl2 10uM	-13.62333*	2.53725	.000
	CoCl2 25uM	-14.70444*	2.53725	.000
	CoCl2 50uM	-16.09333*	2.53725	.000
	CoCl2 100uM	-17.70889*	2.53725	.000
	CoCl2 400uM	33.93778*	2.53725	.000
CoCl2 400uM	N	-52.62889*	2.53725	.000
	CoCl2 10uM	-47.56111*	2.53725	.000
	CoCl2 25uM	-48.64222*	2.53725	.000
	CoCl2 50uM	-50.03111*	2.53725	.000
	CoCl2 100uM	-51.64667*	2.53725	.000
	CoCl2 200uM	-33.93778*	2.53725	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CoCl₂48h

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	9	100.0000	.00000	.00000
CoCl ₂ 10uM	9	98.6356	3.03480	1.01160
CoCl ₂ 25uM	9	98.1289	3.89412	1.29804
CoCl ₂ 50uM	9	104.0500	4.83242	1.61081
CoCl ₂ 100uM	9	108.0889	5.66139	1.88713
CoCl ₂ 200uM	9	43.8278	15.10972	5.03657
CoCl ₂ 400uM	9	11.0300	3.98131	1.32710
Total	63	80.5373	35.72991	4.50155

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CoCl₂48h

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	76559.386	6	12759.898	275.734	.000
Within Groups	2591.460	56	46.276		
Total	79150.846	62			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CoCl₂48h

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	CoCl ₂ 10uM	1.36444	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 25uM	1.87111	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 50uM	-4.05000	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 100uM	-8.08889	3.20680	.305
	CoCl ₂ 200uM	56.17222*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 400uM	88.97000*	3.20680	.000
CoCl ₂ 10uM	N	-1.36444	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 25uM	.50667	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 50uM	-5.41444	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 100uM	-9.45333	3.20680	.098
	CoCl ₂ 200uM	54.80778*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 400uM	87.60556*	3.20680	.000
CoCl ₂ 25uM	N	-1.87111	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 10uM	-.50667	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 50uM	-5.92111	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 100uM	-9.96000	3.20680	.062
	CoCl ₂ 200uM	54.30111*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 400uM	87.09889*	3.20680	.000
CoCl ₂ 50uM	N	4.05000	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 10uM	5.41444	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 25uM	5.92111	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 100uM	-4.03889	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 200uM	60.22222*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 400uM	93.02000*	3.20680	.000
CoCl ₂ 100uM	N	8.08889	3.20680	.305
	CoCl ₂ 10uM	9.45333	3.20680	.098
	CoCl ₂ 25uM	9.96000	3.20680	.062

	CoCl ₂ 50uM	4.03889	3.20680	1.000
	CoCl ₂ 200uM	64.26111*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 400uM	97.05889*	3.20680	.000
CoCl ₂ 200uM	N	-56.17222*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 10uM	-54.80778*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 25uM	-54.30111*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 50uM	-60.22222*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 100uM	-64.26111*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 400uM	32.79778*	3.20680	.000
CoCl ₂ 400uM	N	-88.97000*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 10uM	-87.60556*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 25uM	-87.09889*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 50uM	-93.02000*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 100uM	-97.05889*	3.20680	.000
	CoCl ₂ 200uM	-32.79778*	3.20680	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

DFX24h

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
N	9	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000
DFX 10uM	9	99.6989	1.70377	.56792	98.3893	101.0085
DFX 25uM	9	99.6900	1.94171	.64724	98.1975	101.1825
DFX 50uM	9	98.5611	.45707	.15236	98.2098	98.9124

DFX 100uM	9	105.1278	1.47805	.49268	103.9917	106.2639
DFX 200uM	9	94.3833	1.86073	.62024	92.9530	95.8136
DFX 400uM	9	73.3389	8.64212	2.88071	66.6960	79.9818
Total	63	95.8286	10.27029	1.29393	93.2420	98.4151

ตารางที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

DFX24h

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5841.966	6	973.661	78.147	.000
Within Groups	697.721	56	12.459		
Total	6539.687	62			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DFX24h

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N	DFX 10uM	.30111	1.66395	1.000	-4.9950	5.5972
	DFX 25uM	.31000	1.66395	1.000	-4.9861	5.6061
	DFX 50uM	1.43889	1.66395	1.000	-3.8572	6.7350
	DFX 100uM	-5.12778	1.66395	.067	-10.4239	.1683
	DFX 200uM	5.61667*	1.66395	.028	.3206	10.9127
	DFX 400uM	26.66111*	1.66395	.000	21.3650	31.9572
DFX 10uM	N	-.30111	1.66395	1.000	-5.5972	4.9950
	DFX 25uM	.00889	1.66395	1.000	-5.2872	5.3050
	DFX 50uM	1.13778	1.66395	1.000	-4.1583	6.4339

	DFX 100uM	-5.42889*	1.66395	.040	-10.7250	-.1328
	DFX 200uM	5.31556*	1.66395	.048	.0195	10.6116
	DFX 400uM	26.36000*	1.66395	.000	21.0639	31.6561
DFX 25uM	N	-.31000	1.66395	1.000	-5.6061	4.9861
	DFX 10uM	-.00889	1.66395	1.000	-5.3050	5.2872
	DFX 50uM	1.12889	1.66395	1.000	-4.1672	6.4250
	DFX 100uM	-5.43778*	1.66395	.039	-10.7339	-.1417
	DFX 200uM	5.30667*	1.66395	.049	.0106	10.6027
	DFX 400uM	26.35111*	1.66395	.000	21.0550	31.6472
DFX 50uM	N	-1.43889	1.66395	1.000	-6.7350	3.8572
	DFX 10uM	-1.13778	1.66395	1.000	-6.4339	4.1583
	DFX 25uM	-1.12889	1.66395	1.000	-6.4250	4.1672
	DFX 100uM	-6.56667*	1.66395	.005	-11.8627	-1.2706
	DFX 200uM	4.17778	1.66395	.314	-1.1183	9.4739
	DFX 400uM	25.22222*	1.66395	.000	19.9261	30.5183
DFX 100uM	N	5.12778	1.66395	.067	-.1683	10.4239
	DFX 10uM	5.42889*	1.66395	.040	.1328	10.7250
	DFX 25uM	5.43778*	1.66395	.039	.1417	10.7339
	DFX 50uM	6.56667*	1.66395	.005	1.2706	11.8627
	DFX 200uM	10.74444*	1.66395	.000	5.4484	16.0405
	DFX 400uM	31.78889*	1.66395	.000	26.4928	37.0850
DFX 200uM	N	-5.61667*	1.66395	.028	-10.9127	-.3206
	DFX 10uM	-5.31556*	1.66395	.048	-10.6116	-.0195
	DFX 25uM	-5.30667*	1.66395	.049	-10.6027	-.0106
	DFX 50uM	-4.17778	1.66395	.314	-9.4739	1.1183
	DFX 100uM	-10.74444*	1.66395	.000	-16.0405	-5.4484
	DFX 400uM	21.04444*	1.66395	.000	15.7484	26.3405
DFX 400uM	N	-26.66111*	1.66395	.000	-31.9572	-21.3650
	DFX 10uM	-26.36000*	1.66395	.000	-31.6561	-21.0639
	DFX 25uM	-26.35111*	1.66395	.000	-31.6472	-21.0550
	DFX 50uM	-25.22222*	1.66395	.000	-30.5183	-19.9261

DFX 100uM	-31.78889*	1.66395	.000	-37.0850	-26.4928
DFX 200uM	-21.04444*	1.66395	.000	-26.3405	-15.7484

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

DFX48h

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
N	9	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000
DFX 10uM	9	98.7678	5.09274	1.69758	94.8531	102.6824
DFX 25uM	9	99.8856	7.90265	2.63422	93.8110	105.9601
DFX 50uM	9	103.2111	12.90620	4.30207	93.2905	113.1317
DFX 100uM	9	110.3600	6.16060	2.05353	105.6245	115.0955
DFX 200uM	9	95.1244	6.59207	2.19736	90.0573	100.1916
DFX 400uM	9	76.7678	3.52318	1.17439	74.0596	79.4759
Total	63	97.7310	11.78435	1.48469	94.7631	100.6988

ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลของดีเฟอรอกซามีนต่อความอยู่รอดของเซลล์ HN-30 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

DFX48h

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5819.755	6	969.959	19.467	.000
Within Groups	2790.234	56	49.826		
Total	8609.989	62			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DFX48h

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 10uM	1.23222	3.32752	1.000
	DFX 25uM	.11444	3.32752	1.000
	DFX 50uM	-3.21111	3.32752	1.000
	DFX 100uM	-10.36000	3.32752	.061
	DFX 200uM	4.87556	3.32752	1.000
	DFX 400uM	23.23222*	3.32752	.000
DFX 10uM	N	-1.23222	3.32752	1.000
	DFX 25uM	-1.11778	3.32752	1.000
	DFX 50uM	-4.44333	3.32752	1.000
	DFX 100uM	-11.59222*	3.32752	.020
	DFX 200uM	3.64333	3.32752	1.000
	DFX 400uM	22.00000*	3.32752	.000
DFX 25uM	N	-.11444	3.32752	1.000
	DFX 10uM	1.11778	3.32752	1.000

	DFX 50uM	-3.32556	3.32752	1.000
	DFX 100uM	-10.47444	3.32752	.055
	DFX 200uM	4.76111	3.32752	1.000
	DFX 400uM	23.11778*	3.32752	.000
DFX 50uM	N	3.21111	3.32752	1.000
	DFX 10uM	4.44333	3.32752	1.000
	DFX 25uM	3.32556	3.32752	1.000
	DFX 100uM	-7.14889	3.32752	.756
	DFX 200uM	8.08667	3.32752	.385
	DFX 400uM	26.44333*	3.32752	.000
DFX 100uM	N	10.36000	3.32752	.061
	DFX 10uM	11.59222*	3.32752	.020
	DFX 25uM	10.47444	3.32752	.055
	DFX 50uM	7.14889	3.32752	.756
	DFX 200uM	15.23556*	3.32752	.001
	DFX 400uM	33.59222*	3.32752	.000
DFX 200uM	N	-4.87556	3.32752	1.000
	DFX 10uM	-3.64333	3.32752	1.000
	DFX 25uM	-4.76111	3.32752	1.000
	DFX 50uM	-8.08667	3.32752	.385
	DFX 100uM	-15.23556*	3.32752	.001
	DFX 400uM	18.35667*	3.32752	.000
DFX 400uM	N	-23.23222*	3.32752	.000
	DFX 10uM	-22.00000*	3.32752	.000
	DFX 25uM	-23.11778*	3.32752	.000
	DFX 50uM	-26.44333*	3.32752	.000
	DFX 100uM	-33.59222*	3.32752	.000
	DFX 200uM	-18.35667*	3.32752	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2 ผลของโคบอลต์คลอไรด์และดีเฟอรอกซามีนในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตรา การแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Multiple Comparisons

