

ผลของอะปิเจนินต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและ
ลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจน



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 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF APIGENIN ON HYPOXIA INDUCED STEM CELL MARKER EXPRESSION IN HEAD
AND NECK CANCER CELL CARCINOMA

Miss Yuwaporn Ketkaew



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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของอะพิเจนินต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็น
เซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูก
เหนี่ยวนำภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจน

โดย

นางสาวยุวภรณ์ เกตุแก้ว

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ร้อยโทหญิง ดร. เนาวรัตน์ สุธัมมาภพพงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรวิทย์ ลิ้มปณสิทธิกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์)

ยวภรณ์ เกตุแก้ว : ผลของอะพิจินินต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน (EFFECT OF APIGENIN ON HYPOXIA INDUCED STEM CELL MARKER EXPRESSION IN HEAD AND NECK CANCER CELL CARCINOMA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ท.ญ. ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ทพ. ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์, 86 หน้า.

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นหนึ่งในสาเหตุของการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรคมะเร็ง การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งหลายชนิด สารสกัดจากธรรมชาติชนิดหนึ่งที่นิยมศึกษาอย่างแพร่หลายถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้แก่ อะพิจินิน อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงผลของสารดังกล่าวในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งยังมีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอะพิจินินต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่ถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มีสเซลล์ 3 ชนิด คือ HN-8, HN-30 และ HSC-3 ผลการทดสอบโดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง มีผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์ HN-30 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งหลอดอาหารได้ดีที่สุด โดยพบการเพิ่มการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *CD44*, *CD105*, *NANOG*, *OCT-4*, *REX1* และ *VEGF* การศึกษาถึงความเป็นพิษของอะพิจินินต่อเซลล์ HN-30 ด้วยเทคนิค MTT colorimetric assay พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์แปรผันตามเวลาและความเข้มข้นของอะพิจินินที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 108.43 μM ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 70.23 μM ที่เวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ การศึกษาด้วยเทคนิค Realtime-PCR ยังพบว่า อะพิจินินที่ความเข้มข้น 40 μM สามารถยับยั้งการแสดงออกของ *NANOG*, *CD44*, *CD105* และ *VEGF* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาด้วยเทคนิค Flow cytometry ซึ่งพบว่าอะพิจินินสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *CD44*, *CD105* และ *STRO-1* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอะพิจินินน่าจะมีความสามารถในการลดจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอ และสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งได้ในอนาคต

สาขาวิชา เกษัตริวิทยา

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5587159420 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA / HYPOXIA / APIGENIN /
CANCER STEM CELLS

YUWAPORN KETKAEW: EFFECT OF APIGENIN ON HYPOXIA INDUCED STEM CELL
MARKER EXPRESSION IN HEAD AND NECK CANCER CELL CARCINOMA. ADVISOR:
ASST. PROF. SIREERAT SOOAMPON, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF.
THANAPHUM OSATHANOON, Ph.D., 86 pp.

Cancer stem cells play an important role in tumor recurrence. Many studies demonstrated that hypoxic condition increased number of cancer stem cells in several tumors. Apigenin is one of the natural products that is widely studied for its anticancer activity in many types of cancer cells. However, little is known about the effect of apigenin on cancer stem cell. The aim of this study is to investigate the effect of apigenin on cancer stem cell marker expression under hypoxia. Three cell lines of head and neck squamous cell carcinoma including HN-8, HN-30 and HSC-3 were used in this study. Effect of hypoxia on mRNA expression of cancer stem cell markers at 6 and 24 h were determined by semi quantitative RT-PCR. We demonstrated that HN-30 cells, which is cancer cell line from esophagus, showed the greatest response to hypoxic condition by increasing the expression of *CD44*, *CD105*, *NANOG*, *OCT-4*, *REX1* and *VEGF* in different time. In HN-30 cell line, cytotoxic effect of apigenin at 24 and 48 h were determined by MTT colorimetric assay. Apigenin significantly decreased cell viability, in a dose- and time-dependent manner. The IC₅₀ values of apigenin at 24 h and 48 h were 108.43 μ M and 70.23 μ M respectively. Using real time RT-PCR, apigenin at a concentration of 40 μ M significantly down-regulated mRNA expression of *CD44*, *NANOG*, and *CD105* under hypoxia. In consistent to mRNA expression, flow cytometry revealed that apigenin (40 μ M) significantly decreased hypoxia-induced the number of CD44+cells, CD105+ cells and STRO-1+ cells. These data suggest that apigenin may reduce the number of cancer stem cells. Therefore our study supports the future usage of apigenin for anticancer therapy.