Dependent Variable: H6h CD-44

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-14.14000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-96.17000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-3.91000*	.70711	.003
(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-102.85000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-47.72000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-50.13000*	.70711	.000

Dependent Variable: H6h CD-105

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-123.70000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-117.25000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	3.04000*	.70711	.016

Dependent Variable: H6h CD-133

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	.52000	.70711	1.000
	CoCl ₂ 100uM	-94.60000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	49.08000*	.70711	.000

Dependent Variable: H6h Nanog

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-32.61000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-115.30000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-32.00000*	.70711	.000

Dependent Variable: H6h VEGF

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-6.53000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-59.41000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-5.11000*	.70711	.001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Multiple Comparisons

Dependent Variable: H24h CD-44

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-100.12000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-135.52000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-11.62000*	.70711	.000

Dependent Variable: H24h Oct-4

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-26.84000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-36.61000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-1.63000	.70711	.300

Dependent Variable: H24h CD-105

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-65.75000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-65.38000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-7.33000*	.70711	.000

Dependent Variable: H24h CD-133

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-53.93000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-32.29000*	.70711	.000

CoCl ₂ 200uM	-6.29000*	.70711	.000
-------------------------	-----------	--------	------

Dependent Variable: H24h Nanog

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-171.01000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-191.83000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	-189.64000*	.70711	.000

Dependent Variable: H24h VEGF

Bonferroni

(I) sample		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	CoCl ₂ 50uM	-34.67000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 100uM	-36.94000*	.70711	.000
	CoCl ₂ 200uM	60.03000*	.70711	.000

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยทีเฟอร์อกซามีนความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD44

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound

N	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
DFX 50uM	2	2.1950	.61518	.43500	3.3322	7.7222
DFX 100uM	2	4.2950	.34648	.24500	1.1820	7.4080
DFX 200uM	2	.7300	.08485	.06000	-.0324	1.4924
Total	9	1.9378	1.47083	.49028	.8072	3.0684

ANOVA

CD44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.801	3	5.600	55.372	.000
Within Groups	.506	5	.101		
Total	17.307	8			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD44

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-1.19500	.29032	.055
	DFX 100uM	-3.29500*	.29032	.001
	DFX 200uM	.27000	.29032	1.000
DFX 50uM	N	1.19500	.29032	.055
	DFX 100uM	-2.10000*	.31803	.007
	DFX 200uM	1.46500*	.31803	.035
DFX 100uM	N	3.29500*	.29032	.001

	DFX 50uM	2.10000*	.31803	.007
	DFX 200uM	3.56500*	.31803	.001
	N	-.27000	.29032	1.000
DFX 200uM	DFX 50uM	-1.46500*	.31803	.035
	DFX 100uM	-3.56500*	.31803	.001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

CD105

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	3	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	3	1.5567	.10017	.05783
DFX 100uM	2	3.6150	.16263	.11500
DFX 200uM	3	.8567	.74769	.43168
Total	11	1.5882	1.09667	.33066

ANOVA

CD105

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.862	3	3.621	21.763	.001
Within Groups	1.165	7	.166		
Total	12.027	10			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD105

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.

	DFX 50uM	-.55667	.33304	.831
N	DFX 100uM	-2.61500*	.37235	.001
	DFX 200uM	.14333	.33304	1.000
	N	.55667	.33304	.831
DFX 50uM	DFX 100uM	-2.05833*	.37235	.005
	DFX 200uM	.70000	.33304	.442
	N	2.61500*	.37235	.001
DFX 100uM	DFX 50uM	2.05833*	.37235	.005
	DFX 200uM	2.75833*	.37235	.001
	N	-.14333	.33304	1.000
DFX 200uM	DFX 50uM	-.70000	.33304	.442
	DFX 100uM	-2.75833*	.37235	.001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

CD133

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	3	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	3	5.1967	2.13622	1.23335
DFX 100uM	2	7.7050	.60104	.42500
DFX 200uM	3	1.5533	.44792	.25861
Total	11	3.5145	2.89837	.87389

ANOVA

CD133

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	74.116	3	24.705	17.487	.001
Within Groups	9.889	7	1.413		
Total	84.006	10			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD133

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-4.19667*	.97049	.021
	DFX 100uM	-6.70500*	1.08504	.003
	DFX 200uM	-.55333	.97049	1.000
DFX 50uM	N	4.19667*	.97049	.021
	DFX 100uM	-2.50833	1.08504	.324
	DFX 200uM	3.64333*	.97049	.043
DFX 100uM	N	6.70500*	1.08504	.003
	DFX 50uM	2.50833	1.08504	.324
	DFX 200uM	6.15167*	1.08504	.005
DFX 200uM	N	.55333	.97049	1.000
	DFX 50uM	-3.64333*	.97049	.043
	DFX 100uM	-6.15167*	1.08504	.005

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

OCT4

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	3	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	3	1.4233	.62804	.36260
DFX 100uM	3	3.5933	.75923	.43834
DFX 200uM	3	1.2800	.52574	.30353
Total	12	1.8242	1.17908	.34037

ANOVA

OCT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.798	3	4.266	13.681	.002
Within Groups	2.495	8	.312		
Total	15.292	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OCT4

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-.42333	.45594	1.000
	DFX 100uM	-2.59333*	.45594	.003
	DFX 200uM	-.28000	.45594	1.000
DFX 50uM	N	.42333	.45594	1.000
	DFX 100uM	-2.17000*	.45594	.009
	DFX 200uM	.14333	.45594	1.000
DFX 100uM	N	2.59333*	.45594	.003
	DFX 50uM	2.17000*	.45594	.009
	DFX 200uM	2.31333*	.45594	.006
DFX 200uM	N	.28000	.45594	1.000
	DFX 50uM	-.14333	.45594	1.000
	DFX 100uM	-2.31333*	.45594	.006

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

NANOG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error

N	3	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	3	1.6667	.61027	.35234
DFX 100uM	3	3.8333	.06028	.03480
DFX 200uM	2	3.9050	.28991	.20500
Total	11	2.4827	1.37650	.41503

ANOVA

NANOG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18.111	3	6.037	50.539	.000
Within Groups	.836	7	.119		
Total	18.948	10			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NANOG

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-.66667	.28220	.301
	DFX 100uM	-2.83333*	.28220	.000
	DFX 200uM	-2.90500*	.31551	.000
DFX 50uM	N	.66667	.28220	.301
	DFX 100uM	-2.16667*	.28220	.001
	DFX 200uM	-2.23833*	.31551	.001
DFX 100uM	N	2.83333*	.28220	.000
	DFX 50uM	2.16667*	.28220	.001
	DFX 200uM	-.07167	.31551	1.000
DFX 200uM	N	2.90500*	.31551	.000
	DFX 50uM	2.23833*	.31551	.001
	DFX 100uM	.07167	.31551	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

VEGF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	3	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	3	2.4000	.76740	.44306
DFX 100uM	2	6.0550	.70004	.49500
DFX 200uM	3	1.7233	.54501	.31466
Total	11	2.4982	1.90073	.57309

ANOVA

VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.866	3	11.289	34.935	.000
Within Groups	2.262	7	.323		
Total	36.128	10			

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VEGF

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-1.40000	.46413	.117
	DFX 100uM	-5.0550*	.51892	.000
	DFX 200uM	-.72333	.46413	.979
DFX 50uM	N	1.40000	.46413	.117
	DFX 100uM	-3.6550*	.51892	.001
	DFX 200uM	.67667	.46413	1.000

	N	5.05500*	.51892	.000
DFX 100uM	DFX 50uM	3.65500*	.51892	.001
	DFX 200uM	4.33167*	.51892	.000
	N	.72333	.46413	.979
DFX 200uM	DFX 50uM	-.67667	.46413	1.000
	DFX 100uM	-4.33167*	.51892	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ออกซ์-4 ซีดี-105 ซีดี-133 นานอก และ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยทีเพอรอกซามีนความเข้มข้น 0, 50, 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD44

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	4	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	4	.8375	.40053	.20027
DFX 100uM	4	1.7500	.14071	.07036
DFX 200uM	4	.5200	.15166	.07583
Total	16	1.0269	.50829	.12707

ANOVA

CD44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.266	3	1.089	21.426	.000
Within Groups	.610	12	.051		

Total	3.875	15			
-------	-------	----	--	--	--

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD44

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	.16250	.15938	1.000
	DFX 100uM	-.75000*	.15938	.003
	DFX 200uM	.48000	.15938	.065
DFX 50uM	N	-.16250	.15938	1.000
	DFX 100uM	-.91250*	.15938	.001
	DFX 200uM	.31750	.15938	.418
DFX 100uM	N	.75000*	.15938	.003
	DFX 50uM	.91250*	.15938	.001
	DFX 200uM	1.23000*	.15938	.000
DFX 200uM	N	-.48000	.15938	.065
	DFX 50uM	-.31750	.15938	.418
	DFX 100uM	-1.23000*	.15938	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

CD105

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	4	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	4	1.0050	.39273	.19636
DFX 100uM	4	.8600	.28879	.14440
DFX 200uM	4	.7175	.16460	.08230
Total	16	.8956	.26046	.06512

ANOVA

CD105

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.223	3	.074	1.125	.378
Within Groups	.794	12	.066		
Total	1.018	15			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD105

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-.00500	.18191	1.000
	DFX 100uM	.14000	.18191	1.000
	DFX 200uM	.28250	.18191	.878
DFX 50uM	N	.00500	.18191	1.000
	DFX 100uM	.14500	.18191	1.000
	DFX 200uM	.28750	.18191	.840
DFX 100uM	N	-.14000	.18191	1.000
	DFX 50uM	-.14500	.18191	1.000
	DFX 200uM	.14250	.18191	1.000
DFX 200uM	N	-.28250	.18191	.878
	DFX 50uM	-.28750	.18191	.840
	DFX 100uM	-.14250	.18191	1.000

Descriptives

CD133

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error

N	4	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	4	.8950	.11561	.05781
DFX 100uM	4	3.2300	3.28478	1.64239
DFX 200uM	4	1.1825	.51983	.25992
Total	16	1.5769	1.78819	.44705

ANOVA

CD133

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.744	3	4.915	1.775	.205
Within Groups	33.220	12	2.768		
Total	47.965	15			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD133

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	.10500	1.17651	1.000
	DFX 100uM	-2.23000	1.17651	.494
	DFX 200uM	-.18250	1.17651	1.000
DFX 50uM	N	-.10500	1.17651	1.000
	DFX 100uM	-2.33500	1.17651	.423
	DFX 200uM	-.28750	1.17651	1.000
DFX 100uM	N	2.23000	1.17651	.494
	DFX 50uM	2.33500	1.17651	.423
	DFX 200uM	2.04750	1.17651	.644
DFX 200uM	N	.18250	1.17651	1.000
	DFX 50uM	-.28750	1.17651	1.000
	DFX 100uM	-2.04750	1.17651	.644