Field of Study: Pharmacology

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ดังรายนามต่อไปนี้

ผศ.ทญ.ดร. สิริรัตน์ สุอำพัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผศ.ดร.ทพ. ธนภูมิ โอ
สถานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ข้อคิดเห็น
ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำ วิทยานิพนธ์ครั้งนี้

คณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และสอบป้องกันโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่าน
ที่ให้ คำแนะนำ ชี้แนะให้ทราบถึงข้อบกพร่องและแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์

อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้
ถ่ายทอดความรู้ ความใฝ่รู้ ตลอดจนจรรยาบรรณให้แก่ข้าพเจ้า

เพื่อนๆ และพี่ๆ ที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้เป็น
อย่างดี

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และบุคลากรในภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา ทุก
ท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณทุกกำลังใจ ความรัก คำปรึกษาและความช่วยเหลือจากคุณพ่อ คุณแม่
และครอบครัว ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์
ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีทั้งบุคคลที่ได้กล่าวมาข้างต้นและบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	1
สารบัญรูป.....	4
สารบัญตาราง.....	5
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	8
บทที่ 1 บทนำและหลักการ.....	10
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	10
1.2 คำถามงานวิจัย.....	12
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	12
1.4 สมมติฐาน.....	12
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	12
1.6 คำสำคัญ.....	13
1.7 รูปแบบงานวิจัย.....	13
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	13
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.1 โรคมะเร็งศีรษะและลำคอ.....	14
2.2 เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells).....	15
2.3 cancer stem cell marker.....	18
2.3.1 OCT-4.....	18
2.3.2 NANOG.....	19

2.3.3 REX-1.....	20
2.3.4 CD44.....	20
2.3.5 CD73.....	21
2.3.6 CD105	22
2.3.7 STRO-1	22
2.4 นิซของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell niche)	23
2.4.1 สภาวะพร้อมออกซิเจน	23
2.4.2 กลไกการตอบสนองของระดับเซลล์ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจน.....	24
2.4.3 สภาวะพร้อมออกซิเจนต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง .25	
2.5 สมุนไพรกับการรักษาโรคมะเร็ง.....	27
2.5.1 อะพิจินีน (apigenin).....	27
2.5.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของอะพิจินีนในมะเร็งชนิดต่างๆ	27
2.5.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของอะพิจินีนในมะเร็งศีรษะและลำคอ.....	28
2.5.2 การศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินีนในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	30
3.1.1 สารทดสอบ	30
3.1.2 สารเคมีและชุดทดสอบ.....	30
3.1.3 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์.....	31
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	32
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HSC-3, HN-8 และ HN-30	32
3.2.2 การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay).....	32

3.2.3 การวิเคราะห์ผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน <i>NANOG</i> , <i>OCT-4</i> , <i>REX-1</i> , <i>CD44</i> , <i>CD73</i> , <i>CD105</i> และ <i>VEGF</i> ที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	33
3.2.4 การวิเคราะห์ผลของอะพีเจนินต่อการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่พบว่าถูกเหนี่ยวนำด้วยสภาวะพร่องออกซิเจน ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	33
3.2.5 การวิเคราะห์ผลของอะพีเจนินต่อจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่บริเวณผิวเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน ด้วยวิธี Flow cytometry	34
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
4.1 การศึกษาผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง	36
4.2 การศึกษาผลของอะพีเจนินต่อการรอดชีวิตของเซลล์ HN30.....	38
4.3 การศึกษาผลของอะพีเจนินต่อการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจน	40
4.4 ศึกษาผลของอะพีเจนินต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจน	43
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย	45
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	45
5.2 สรุปผลการวิจัย	48
รายการอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก ก รายละเอียดการวิเคราะห์ทางสถิติ	60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	86