Descriptives

OCT4

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	4	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	4	.7900	.66668	.33334
DFX 100uM	4	1.3725	.35743	.17872
DFX 200uM	4	.8450	.13528	.06764
Total	16	1.0019	.41626	.10406

ANOVA

OCT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.827	3	.276	1.868	.189
Within Groups	1.772	12	.148		
Total	2.599	15			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OCT4

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	.21000	.27169	1.000
	DFX 100uM	-.37250	.27169	1.000
	DFX 200uM	.15500	.27169	1.000
DFX 50uM	N	-.21000	.27169	1.000
	DFX 100uM	-.58250	.27169	.319
	DFX 200uM	-.05500	.27169	1.000
DFX 100uM	N	.37250	.27169	1.000
	DFX 50uM	.58250	.27169	.319

	DFX 200uM	.52750	.27169	.456
	N	-.15500	.27169	1.000
DFX 200uM	DFX 50uM	.05500	.27169	1.000
	DFX 100uM	-.52750	.27169	.456

Descriptives

NANOg

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	4	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	4	1.1150	.11475	.05737
DFX 100uM	4	1.4850	.14617	.07309
DFX 200uM	4	.8700	.27080	.13540
Total	16	1.1175	.27858	.06964

ANOVA

NANOg

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.841	3	.280	10.389	.001
Within Groups	.324	12	.027		
Total	1.164	15			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NANOg

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-.11500	.11612	1.000
	DFX 100uM	-.48500*	.11612	.008
	DFX 200uM	.13000	.11612	1.000

	N	.11500	.11612	1.000
DFX 50uM	DFX 100uM	-.37000*	.11612	.047
	DFX 200uM	.24500	.11612	.339
	N	.48500*	.11612	.008
DFX 100uM	DFX 50uM	.37000*	.11612	.047
	DFX 200uM	.61500*	.11612	.001
	N	-.13000	.11612	1.000
DFX 200uM	DFX 50uM	-.24500	.11612	.339
	DFX 100uM	-.61500*	.11612	.001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Descriptives

VEGF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
N	4	1.0000	.00000	.00000
DFX 50uM	4	1.1850	.48734	.24367
DFX 100uM	4	3.4250	1.31586	.65793
DFX 200uM	4	1.9225	.91824	.45912
Total	16	1.8831	1.23885	.30971

ANOVA

VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.585	3	4.862	6.915	.006
Within Groups	8.436	12	.703		
Total	23.021	15			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VEGF

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
N	DFX 50uM	-.18500	.59289	1.000
	DFX 100uM	-2.42500*	.59289	.009
	DFX 200uM	-.92250	.59289	.874
DFX 50uM	N	.18500	.59289	1.000
	DFX 100uM	-2.24000*	.59289	.016
	DFX 200uM	-.73750	.59289	1.000
DFX 100uM	N	2.42500*	.59289	.009
	DFX 50uM	2.24000*	.59289	.016
	DFX 200uM	1.50250	.59289	.157
DFX 200uM	N	.92250	.59289	.874
	DFX 50uM	.73750	.59289	1.000
	DFX 100uM	-1.50250	.59289	.157

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

3 สารเรสเวราทรอลและออกซิเรสเวราทรอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของออกซ-4 นานอก ซิตี-44 ซิตี-105 ซิตี-133 และ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเสมือนพร่องออกซิเจนด้วยโคบอลต์คลอไรด์หรือดีเพอรอกซามีน

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซิตี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวราทรอลหรือออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD44

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
CoCl2+0.1%DMSO	4	1.7175	.09359	.04679	1.5686	1.8664
Res5uM	4	.3700	.21649	.10824	.0255	.7145
Res10uM	4	1.4400	.74014	.37007	.2623	2.6177
Res20uM	4	.8700	.37956	.18978	.2660	1.4740
Oxy5uM	4	1.0825	.59612	.29806	.1339	2.0311
Oxy10uM	3	1.0067	.65256	.37676	-.6144	2.6277
Oxy20uM	4	.8075	.52848	.26424	-.0334	1.6484
Total	31	1.0377	.56623	.10170	.8300	1.2454

ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CD44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.620	7	.660	3.037	.020
Within Groups	4.998	23	.217		
Total	9.618	30			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD44

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	CoCl2+0.1%DMSO	-.71750	.32963	1.000
	Res5uM	.63000	.32963	1.000
	Res10uM	-.44000	.32963	1.000
	Res20uM	.13000	.32963	1.000
	Oxy5uM	-.08250	.32963	1.000
	Oxy10uM	-.00667	.35604	1.000
	Oxy20uM	.19250	.32963	1.000
CoCl2+0.1%DMSO	0.1%DMSO	.71750	.32963	1.000
	Res5uM	1.34750*	.32963	.013
	Res10uM	.27750	.32963	1.000
	Res20uM	.84750	.32963	.478
	Oxy5uM	.63500	.32963	1.000
	Oxy10uM	.71083	.35604	1.000
	Oxy20uM	.91000	.32963	.312
Res5uM	0.1%DMSO	-.63000	.32963	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.34750*	.32963	.013
	Res10uM	-1.07000	.32963	.100
	Res20uM	-.50000	.32963	1.000
	Oxy5uM	-.71250	.32963	1.000
	Oxy10uM	-.63667	.35604	1.000
	Oxy20uM	-.43750	.32963	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	.44000	.32963	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.27750	.32963	1.000
	Res5uM	1.07000	.32963	.100
	Res20uM	.57000	.32963	1.000

	Oxy5uM	.35750	.32963	1.000
	Oxy10uM	.43333	.35604	1.000
	Oxy20uM	.63250	.32963	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.13000	.32963	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.84750	.32963	.478
	Res5uM	.50000	.32963	1.000
	Res10uM	-.57000	.32963	1.000
	Oxy5uM	-.21250	.32963	1.000
	Oxy10uM	-.13667	.35604	1.000
	Oxy20uM	.06250	.32963	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	.08250	.32963	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.63500	.32963	1.000
	Res5uM	.71250	.32963	1.000
	Res10uM	-.35750	.32963	1.000
	Res20uM	.21250	.32963	1.000
	Oxy10uM	.07583	.35604	1.000
	Oxy20uM	.27500	.32963	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	.00667	.35604	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.71083	.35604	1.000
	Res5uM	.63667	.35604	1.000
	Res10uM	-.43333	.35604	1.000
	Res20uM	.13667	.35604	1.000
	Oxy5uM	-.07583	.35604	1.000
	Oxy20uM	.19917	.35604	1.000
Oxy20uM	0.1%DMSO	-.19250	.32963	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.91000	.32963	.312
	Res5uM	.43750	.32963	1.000
	Res10uM	-.63250	.32963	1.000
	Res20uM	-.06250	.32963	1.000
	Oxy5uM	-.27500	.32963	1.000
	Oxy10uM	-.19917	.35604	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD105

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
CoCl2+0.1%DMSO	3	2.1533	.55591	.32095	.7724	3.5343
Res5uM	3	.1367	.10214	.05897	-.1171	.3904
Res10uM	3	1.9767	.57396	.33138	.5509	3.4025
Res20uM	3	.9767	.10066	.05812	.7266	1.2267
Oxy5uM	3	1.2567	.34196	.19743	.4072	2.1061
Oxy10uM	3	2.2767	.47290	.27303	1.1019	3.4514
Oxy20uM	3	1.8800	.26000	.15011	1.2341	2.5259
Total	24	1.4571	.76954	.15708	1.1321	1.7820

ตารางที่ 17 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CD105

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.486	7	1.641	12.300	.000
Within Groups	2.134	16	.133		
Total	13.620	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD105

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	CoCl2+0.1%DMSO	-1.15333*	.29822	.038
	Res5uM	.86333	.29822	.295
	Res10uM	-.97667	.29822	.133
	Res20uM	.02333	.29822	1.000
	Oxy5uM	-.25667	.29822	1.000
	Oxy10uM	-1.27667*	.29822	.016
	Oxy20uM	-.88000	.29822	.263
CoCl2+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.15333*	.29822	.038
	Res5uM	2.01667*	.29822	.000
	Res10uM	.17667	.29822	1.000
	Res20uM	1.17667*	.29822	.032
	Oxy5uM	.89667	.29822	.234
	Oxy10uM	-.12333	.29822	1.000
	Oxy20uM	.27333	.29822	1.000
Res5uM	0.1%DMSO	-.86333	.29822	.295
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.01667*	.29822	.000
	Res10uM	-1.84000*	.29822	.000
	Res20uM	-.84000	.29822	.347

	Oxy5uM	-1.12000*	.29822	.048
	Oxy10uM	-2.14000*	.29822	.000
	Oxy20uM	-1.74333*	.29822	.001
Res10uM	0.1%DMSO	.97667	.29822	.133
	CoCl2+0.1%DMSO	-.17667	.29822	1.000
	Res5uM	1.84000*	.29822	.000
	Res20uM	1.00000	.29822	.113
	Oxy5uM	.72000	.29822	.787
	Oxy10uM	-.30000	.29822	1.000
	Oxy20uM	.09667	.29822	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.02333	.29822	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.17667*	.29822	.032
	Res5uM	.84000	.29822	.347
	Res10uM	-1.00000	.29822	.113
	Oxy5uM	-.28000	.29822	1.000
	Oxy10uM	-1.30000*	.29822	.014
	Oxy20uM	-.90333	.29822	.223
Oxy5uM	0.1%DMSO	.25667	.29822	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.89667	.29822	.234
	Res5uM	1.12000*	.29822	.048
	Res10uM	-.72000	.29822	.787
	Res20uM	.28000	.29822	1.000
	Oxy10uM	-1.02000	.29822	.098
	Oxy20uM	-.62333	.29822	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	1.27667*	.29822	.016
	CoCl2+0.1%DMSO	.12333	.29822	1.000
	Res5uM	2.14000*	.29822	.000
	Res10uM	.30000	.29822	1.000
	Res20uM	1.30000*	.29822	.014
	Oxy5uM	1.02000	.29822	.098
	Oxy20uM	.39667	.29822	1.000

Oxy20uM	0.1%DMSO	.88000	.29822	.263
	CoCl2+0.1%DMSO	-.27333	.29822	1.000
	Res5uM	1.74333*	.29822	.001
	Res10uM	-.09667	.29822	1.000
	Res20uM	.90333	.29822	.223
	Oxy5uM	.62333	.29822	1.000
	Oxy10uM	-.39667	.29822	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวราทรอล หรือออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD133

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
CoCl2+0.1%DMSO	3	3.1667	1.01441	.58567	.6467	5.6866
Res5uM	4	.1850	.12715	.06357	-.0173	.3873
Res10uM	4	.5325	.36728	.18364	-.0519	1.1169
Res20uM	5	.3500	.26363	.11790	.0227	.6773
Oxy5uM	5	.7540	.58973	.26373	.0218	1.4862
Oxy10uM	4	.4450	.38897	.19449	-.1739	1.0639
Oxy20uM	3	2.1267	.01155	.00667	2.0980	2.1554
Total	32	.9391	.97692	.17270	.5868	1.2913

ตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CD133

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.951	7	3.564	18.458	.000
Within Groups	4.635	24	.193		
Total	29.585	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD133

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	CoCl ₂ +0.1%DMSO	-2.16667*	.33563	.000
	Res5uM	.81500	.31073	.418
	Res10uM	.46750	.31073	1.000
	Res20uM	.65000	.29478	1.000
	Oxy5uM	.24600	.29478	1.000
	Oxy10uM	.55500	.31073	1.000
	Oxy20uM	-1.12667	.33563	.073
CoCl ₂ +0.1%DMSO	0.1%DMSO	2.16667*	.33563	.000
	Res5uM	2.98167*	.33563	.000
	Res10uM	2.63417*	.33563	.000

	Res20uM	2.81667*	.32092	.000
	Oxy5uM	2.41267*	.32092	.000
	Oxy10uM	2.72167*	.33563	.000
	Oxy20uM	1.04000	.35880	.221
Res5uM	0.1%DMSO	-.81500	.31073	.418
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.98167*	.33563	.000
	Res10uM	-.34750	.31073	1.000
	Res20uM	-.16500	.29478	1.000
	Oxy5uM	-.56900	.29478	1.000
	Oxy10uM	-.26000	.31073	1.000
	Oxy20uM	-1.94167*	.33563	.000
Res10uM	0.1%DMSO	-.46750	.31073	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.63417*	.33563	.000
	Res5uM	.34750	.31073	1.000
	Res20uM	.18250	.29478	1.000
	Oxy5uM	-.22150	.29478	1.000
	Oxy10uM	.08750	.31073	1.000
	Oxy20uM	-1.59417*	.33563	.002
Res20uM	0.1%DMSO	-.65000	.29478	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.81667*	.32092	.000
	Res5uM	.16500	.29478	1.000
	Res10uM	-.18250	.29478	1.000
	Oxy5uM	-.40400	.27792	1.000
	Oxy10uM	-.09500	.29478	1.000
	Oxy20uM	-1.77667*	.32092	.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.24600	.29478	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.41267*	.32092	.000
	Res5uM	.56900	.29478	1.000
	Res10uM	.22150	.29478	1.000
	Res20uM	.40400	.27792	1.000
	Oxy10uM	.30900	.29478	1.000

Oxy10uM	Oxy20uM	-1.37267*	.32092	.007
	0.1%DMSO	-.55500	.31073	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.72167*	.33563	.000
	Res5uM	.26000	.31073	1.000
	Res10uM	-.08750	.31073	1.000
	Res20uM	.09500	.29478	1.000
Oxy20uM	Oxy5uM	-.30900	.29478	1.000
	Oxy20uM	-1.68167*	.33563	.001
	0.1%DMSO	1.12667	.33563	.073
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.04000	.35880	.221
	Res5uM	1.94167*	.33563	.000
	Res10uM	1.59417*	.33563	.002
	Res20uM	1.77667*	.32092	.000
	Oxy5uM	1.37267*	.32092	.007
	Oxy10uM	1.68167*	.33563	.001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

OCT4

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
CoCl2+0.1%DMSO	3	2.7667	.50063	.28904	1.5230	4.0103
Res5uM	3	.2600	.02646	.01528	.1943	.3257

Res10uM	4	1.5300	.86375	.43188	.1556	2.9044
Res20uM	3	.5400	.22539	.13013	-.0199	1.0999
Oxy5uM	3	.7267	.04726	.02728	.6093	.8441
Oxy10uM	4	1.8700	.83034	.41517	.5487	3.1913
Oxy20uM	3	.9133	.69788	.40292	-.8203	2.6470
Total	27	1.2304	.88785	.17087	.8791	1.5816

ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวราทรอลหรือออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

OCT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.606	7	2.087	6.732	.000
Within Groups	5.889	19	.310		
Total	20.495	26			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OCT4

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	CoCl2+0.1%DMSO	-1.76667*	.42522	.015
	Res5uM	.74000	.42522	1.000
	Res10uM	-.53000	.39368	1.000

	Res20uM	.46000	.42522	1.000
	Oxy5uM	.27333	.42522	1.000
	Oxy10uM	-.87000	.39368	1.000
	Oxy20uM	.08667	.42522	1.000
CoCl2+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.76667*	.42522	.015
	Res5uM	2.50667*	.45458	.001
	Res10uM	1.23667	.42522	.252
	Res20uM	2.22667*	.45458	.003
	Oxy5uM	2.04000*	.45458	.007
	Oxy10uM	.89667	.42522	1.000
	Oxy20uM	1.85333*	.45458	.018
Res5uM	0.1%DMSO	-.74000	.42522	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.50667*	.45458	.001
	Res10uM	-.127000	.42522	.212
	Res20uM	-.28000	.45458	1.000
	Oxy5uM	-.46667	.45458	1.000
	Oxy10uM	-1.61000*	.42522	.035
	Oxy20uM	-.65333	.45458	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	.53000	.39368	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.23667	.42522	.252
	Res5uM	1.27000	.42522	.212
	Res20uM	.99000	.42522	.871
	Oxy5uM	.80333	.42522	1.000
	Oxy10uM	-.34000	.39368	1.000
	Oxy20uM	.61667	.42522	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.46000	.42522	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.22667*	.45458	.003
	Res5uM	.28000	.45458	1.000
	Res10uM	-.99000	.42522	.871
	Oxy5uM	-.18667	.45458	1.000
	Oxy10uM	-1.33000	.42522	.155

	Oxy20uM	-.37333	.45458	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.27333	.42522	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.04000*	.45458	.007
	Res5uM	.46667	.45458	1.000
	Res10uM	-.80333	.42522	1.000
	Res20uM	.18667	.45458	1.000
	Oxy10uM	-1.14333	.42522	.407
	Oxy20uM	-.18667	.45458	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	.87000	.39368	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-.89667	.42522	1.000
	Res5uM	1.61000*	.42522	.035
	Res10uM	.34000	.39368	1.000
	Res20uM	1.33000	.42522	.155
	Oxy5uM	1.14333	.42522	.407
	Oxy20uM	.95667	.42522	1.000
Oxy20uM	0.1%DMSO	-.08667	.42522	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.85333*	.45458	.018
	Res5uM	.65333	.45458	1.000
	Res10uM	-.61667	.42522	1.000
	Res20uM	.37333	.45458	1.000
	Oxy5uM	.18667	.45458	1.000
	Oxy10uM	-.95667	.42522	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 22 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

NANOG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
CoCl2+0.1%DMSO	2	2.5150	.26163	.18500	.1644	4.8656
Res5uM	3	.6833	.55824	.32230	-.7034	2.0701
Res10uM	2	1.0800	.24042	.17000	-1.0801	3.2401
Res20uM	3	.5233	.25794	.14892	-.1174	1.1641
Oxy5uM	3	.9367	.32130	.18550	.1385	1.7348
Oxy10uM	3	.8433	.32130	.18550	.0452	1.6415
Oxy20uM	3	.3500	.03606	.02082	.2604	.4396
Total	22	.9182	.62067	.13233	.6430	1.1934

ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

NANOG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.792	7	.970	10.464	.000
Within Groups	1.298	14	.093		
Total	8.090	21			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NANOG

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	CoCl2+0.1%DMSO	-1.51500*	.27797	.002
	Res5uM	.31667	.24863	1.000
	Res10uM	-.08000	.27797	1.000
	Res20uM	.47667	.24863	1.000
	Oxy5uM	.06333	.24863	1.000
	Oxy10uM	.15667	.24863	1.000
	Oxy20uM	.65000	.24863	.571
CoCl2+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.51500*	.27797	.002
	Res5uM	1.83167*	.27797	.000
	Res10uM	1.43500*	.30450	.009
	Res20uM	1.99167*	.27797	.000
	Oxy5uM	1.57833*	.27797	.002
	Oxy10uM	1.67167*	.27797	.001
	Oxy20uM	2.16500*	.27797	.000
Res5uM	0.1%DMSO	-.31667	.24863	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.83167*	.27797	.000
	Res10uM	-.39667	.27797	1.000
	Res20uM	.16000	.24863	1.000
	Oxy5uM	-.25333	.24863	1.000
	Oxy10uM	-.16000	.24863	1.000
	Oxy20uM	.33333	.24863	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	.08000	.27797	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.43500*	.30450	.009
	Res5uM	.39667	.27797	1.000
	Res20uM	.55667	.27797	1.000

	Oxy5uM	.14333	.27797	1.000
	Oxy10uM	.23667	.27797	1.000
	Oxy20uM	.73000	.27797	.558
Res20uM	0.1%DMSO	-.47667	.24863	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.99167*	.27797	.000
	Res5uM	-.16000	.24863	1.000
	Res10uM	-.55667	.27797	1.000
	Oxy5uM	-.41333	.24863	1.000
	Oxy10uM	-.32000	.24863	1.000
	Oxy20uM	.17333	.24863	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.06333	.24863	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.57833*	.27797	.002
	Res5uM	.25333	.24863	1.000
	Res10uM	-.14333	.27797	1.000
	Res20uM	.41333	.24863	1.000
	Oxy10uM	.09333	.24863	1.000
	Oxy20uM	.58667	.24863	.934
Oxy10uM	0.1%DMSO	-.15667	.24863	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.67167*	.27797	.001
	Res5uM	.16000	.24863	1.000
	Res10uM	-.23667	.27797	1.000
	Res20uM	.32000	.24863	1.000
	Oxy5uM	-.09333	.24863	1.000
	Oxy20uM	.49333	.24863	1.000
Oxy20uM	0.1%DMSO	-.65000	.24863	.571
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.16500*	.27797	.000
	Res5uM	-.33333	.24863	1.000
	Res10uM	-.73000	.27797	.558
	Res20uM	-.17333	.24863	1.000
	Oxy5uM	-.58667	.24863	.934
	Oxy10uM	-.49333	.24863	1.000

ตารางที่ 24 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วิีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

VEGF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
CoCl2+0.1%DMSO	3	2.6500	.79265	.45764	.6809	4.6191
Res5uM	3	.4000	.29816	.17214	-.3407	1.1407
Res10uM	3	1.1500	.56789	.32787	-.2607	2.5607
Res20uM	3	.9733	.73820	.42620	-.8604	2.8071
Oxy5uM	2	.6050	.16263	.11500	-.8562	2.0662
Oxy10uM	2	.7850	.61518	.43500	-4.7422	6.3122
Oxy20uM	3	.4300	.21166	.12220	-.0958	.9558
Total	22	1.0268	.82647	.17621	.6604	1.3933

ตารางที่ 25 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วิีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.681	7	1.526	5.830	.003
Within Groups	3.664	14	.262		
Total	14.344	21			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VEGF

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	CoCl2+0.1%DMSO	-1.65000*	.41769	.041
	Res5uM	.60000	.41769	1.000
	Res10uM	-.15000	.41769	1.000
	Res20uM	.02667	.41769	1.000
	Oxy5uM	.39500	.46699	1.000
	Oxy10uM	.21500	.46699	1.000
	Oxy20uM	.57000	.41769	1.000
CoCl2+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.65000*	.41769	.041
	Res5uM	2.25000*	.41769	.003
	Res10uM	1.50000	.41769	.083
	Res20uM	1.67667*	.41769	.036
	Oxy5uM	2.04500*	.46699	.018
	Oxy10uM	1.86500*	.46699	.037
	Oxy20uM	2.22000*	.41769	.003
Res5uM	0.1%DMSO	-.60000	.41769	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.25000*	.41769	.003
	Res10uM	-.75000	.41769	1.000
	Res20uM	-.57333	.41769	1.000

	Oxy5uM	-.20500	.46699	1.000
	Oxy10uM	-.38500	.46699	1.000
	Oxy20uM	-.03000	.41769	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	.15000	.41769	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.50000	.41769	.083
	Res5uM	.75000	.41769	1.000
	Res20uM	.17667	.41769	1.000
	Oxy5uM	.54500	.46699	1.000
	Oxy10uM	.36500	.46699	1.000
	Oxy20uM	.72000	.41769	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.02667	.41769	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.67667*	.41769	.036
	Res5uM	.57333	.41769	1.000
	Res10uM	-.17667	.41769	1.000
	Oxy5uM	.36833	.46699	1.000
	Oxy10uM	.18833	.46699	1.000
	Oxy20uM	.54333	.41769	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.39500	.46699	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-2.04500*	.46699	.018
	Res5uM	.20500	.46699	1.000
	Res10uM	-.54500	.46699	1.000
	Res20uM	-.36833	.46699	1.000
	Oxy10uM	-.18000	.51156	1.000
	Oxy20uM	.17500	.46699	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	-.21500	.46699	1.000
	CoCl2+0.1%DMSO	-1.86500*	.46699	.037
	Res5uM	.38500	.46699	1.000
	Res10uM	-.36500	.46699	1.000
	Res20uM	-.18833	.46699	1.000
	Oxy5uM	.18000	.51156	1.000
	Oxy20uM	.35500	.46699	1.000

Oxy20uM	0.1%DMSO	.57000	.41769	1.000
	CoCl ₂ +0.1%DMSO	-2.22000*	.41769	.003
	Res5uM	.03000	.41769	1.000
	Res10uM	-.72000	.41769	1.000
	Res20uM	-.54333	.41769	1.000
	Oxy5uM	-.17500	.46699	1.000
	Oxy10uM	-.35500	.46699	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 26 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD44

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
DFX+0.1%DMSO	4	2.4075	.16317	.08159	2.1479	2.6671
Res5uM	4	1.2200	.54191	.27096	.3577	2.0823
Res10uM	4	.7875	.18118	.09059	.4992	1.0758
Res20uM	4	.7075	.11529	.05764	.5240	.8910
Oxy5uM	4	.5950	.26096	.13048	.1798	1.0102
Oxy10uM	4	.8625	.54095	.27047	.0017	1.7233
Oxy20uM	4	.9725	.24636	.12318	.5805	1.3645
Total	32	1.0691	.61135	.10807	.8486	1.2895

ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-44 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CD44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.223	7	1.318	13.379	.000
Within Groups	2.363	24	.098		
Total	11.586	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD44

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	DFX+0.1%DMSO	-1.40750*	.22190	.000
	Res5uM	-.22000	.22190	1.000
	Res10uM	.21250	.22190	1.000
	Res20uM	.29250	.22190	1.000
	Oxy5uM	.40500	.22190	1.000
	Oxy10uM	.13750	.22190	1.000
	Oxy20uM	.02750	.22190	1.000
DFX+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.40750*	.22190	.000
	Res5uM	1.18750*	.22190	.000
	Res10uM	1.62000*	.22190	.000

	Res20uM	1.70000*	.22190	.000
	Oxy5uM	1.81250*	.22190	.000
	Oxy10uM	1.54500*	.22190	.000
	Oxy20uM	1.43500*	.22190	.000
Res5uM	0.1%DMSO	.22000	.22190	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.18750*	.22190	.000
	Res10uM	.43250	.22190	1.000
	Res20uM	.51250	.22190	.835
	Oxy5uM	.62500	.22190	.267
	Oxy10uM	.35750	.22190	1.000
	Oxy20uM	.24750	.22190	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	-.21250	.22190	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.62000*	.22190	.000
	Res5uM	-.43250	.22190	1.000
	Res20uM	.08000	.22190	1.000
	Oxy5uM	.19250	.22190	1.000
	Oxy10uM	-.07500	.22190	1.000
	Oxy20uM	-.18500	.22190	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.29250	.22190	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.70000*	.22190	.000
	Res5uM	-.51250	.22190	.835
	Res10uM	-.08000	.22190	1.000
	Oxy5uM	.11250	.22190	1.000
	Oxy10uM	-.15500	.22190	1.000
	Oxy20uM	-.26500	.22190	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.40500	.22190	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.81250*	.22190	.000
	Res5uM	-.62500	.22190	.267
	Res10uM	-.19250	.22190	1.000
	Res20uM	-.11250	.22190	1.000
	Oxy10uM	-.26750	.22190	1.000

	Oxy20uM	-.37750	.22190	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	-.13750	.22190	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.54500*	.22190	.000
	Res5uM	-.35750	.22190	1.000
	Res10uM	.07500	.22190	1.000
	Res20uM	.15500	.22190	1.000
	Oxy5uM	.26750	.22190	1.000
	Oxy20uM	-.11000	.22190	1.000
Oxy20uM	0.1%DMSO	-.02750	.22190	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.43500*	.22190	.000
	Res5uM	-.24750	.22190	1.000
	Res10uM	.18500	.22190	1.000
	Res20uM	.26500	.22190	1.000
	Oxy5uM	.37750	.22190	1.000
	Oxy10uM	.11000	.22190	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 28 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD105

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000

DFX+0.1%DMSO	3	2.1800	.08888	.05132	1.9592	2.4008
Res5uM	3	1.1967	.20207	.11667	.6947	1.6986
Res10uM	3	1.2267	.41645	.24044	.1921	2.2612
Res20uM	3	.9567	.22189	.12811	.4055	1.5079
Oxy5uM	3	1.0967	.47089	.27187	-.0731	2.2664
Oxy10uM	3	.9267	.40821	.23568	-.0874	1.9407
Oxy20uM	3	.9433	.24664	.14240	.3306	1.5560
Total	24	1.1908	.46969	.09587	.9925	1.3892

ตารางที่ 29 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CD105

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.633	7	.519	5.762	.002
Within Groups	1.441	16	.090		
Total	5.074	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD105

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	DFX+0.1%DMSO	-1.18000*	.24505	.005
	Res5uM	-.19667	.24505	1.000
	Res10uM	-.22667	.24505	1.000
	Res20uM	.04333	.24505	1.000
	Oxy5uM	-.09667	.24505	1.000
	Oxy10uM	.07333	.24505	1.000
	Oxy20uM	.05667	.24505	1.000
DFX+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.18000*	.24505	.005
	Res5uM	.98333*	.24505	.028
	Res10uM	.95333*	.24505	.036
	Res20uM	1.22333*	.24505	.004
	Oxy5uM	1.08333*	.24505	.012
	Oxy10uM	1.25333*	.24505	.003
	Oxy20uM	1.23667*	.24505	.003
Res5uM	0.1%DMSO	.19667	.24505	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-.98333*	.24505	.028
	Res10uM	-.03000	.24505	1.000
	Res20uM	.24000	.24505	1.000
	Oxy5uM	.10000	.24505	1.000
	Oxy10uM	.27000	.24505	1.000
	Oxy20uM	.25333	.24505	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	.22667	.24505	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-.95333*	.24505	.036
	Res5uM	.03000	.24505	1.000
	Res20uM	.27000	.24505	1.000

	Oxy5uM	.13000	.24505	1.000
	Oxy10uM	.30000	.24505	1.000
	Oxy20uM	.28333	.24505	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.04333	.24505	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.22333*	.24505	.004
	Res5uM	-.24000	.24505	1.000
	Res10uM	-.27000	.24505	1.000
	Oxy5uM	-.14000	.24505	1.000
	Oxy10uM	.03000	.24505	1.000
	Oxy20uM	.01333	.24505	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	.09667	.24505	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.08333*	.24505	.012
	Res5uM	-.10000	.24505	1.000
	Res10uM	-.13000	.24505	1.000
	Res20uM	.14000	.24505	1.000
	Oxy10uM	.17000	.24505	1.000
	Oxy20uM	.15333	.24505	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	-.07333	.24505	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.25333*	.24505	.003
	Res5uM	-.27000	.24505	1.000
	Res10uM	-.30000	.24505	1.000
	Res20uM	-.03000	.24505	1.000
	Oxy5uM	-.17000	.24505	1.000
	Oxy20uM	-.01667	.24505	1.000
Oxy20uM	0.1%DMSO	-.05667	.24505	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-1.23667*	.24505	.003
	Res5uM	-.25333	.24505	1.000
	Res10uM	-.28333	.24505	1.000
	Res20uM	-.01333	.24505	1.000
	Oxy5uM	-.15333	.24505	1.000
	Oxy10uM	.01667	.24505	1.000

ตารางที่ 30 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

CD133

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
0.1%DMSO	3	1.0000	.00000	.00000
DFX+0.1%DMSO	8	2.9050	.68702	.24290
Res5uM	4	.2375	.09878	.04939
Res10uM	4	.2800	.12410	.06205
Res20uM	4	.5600	.31262	.15631
Oxy5uM	4	.8300	.48587	.24293
Oxy10uM	6	3.5467	.76662	.31297
Oxy20uM	4	.2200	.12410	.06205
Total	37	1.5143	1.42640	.23450

ตารางที่ 31 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ซีดี-133 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

CD133

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	65.880	7	9.411	37.055	.000
Within Groups	7.366	29	.254		
Total	73.246	36			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD133

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	DFX+0.1%DMSO	-1.90500*	.34119	.000
	Res5uM	.76250	.38491	1.000
	Res10uM	.72000	.38491	1.000
	Res20uM	.44000	.38491	1.000
	Oxy5uM	.17000	.38491	1.000
	Oxy10uM	-2.54667*	.35636	.000
	Oxy20uM	.78000	.38491	1.000
DFX+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.90500*	.34119	.000
	Res5uM	2.66750*	.30862	.000
	Res10uM	2.62500*	.30862	.000
	Res20uM	2.34500*	.30862	.000
	Oxy5uM	2.07500*	.30862	.000
	Oxy10uM	-.64167	.27218	.710
	Oxy20uM	2.68500*	.30862	.000
Res5uM	0.1%DMSO	-.76250	.38491	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.66750*	.30862	.000
	Res10uM	-.04250	.35636	1.000
	Res20uM	-.32250	.35636	1.000