สารบัญรูป

รูป 2-1 ภาพแสดงตำแหน่งที่พบมะเร็งศีรษะและลำคอ	15
รูป 2-2 ภาพแสดงการเกิด Self-renewal, Cell proliferation และ Cell differentiation	17
รูป 2-3 รูปแสดงกลไกการจับทำลายของโปรตีน HIF-1 α ภายใต้สภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ (ซ้าย) และการคงอยู่ของโปรตีน HIF-1 α ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน (ขวา)	25
รูป 2-4 รูปแสดงสูตรโครงสร้างของอะพีเจนิน (ที่มา : Pattaraporn, et al., 2009)	29
รูป 4-1 ผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ด้วยเทคนิค semi quantitative RT-PCR	38
รูป 4-2 ค่าความเป็นพิษของอะพีเจนินต่อเซลล์ HN-30 ด้วยเทคนิค MTT assay	39
รูป 4-3 ผลของอะพีเจนินต่อการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR	43
รูป 4-4 ผลของอะพีเจนินต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่บริเวณผิวเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน ด้วยเทคนิค Flow cytometry	44

ตาราง 15 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ VEGF ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง	69
ตาราง 16 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ HN -30 เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	70
ตาราง 17 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ HN-30 เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	70
ตาราง 18 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ OCT-4 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	72
ตาราง 19 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ OCT-4 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	72
ตาราง 20 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ NANOG ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	74
ตาราง 21 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ NANOG ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	74
ตาราง 22 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ REX-1 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1	76
ตาราง 23 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ REX-1 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	76
ตาราง 24 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ CD44 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง	78
ตาราง 25 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD44 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง	78

- ตาราง 26 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ CD105 ในเซลล์มะเร็ง
 ศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็น
 เวลา 6 ชั่วโมง 80
- ตาราง 27 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD105 ในเซลล์มะเร็งศีรษะ
 และลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา
 6 ชั่วโมง 80
- ตาราง 28 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์มะเร็ง
 ศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็น
 เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง 81
- ตาราง 29 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์มะเร็งศีรษะ
 และลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา
 6 และ 24 ชั่วโมง 81
- ตาราง 30 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของจำนวนเซลล์ที่มีการ
 แสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็ง
 ศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะ
 พร่องออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 83
- ตาราง 31 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก
 ในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและ
 ลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะพร่อง
 ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 83

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	Percentage
Ab/Am	Antibiotic/Amphopericin
<i>ALDH</i>	Aldehyde Dehydrogenase
ANOVA	Analysis of variance
ASCs	Adult stem cells
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Carbon dioxide
CoCl ₂	Cobalt (II) 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 บทนำและหลักการ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคมะเร็งศีรษะและลำคอ (Head and neck cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 6 ของโลก [1] บริเวณที่พบมะเร็งชนิดนี้สามารถแบ่งเป็น 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ช่องปาก (oral cavity) คอหอย (pharynx) โพรงจมูก (nasal cavity) และโพรงในกระดูกศีรษะ (sinuses) โดย Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) เป็นเซลล์มะเร็งที่พบมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90 ของมะเร็งในบริเวณศีรษะและลำคอ [2] การรักษาสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดนี้ประกอบด้วย การใช้ยาเคมีบำบัดกลุ่มแพลตินัม (platinum-based chemotherapeutic drugs) การผ่าตัด (surgery) และการฉายรังสี (radiotherapy) อย่างไรก็ตามการ รักษาส่วนใหญ่ยังไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจากมักพบการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรค (tumor recurrence) จากการอ้างอิงข้อมูล 30 ปี ที่ผ่านมามีผู้ป่วย 50–60% ผู้ป่วยจะมีชีวิตรอดเพียง 5 ปี หลังการตรวจพบ [3]