	Oxy5uM	-.59250	.35636	1.000
	Oxy10uM	-3.30917*	.32531	.000
	Oxy20uM	.01750	.35636	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	-.72000	.38491	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.62500*	.30862	.000
	Res5uM	.04250	.35636	1.000
	Res20uM	-.28000	.35636	1.000
	Oxy5uM	-.55000	.35636	1.000
	Oxy10uM	-3.26667*	.32531	.000
	Oxy20uM	.06000	.35636	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.44000	.38491	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.34500*	.30862	.000
	Res5uM	.32250	.35636	1.000
	Res10uM	.28000	.35636	1.000
	Oxy5uM	-.27000	.35636	1.000
	Oxy10uM	-2.98667*	.32531	.000
	Oxy20uM	.34000	.35636	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.17000	.38491	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.07500*	.30862	.000
	Res5uM	.59250	.35636	1.000
	Res10uM	.55000	.35636	1.000
	Res20uM	.27000	.35636	1.000
	Oxy10uM	-2.71667*	.32531	.000
	Oxy20uM	.61000	.35636	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	2.54667*	.35636	.000
	DFX+0.1%DMSO	.64167	.27218	.710
	Res5uM	3.30917*	.32531	.000
	Res10uM	3.26667*	.32531	.000
	Res20uM	2.98667*	.32531	.000
	Oxy5uM	2.71667*	.32531	.000
	Oxy20uM	3.32667*	.32531	.000

Oxy20uM	0.1%DMSO	-.78000	.38491	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.68500*	.30862	.000
	Res5uM	-.01750	.35636	1.000
	Res10uM	-.06000	.35636	1.000
	Res20uM	-.34000	.35636	1.000
	Oxy5uM	-.61000	.35636	1.000
	Oxy10uM	-3.32667*	.32531	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 32 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวราทรอลหรือ ออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการ ทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

OCT4

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
DFX+0.1%DMSO	4	4.0900	.67651	.33826	3.0135	5.1665
Res5uM	4	.5875	.37562	.18781	-.0102	1.1852
Res10uM	4	.7100	.36724	.18362	.1256	1.2944
Res20uM	4	.7575	.53238	.26619	-.0896	1.6046
Oxy5uM	3	1.7300	.79793	.46069	-.2522	3.7122
Oxy10uM	2	2.7100	.86267	.61000	-5.0408	10.4608
Oxy20uM	4	1.2325	.48527	.24264	.4603	2.0047
Total	29	1.5214	1.26773	.23541	1.0392	2.0036

ตารางที่ 33 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ ออกซ์-4 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

OCT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39.225	7	5.604	20.376	.000
Within Groups	5.775	21	.275		
Total	45.000	28			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OCT4

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	DFX+0.1%DMSO	-3.09000*	.37082	.000
	Res5uM	.41250	.37082	1.000
	Res10uM	.29000	.37082	1.000
	Res20uM	.24250	.37082	1.000
	Oxy5uM	-.73000	.40053	1.000
	Oxy10uM	-1.71000*	.45416	.032
	Oxy20uM	-.23250	.37082	1.000
DFX+0.1%DMSO	0.1%DMSO	3.09000*	.37082	.000
	Res5uM	3.50250*	.37082	.000
	Res10uM	3.38000*	.37082	.000

	Res20uM	3.33250*	.37082	.000
	Oxy5uM	2.36000*	.40053	.000
	Oxy10uM	1.38000	.45416	.175
	Oxy20uM	2.85750*	.37082	.000
Res5uM	0.1%DMSO	-.41250	.37082	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.50250*	.37082	.000
	Res10uM	-.12250	.37082	1.000
	Res20uM	-.17000	.37082	1.000
	Oxy5uM	-1.14250	.40053	.267
	Oxy10uM	-2.12250*	.45416	.004
	Oxy20uM	-.64500	.37082	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	-.29000	.37082	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.38000*	.37082	.000
	Res5uM	.12250	.37082	1.000
	Res20uM	-.04750	.37082	1.000
	Oxy5uM	-1.02000	.40053	.526
	Oxy10uM	-2.00000*	.45416	.007
	Oxy20uM	-.52250	.37082	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.24250	.37082	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.33250*	.37082	.000
	Res5uM	.17000	.37082	1.000
	Res10uM	.04750	.37082	1.000
	Oxy5uM	-.97250	.40053	.679
	Oxy10uM	-1.95250*	.45416	.009
	Oxy20uM	-.47500	.37082	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	.73000	.40053	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.36000*	.40053	.000
	Res5uM	1.14250	.40053	.267
	Res10uM	1.02000	.40053	.526
	Res20uM	.97250	.40053	.679
	Oxy10uM	-.98000	.47872	1.000

	Oxy20uM	.49750	.40053	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	1.71000*	.45416	.032
	DFX+0.1%DMSO	-1.38000	.45416	.175
	Res5uM	2.12250*	.45416	.004
	Res10uM	2.00000*	.45416	.007
	Res20uM	1.95250*	.45416	.009
	Oxy5uM	.98000	.47872	1.000
	Oxy20uM	1.47750	.45416	.106
Oxy20uM	0.1%DMSO	.23250	.37082	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.85750*	.37082	.000
	Res5uM	.64500	.37082	1.000
	Res10uM	.52250	.37082	1.000
	Res20uM	.47500	.37082	1.000
	Oxy5uM	-.49750	.40053	1.000
	Oxy10uM	-1.47750	.45416	.106

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ตารางที่ 34 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวราทรอลหรือออกซิเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

NANO

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound

0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
DFX+0.1%DMSO	8	5.8113	.74882	.26475	5.1852	6.4373
Res5uM	3	3.2800	.55866	.32254	1.8922	4.6678
Res10uM	3	2.2433	.13013	.07513	1.9201	2.5666
Res20uM	4	1.8675	.50282	.25141	1.0674	2.6676
Oxy5uM	3	2.1867	1.90579	1.10031	-2.5476	6.9209
Oxy10uM	4	6.1825	2.20959	1.10480	2.6665	9.6985
Oxy20uM	4	2.0825	2.23224	1.11612	-1.4695	5.6345
Total	33	3.4591	2.28732	.39817	2.6480	4.2701

ตารางที่ 35 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ นานอก ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีเพอโรกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

NANOG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	125.218	7	17.888	10.597	.000
Within Groups	42.201	25	1.688		
Total	167.419	32			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NANOG

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.

0.1%DMSO	DFX+0.1%DMSO	-4.81125*	.79562	.000
	Res5uM	-2.28000	.99232	.846
	Res10uM	-1.24333	.99232	1.000
	Res20uM	-.86750	.91871	1.000
	Oxy5uM	-1.18667	.99232	1.000
	Oxy10uM	-5.18250*	.91871	.000
	Oxy20uM	-1.08250	.91871	1.000
DFX+0.1%DMSO	0.1%DMSO	4.81125*	.79562	.000
	Res5uM	2.53125	.87960	.226
	Res10uM	3.56792*	.87960	.012
	Res20uM	3.94375*	.79562	.001
	Oxy5uM	3.62458*	.87960	.010
	Oxy10uM	-.37125	.79562	1.000
	Oxy20uM	3.72875*	.79562	.002
Res5uM	0.1%DMSO	2.28000	.99232	.846
	DFX+0.1%DMSO	-2.53125	.87960	.226
	Res10uM	1.03667	1.06083	1.000
	Res20uM	1.41250	.99232	1.000
	Oxy5uM	1.09333	1.06083	1.000
	Oxy10uM	-2.90250	.99232	.202
	Oxy20uM	1.19750	.99232	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	1.24333	.99232	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.56792*	.87960	.012
	Res5uM	-1.03667	1.06083	1.000
	Res20uM	.37583	.99232	1.000
	Oxy5uM	.05667	1.06083	1.000
	Oxy10uM	-3.93917*	.99232	.015
	Oxy20uM	.16083	.99232	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	.86750	.91871	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.94375*	.79562	.001
	Res5uM	-1.41250	.99232	1.000

	Res10uM	-.37583	.99232	1.000
	Oxy5uM	-.31917	.99232	1.000
	Oxy10uM	-4.31500*	.91871	.002
	Oxy20uM	-.21500	.91871	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	1.18667	.99232	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.62458*	.87960	.010
	Res5uM	-1.09333	1.06083	1.000
	Res10uM	-.05667	1.06083	1.000
	Res20uM	.31917	.99232	1.000
	Oxy10uM	-3.99583*	.99232	.013
	Oxy20uM	.10417	.99232	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	5.18250*	.91871	.000
	DFX+0.1%DMSO	.37125	.79562	1.000
	Res5uM	2.90250	.99232	.202
	Res10uM	3.93917*	.99232	.015
	Res20uM	4.31500*	.91871	.002
	Oxy5uM	3.99583*	.99232	.013
	Oxy20uM	4.10000*	.91871	.004
Oxy20uM	0.1%DMSO	1.08250	.91871	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-3.72875*	.79562	.002
	Res5uM	-1.19750	.99232	1.000
	Res10uM	-.16083	.99232	1.000
	Res20uM	.21500	.91871	1.000
	Oxy5uM	-.10417	.99232	1.000
	Oxy10uM	-4.10000*	.91871	.004

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 36 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

VEGF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.1%DMSO	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
DFX+0.1%DMSO	7	2.8514	.81879	.30947	2.0942	3.6087
Res5uM	3	.4800	.01000	.00577	.4552	.5048
Res10uM	3	.5200	.16523	.09539	.1096	.9304
Res20uM	3	.3133	.08021	.04631	.1141	.5126
Oxy5uM	3	.6800	.04000	.02309	.5806	.7794
Oxy10uM	6	2.0317	.68875	.28118	1.3089	2.7545
Oxy20uM	3	.6700	.14526	.08386	.3092	1.0308
Total	32	1.3794	1.07513	.19006	.9917	1.7670

ตารางที่ 37 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ วิอีจีเอฟ ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลหรือออกซิเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

ANOVA

VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.326	7	4.189	15.451	.000
Within Groups	6.507	24	.271		
Total	35.833	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VEGF

Bonferroni

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0.1%DMSO	DFX+0.1%DMSO	-1.85143*	.32637	.000
	Res5uM	-.52000	.39770	1.000
	Res10uM	-.48000	.39770	1.000
	Res20uM	-.68667	.39770	1.000
	Oxy5uM	-.32000	.39770	1.000
	Oxy10uM	-1.03167	.33612	.147
	Oxy20uM	-.33000	.39770	1.000
DFX+0.1%DMSO	0.1%DMSO	1.85143*	.32637	.000
	Res5uM	2.37143*	.35933	.000
	Res10uM	2.33143*	.35933	.000
	Res20uM	2.53810*	.35933	.000
	Oxy5uM	2.17143*	.35933	.000
	Oxy10uM	.81976	.28970	.259
	Oxy20uM	2.18143*	.35933	.000
Res5uM	0.1%DMSO	-.52000	.39770	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.37143*	.35933	.000
	Res10uM	-.04000	.42516	1.000
	Res20uM	-.16667	.42516	1.000

	Oxy5uM	-.20000	.42516	1.000
	Oxy10uM	-1.55167*	.36820	.009
	Oxy20uM	-.19000	.42516	1.000
Res10uM	0.1%DMSO	-.48000	.39770	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.33143*	.35933	.000
	Res5uM	.04000	.42516	1.000
	Res20uM	.20667	.42516	1.000
	Oxy5uM	-.16000	.42516	1.000
	Oxy10uM	-1.51167*	.36820	.011
	Oxy20uM	-.15000	.42516	1.000
Res20uM	0.1%DMSO	-.68667	.39770	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.53810*	.35933	.000
	Res5uM	-.16667	.42516	1.000
	Res10uM	-.20667	.42516	1.000
	Oxy5uM	-.36667	.42516	1.000
	Oxy10uM	-1.71833*	.36820	.003
	Oxy20uM	-.35667	.42516	1.000
Oxy5uM	0.1%DMSO	-.32000	.39770	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.17143*	.35933	.000
	Res5uM	.20000	.42516	1.000
	Res10uM	.16000	.42516	1.000
	Res20uM	.36667	.42516	1.000
	Oxy10uM	-1.35167*	.36820	.034
	Oxy20uM	.01000	.42516	1.000
Oxy10uM	0.1%DMSO	1.03167	.33612	.147
	DFX+0.1%DMSO	-.81976	.28970	.259
	Res5uM	1.55167*	.36820	.009
	Res10uM	1.51167*	.36820	.011
	Res20uM	1.71833*	.36820	.003
	Oxy5uM	1.35167*	.36820	.034
	Oxy20uM	1.36167*	.36820	.032

Oxy20uM	0.1%DMSO	-.33000	.39770	1.000
	DFX+0.1%DMSO	-2.18143*	.35933	.000
	Res5uM	.19000	.42516	1.000
	Res10uM	.15000	.42516	1.000
	Res20uM	.35667	.42516	1.000
	Oxy5uM	-.01000	.42516	1.000
	Oxy10uM	-1.36167*	.36820	.032

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 38 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน บ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด ซิตี-44 และ ซิตี-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยดีฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
CD44	Ctrl	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
	DFX	4	1.6825	.25052	.12526	1.2839	2.0811
	Res	3	1.2300	.04000	.02309	1.1306	1.3294
	Res+DFX	3	1.2333	.03215	.01856	1.1535	1.3132
	Total	14	1.2943	.29953	.08005	1.1213	1.4672
CD105	Ctrl	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000
	DFX	3	1.3167	.09452	.05457	1.0819	1.5515
	Res	3	.9067	.05132	.02963	.7792	1.0341
	Res+DFX	3	.9633	.01155	.00667	.9346	.9920

Total	12	1.0467	.17275	.04987	.9369	1.1564
-------	----	--------	--------	--------	-------	--------

ตารางที่ 39 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด ซิติ-44 และ ซิติ-105 ในเซลล์ HN-30 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยติเฟอรอกซามีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni



		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD44	Between Groups	.973	3	.324	16.754	.000
	Within Groups	.194	10	.019		
	Total	1.166	13			
CD105	Between Groups	.305	3	.102	34.743	.000
	Within Groups	.023	8	.003		
	Total	.328	11			

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CD44	Ctrl	DFX	-.68250*	.09837	.000	-1.0048	-.3602
		Res	-.23000	.10625	.334	-.5782	.1182
		Res+DFX	-.23333	.10625	.317	-.5815	.1148
	DFX	Ctrl	.68250*	.09837	.000	.3602	1.0048
		Res	.45250*	.10625	.010	.1043	.8007
		Res+DFX	.44917*	.10625	.011	.1010	.7973

	Res	Ctrl	.23000	.10625	.334	-.1182	.5782
		DFX	-.45250*	.10625	.010	-.8007	-.1043
		Res+DFX	-.00333	.11359	1.000	-.3756	.3689
	Res+DFX	Ctrl	.23333	.10625	.317	-.1148	.5815
		DFX	-.44917*	.10625	.011	-.7973	-.1010
		Res	.00333	.11359	1.000	-.3689	.3756
CD105	Ctrl	DFX	-.31667*	.04416	.001	-.4703	-.1630
		Res	.09333	.04416	.405	-.0603	.2470
		Res+DFX	.03667	.04416	1.000	-.1170	.1903
	DFX	Ctrl	.31667*	.04416	.001	.1630	.4703
		Res	.41000*	.04416	.000	.2564	.5636
		Res+DFX	.35333*	.04416	.000	.1997	.5070
	Res	Ctrl	-.09333	.04416	.405	-.2470	.0603
		DFX	-.41000*	.04416	.000	-.5636	-.2564
		Res+DFX	-.05667	.04416	1.000	-.2103	.0970
	Res+DFX	Ctrl	-.03667	.04416	1.000	-.1903	.1170
		DFX	-.35333*	.04416	.000	-.5070	-.1997
		Res	.05667	.04416	1.000	-.0970	.2103

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอาทิตย์ อมรทวีชัย เกิดเมื่อวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2531 เข้าศึกษาในหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอม
เกล้าธนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2549 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาในระดับปริญญาโท
บ้านเลขที่ 60/44 หมู่ 7 หมู่บ้านเบญจสุข ซอยสุขสวัสดิ์ 76 ตำบลบางจาก อำเภอพระประแดง
จังหวัดสมุทรปราการ 10130



รายการอ้างอิง

- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, *24*(5A), 2783-2840.
- Almeida, L., Vaz-da-Silva, M., Falcao, A., Soares, E., Costa, R., Loureiro, A. I., Fernandes-Lopes, C., Rocha, J. F., Nunes, T., Wright, L., & Soares-da-Silva, P. (2009). Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*, *53 Suppl 1*, S7-15. doi: 10.1002/mnfr.200800177
- Bauer, N., Liu, L., Aleksandrowicz, E., & Herr, I. (2014). Establishment of hypoxia induction in an in vivo animal replacement model for experimental evaluation of pancreatic cancer. *Oncol Rep*, *32*(1), 153-158. doi: 10.3892/or.2014.3196
- Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)*, *2*(5), 409-418. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0160
- Bourguignon, L. Y., Wong, G., Earle, C., & Chen, L. (2012). Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*, *287*(39), 32800-32824. doi: 10.1074/jbc.M111.308528
- Burri, R. J., & Lee, N. Y. (2009). Concurrent chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, *9*(3), 293-302. doi: 10.1586/14737140.9.3.293
- Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Ferrando, U., & Camussi, G. (2008). Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J*, *22*(10), 3696-3705. doi: 10.1096/fj.08-102590
- Chen, Y. C., Chen, Y. W., Hsu, H. S., Tseng, L. M., Huang, P. I., Lu, K. H., Chen, D. T., Tai, L. K., Yung, M. C., Chang, S. C., Ku, H. H., Chiou, S. H., & Lo, W. L. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head

- and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 385(3), 307-313. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.048
- Chiou, S. H., Yu, C. C., Huang, C. Y., Lin, S. C., Liu, C. J., Tsai, T. H., Chou, S. H., Chien, C. S., Ku, H. H., & Lo, J. F. (2008). Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 14(13), 4085-4095. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4404
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., & Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66(19), 9339-9344. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126
- Clay, M. R., Tabor, M., Owen, J. H., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wolf, G. T., Wicha, M. S., & Prince, M. E. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*, 32(9), 1195-1201. doi: 10.1002/hed.21315
- Cui, J., Sun, R., Yu, Y., Gou, S., Zhao, G., & Wang, C. (2010). Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytother Res*, 24(11), 1637-1644. doi: 10.1002/ptr.3157
- Das, B., Tsuchida, R., Malkin, D., Koren, G., Baruchel, S., & Yeger, H. (2008). Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells*, 26(7), 1818-1830. doi: 10.1634/stemcells.2007-0724
- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., & Kumar, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*, 17(9), 984-992. doi: 10.1096/fj.02-0634rev
- ElAttar, T. M., & Virji, A. S. (1999). Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anticancer Drugs*, 10(2), 187-193.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian

- homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.
- Gomez-Esquer, F., Agudo, D., Martinez-Arribas, F., Nunez-Villar, M. J., & Schneider, J. (2004). mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer Res*, 24(3a), 1581-1585.
- Goodwin Jinesh, G., Willis, D. L., & Kamat, A. M. (2014). Bladder cancer stem cells: biological and therapeutic perspectives. *Curr Stem Cell Res Ther*, 9(2), 89-101.
- Harper, L. J., Piper, K., Common, J., Fortune, F., & Mackenzie, I. C. (2007). Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 36(10), 594-603. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00617.x
- Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*, 8(20), 3274-3284. doi: 10.4161/cc.8.20.9701
- Hou, F., Dai, Y., Dornhoffer, J. R., Suen, J. Y., Fan, C. Y., Saad, A. G., Buckmiller, L. M., & Richter, G. T. (2013). Expression of endoglin (CD105) and endothelial nitric oxide synthase in head and neck arteriovenous malformations. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 139(3), 237-243. doi: 10.1001/jamaoto.2013.1769
- Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., Brown, K., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2011). Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4(9), 1419-1425. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148
- Huang, C. E., Yu, C. C., Hu, F. W., Chou, M. Y., & Tsai, L. L. (2014). Enhanced chemosensitivity by targeting Nanog in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Mol Sci*, 15(9), 14935-14948. doi: 10.3390/ijms150914935
- In, K., Park, J., & Park, H. (2006). Resveratrol at high doses acts as an apoptotic inducer in endothelial cells. *Cancer Res Treat*, 38(1), 48-53. doi: 10.4143/crt.2006.38.1.48

- JANG, D., KANG, B., RYU, S., CHANG, I., MIN, K., & KIM, Y. (1999). Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem Pharmacol*, *57*, 702-712.
- Jin, F., Zhao, L., Guo, Y. J., Zhao, W. J., Zhang, H., Wang, H. T., Shao, T., Zhang, S. L., Wei, Y. J., Feng, J., Jiang, X. B., & Zhao, H. Y. (2010). Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain Res*, *1336*, 103-111. doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.005
- Keberle, H. (1964). The Biochemistry of Desferrioxamine and Its Relation to Iron Metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, *119*, 758-768.
- Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, *129*(3), 465-472. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.019
- Ketkaew, Y., Osathanon, T., Pavasant, P., & Sooampon, S. (2016). Apigenin inhibited hypoxia induced stem cell marker expression in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Archives of Oral Biology*, *74*(2017), 69-74.
- Kim, Y., Lin, Q., Glazer, P. M., & Yun, Z. (2009). Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation. *Curr Mol Med*, *9*(4), 425-434.
- Kokko, L. L., Hurme, S., Maula, S. M., Alanen, K., Grenman, R., Kinnunen, I., & Ventela, S. (2011). Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol*, *47*(6), 510-516. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.03.026
- Krishnamurthy, S., & Nor, J. E. (2012). Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res*, *91*(4), 334-340. doi: 10.1177/0022034511423393
- LaBarge, M. A., & Bissell, M. J. (2008). Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? *J Clin Invest*, *118*(6), 2021-2024. doi: 10.1172/JCI36046
- Lee, J. H., Choi, S. H., Baek, M. W., Kim, M. H., Kim, H. J., Kim, S. H., Oh, S. J., Park, H. J., Kim, W. J., & Jung, J. Y. (2013). CoCl₂ induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biochem*, *379*(1-2), 133-140. doi: 10.1007/s11010-013-1635-5

- Lee, K. W., & Lee, H. J. (2006). The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors*, *26*(2), 105-121.
- Li, P., Zhou, C., Xu, L., & Xiao, H. (2013). Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci*, *10*(4), 399-407. doi: 10.7150/ijms.5407
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*, *15*(6), 501-513. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.018
- Li, Z., & Rich, J. N. (2010). Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr Top Microbiol Immunol*, *345*, 21-30. doi: 10.1007/82_2010_75
- Liang, X., Yang, D., Hu, J., Hao, X., Gao, J., & Mao, Z. (2008). Hypoxia inducible factor- α expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, *28*(3A), 1659-1666.
- Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., & Horn, T. F. (2003). Oxysresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*, *9*(2), 64-76.
- Major, A. G., Pitty, L. P., & Farah, C. S. (2013). Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int*, *2013*, 319489. doi: 10.1155/2013/319489
- Marioni, G., Gaio, E., Giacomelli, L., Marchese-Ragona, R., Staffieri, C., Staffieri, A., & Marino, F. (2005). Endoglin (CD105) expression in head and neck basaloid squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*, *125*(3), 307-311.
- Markus, M. A., & Morris, B. J. (2008). Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging*, *3*(2), 331-339.
- Milosevic, J., Adler, I., Manaenko, A., Schwarz, S. C., Walkinshaw, G., Arend, M., Flippin, L. A., Storch, A., & Schwarz, J. (2009). Non-hypoxic stabilization of hypoxia-

- inducible factor alpha (HIF-alpha): relevance in neural progenitor/stem cells. *Neurotox Res*, 15(4), 367-380. doi: 10.1007/s12640-009-9043-z
- Mukherjee, S., Dudley, J. I., & Das, D. K. (2010). Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*, 8(4), 478-500. doi: 10.2203/dose-response.09-015.Mukherjee
- Nasapon, P., Ampai, P., Maitree, S., & Leelapornpisid, P. (2010). Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. . *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 4, 454-461.
- Nasapon, P., Ampai, P., Maitree, S., & Pimporn, L. (2010). Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. . *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 4(03), 454-461.
- Nassiri, F., Cusimano, M. D., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G. M., Syro, L. V., Kovacs, K., & Lloyd, R. V. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*, 31(6), 2283-2290.
- Nguyen, A. V., Martinez, M., Stamos, M. J., Moyer, M. P., Planutis, K., Hope, C., & Holcombe, R. F. (2009). Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer Manag Res*, 1, 25-37.
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24(4), 372-376. doi: 10.1038/74199
- Oi, N., Jeong, C. H., Nadas, J., Cho, Y. Y., Pugliese, A., Bode, A. M., & Dong, Z. (2010). Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene A(4)hydrolase. *Cancer Res*, 70(23), 9755-9764. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2858
- Pandey, P. R., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Liu, W., Kobayashi, A., Xing, F., Fukuda, K., Hirota, S., Sugai, T., Wakabayashi, G., Koeda, K., Kashiwaba, M., Suzuki, K.,

- Chiba, T., Endo, M., Fujioka, T., Tanji, S., Mo, Y. Y., Cao, D., Wilber, A. C., & Watabe, K. (2011). Resveratrol suppresses growth of cancer stem-like cells by inhibiting fatty acid synthase. *Breast Cancer Res Treat*, *130*(2), 387-398. doi: 10.1007/s10549-010-1300-6
- Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., & Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, *359*(6398), 845-848. doi: 10.1038/359845a0
- Pries, R., Witkopf, N., Trenkle, T., Nitsch, S. M., & Wollenberg, B. (2008). Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer. *In Vivo*, *22*(1), 89-92.
- Prince, M. E., & Ailles, L. E. (2008). Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol*, *26*(17), 2871-2875. doi: 10.1200/JCO.2007.15.1613
- Prince, M. E., R, S., A, K., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., & Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *PNAS*, *104*(3), 973-978.
- Read, T. A., Fogarty, M. P., Markant, S. L., McLendon, R. E., Wei, Z., Ellison, D. W., Febbo, P. G., & Wechsler-Reya, R. J. (2009). Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell*, *15*(2), 135-147. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.016
- Reers, S., Pfannerstill, A. C., Maushagen, R., Pries, R., & Wollenberg, B. (2014). Stem cell profiling in head and neck cancer reveals an Oct-4 expressing subpopulation with properties of chemoresistance. *Oral Oncol*, *50*(3), 155-162. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.12.006
- S.M., S. (2014). Chungmirae extracts containing resveratrol and oxyresveratrol induced apoptosis of colorectal and hepato carcinoma cell through mitochondrial-dependent pathway. *PharmaNutrition* *2*, 75-119.
- Serena, T., & Eugenia, A. (2012). Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *PMC*, 379-383.
- Shankar, S., Nall, D., Tang, S. N., Meeker, D., Passarini, J., Sharma, J., & Srivastava, R. K. (2011). Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in

- human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 6(1), e16530. doi: 10.1371/journal.pone.0016530
- Shimoda, L. A. (2012). 55th Bowditch Lecture: Effects of chronic hypoxia on the pulmonary circulation: role of HIF-1. *J Appl Physiol (1985)*, 113(9), 1343-1352. doi: 10.1152/jappphysiol.00843.2012
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396-401. doi: 10.1038/nature03128
- Sintuyanon, N., Phoolcharoen, W., & Soompon, S. (2014). *Antiproliferative and Antiangiogenic Effects of Oxyresveratrol in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Paper presented at the Advanced Pharmacology in Drug Development: Towards The ASEAN Union, Mahidol University.
- Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*, 41(2-3), 375-383. doi: 10.1007/s12035-010-8111-y
- Sun, H. Y., Xiao, C. F., Cai, Y. C., Chen, Y., Wei, W., Liu, X. K., Lv, Z. L., & Zou, Y. (2010). Efficient synthesis of natural polyphenolic stilbenes: resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 58(11), 1492-1496.
- Sunar, U. (2013). Monitoring photodynamic therapy of head and neck malignancies with optical spectroscopies. *World J Clin Cases*, 1(3), 96-105. doi: 10.12998/wjcc.v1.i3.96
- Takase, Y., Kai, K., Masuda, M., Akashi, M., & Tokunaga, O. (2010). Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract*, 206(11), 725-730. doi: 10.1016/j.prp.2010.05.015
- Tannishtha, R., Sean, J. M., Michael, F. C., & Irving, L. W. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-111. doi: 10.1038/35102167
- Triantafyllou, A., Liakos, P., Tsakalof, A., Georgatsou, E., Simos, G., & Bonanou, S. (2006). Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic Res*, 40(8), 847-856. doi: 10.1080/10715760600730810

- Trincheri, N. F., Follo, C., Nicotra, G., Peracchio, C., Castino, R., & Isidoro, C. (2008). Resveratrol-induced apoptosis depends on the lipid kinase activity of Vps34 and on the formation of autophagolysosomes. *Carcinogenesis*, *29*(2), 381-389. doi: 10.1093/carcin/bgm271
- Trincheri, N. F., Nicotra, G., Follo, C., Castino, R., & Isidoro, C. (2007). Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis*, *28*(5), 922-931. doi: 10.1093/carcin/bgl223
- Tsai, L. L., Yu, C. C., Chang, Y. C., Yu, C. H., & Chou, M. Y. (2011). Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, *40*(8), 621-628. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01015.x
- van Ginkel, P. R., Sareen, D., Subramanian, L., Walker, Q., Darjatmoko, S. R., Lindstrom, M. J., Kulkarni, A., Albert, D. M., & Polans, A. S. (2007). Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin Cancer Res*, *13*(17), 5162-5169. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0347
- Varoni, E. M., Lo Faro, A. F., Sharifi-Rad, J., & Iriti, M. (2016). Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Front Nutr*, *3*, 8. doi: 10.3389/fnut.2016.00008
- Vaz-da-Silva, M., Loureiro, A. I., Falcao, A., Nunes, T., Rocha, J. F., Fernandes-Lopes, C., Soares, E., Wright, L., Almeida, L., & Soares-da-Silva, P. (2008). Effect of food on the pharmacokinetic profile of trans-resveratrol. *Int J Clin Pharmacol Ther*, *46*(11), 564-570.
- Vinogradov, S., & Wei, X. (2012). Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, *7*(4), 597-615. doi: 10.2217/nnm.12.22
- Wahl, E. A., Schenck, T. L., Machens, H. G., & Balmayor, E. R. (2016). VEGF released by deferoxamine preconditioned mesenchymal stem cells seeded on collagen-GAG substrates enhances neovascularization. *Sci Rep*, *6*, 36879. doi: 10.1038/srep36879

- Wang, Y. C., Wu, C., Chen, H., Zheng, Y., Xu, L., & Huang, X. Z. (2011). Antioxidant activities of resveratrol, oxyresveratrol, esveratrol, mulberroside a from cortex mori. *Food Sci.*, *32*, 135-138.
- Woo, K. J., Lee, T. J., Park, J. W., & Kwon, T. K. (2006). Deferoxamine, an iron chelator, enhances HIF-1alpha accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, *343*(1), 8-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.116
- Yang, J., Liu, J., Lyu, X., & Fei, S. (2015). [Resveratrol inhibits cell proliferation and up-regulates MICA/B expression in human colon cancer stem cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, *31*(7), 889-893.
- Yi-Fang Ping, Xia Zhang, & Bian, X.-W. (2015). Cancer stem cells and their vascular niche. *Cancer Lett*, *380*, 561-567.
- Yong, Y., George, H., Tsuneo, F., & David, E. M. (2003). Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia Inducible Factor- α and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia Inducible Factor- α . *JBC*(February 26).
- Zhang, Q., Shi, S., Yen, Y., Brown, J., Ta, J. Q., & Le, A. D. (2010). A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*, *289*(2), 151-160. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.010

รายการอ้างอิง





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอาทิตย์ อมรทวีชัย เกิดเมื่อวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2531 เข้าศึกษาหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอม
เกล้าธนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2549 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาในระดับปริญญาโท
บ้านเลขที่ 60/44 หมู่ 7 หมู่บ้านเบญจสุข ซอยสุขสวัสดิ์ 76 ตำบลบางจาก อำเภอพระประแดง
จังหวัดสมุทรปราการ 10130