สาเหตุหนึ่งของการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งคือ การคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells) แม้จะเป็นเพียงประชากรกลุ่มเล็กๆ ที่พบภายในก้อนมะเร็ง (tumors) แต่การดำรงอยู่ของเซลล์กลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงของโรค (aggressiveness) การแพร่กระจาย (metastasis) และการต้านต่อการรักษา (therapy resistance) [4] ลักษณะพื้นฐานที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งคือ ความสามารถในการแบ่งตัว ทดแทนตัวเอง (self-renewal) และแปรสภาพเป็นเซลล์ชนิดอื่น (differentiation) การเพิ่มความสามารถในการก่อมะเร็ง (tumorigenic) เมื่อมีการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเข้าสู่หนูทดลอง และเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะมีการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้บนผิวเซลล์ (cell surface marker) ซึ่งไม่พบในเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง [5, 6] จากการศึกษาของ Valerie และคณะ (2010) พบว่าการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) หรือการฉายรังสี สามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งได้ แต่ไม่มีความจำเพาะในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง [7] ดังนั้นการหาแนวทางรักษาที่สามารถกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพน่าจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งได้

ปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง คือ สภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) สภาวะแวดล้อมดังกล่าวมักพบในมะเร็งชนิดก้อน (solid tumor) และมีบทบาทในการเพิ่มจำนวนและการคงอยู่ของลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง [8] จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากโดย Ma YY และคณะ (2011) พบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนจะเหนี่ยวนำให้ Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) และ HIF-2 α มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นและส่งผลกระทบต่อแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ OCT-4 และ NANOG ซึ่งเป็นยีนมาตรฐานที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน [9] ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์มะเร็งสมองโดย Zhizhong และคณะ (2009) ที่พบว่าภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน HIF-2 α มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ OCT-4 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factors) ที่มีบทบาทในการควบคุมการแบ่งตัวทดแทนตัวเองและการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นของเซลล์ต้นกำเนิด [10]

ดังนั้นการรักษาโดยการให้ยาที่มีผลในการลดระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการระบุการมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งซึ่งมักจะเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนน่าจะเป็นวิธีหนึ่งในการลดจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้

สารสกัดจากธรรมชาติและอนุพันธ์เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและได้รับความสนใจศึกษาและพัฒนาเป็นยาในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาผลของอะพิจินิน (4',5,7-trihydroxyflavone) ซึ่งเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่พบได้ในพืช ผัก และผลไม้หลายชนิด ได้แก่ เซเลอรี (celery) หัวหอม แอปเปิ้ล ส้ม และต้นอ่อนข้าวสาลี (wheat sprouts) เป็นต้น [11] การศึกษาเป็นจำนวนมากก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายของอะพิจินิน ได้แก่ ฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง (chemopreventive) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) นอกจากนี้อะพิจินินยังมีผลยับยั้งการเจริญของมะเร็งหลายชนิด [12, 13] โดยจากการศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินินต่อการยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer cells) พบว่าอะพิจินินสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง (angiogenesis) ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 α และ vascular endothelial growth factor (VEGF) [14, 15] การศึกษาในมะเร็งเต้านมพบว่า อะพิจินินมีฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสและสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในระยะ G₂/M การศึกษาผลของอะพิจินินต่อเซลล์มะเร็งตับแสดงให้เห็นว่า อะพิจินินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการปลดปล่อย TNF- α , IFN- γ และเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ caspases [16] การศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินินในมะเร็งศีรษะและลำคอ พบว่า อะพิจินินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipidoxidation) และฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยอะพิจินินสามารถเหนี่ยวนำการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ (Cell cycle arrest) ในระยะ G₂/M [13] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าอะพิจินินสามารถเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสและลดการเกิดฟอสโฟริเลชันของ EGFR และ ErbB2 ที่ตำแหน่งที่จำเพาะต่อการกระตุ้น Ras/Raf/Erk1/2 และ Akt [14] การศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินินต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในปัจจุบันยังมีอยู่อย่างจำกัดจากการศึกษาของ Liu และคณะ (2015) แสดงให้เห็นว่า อะพิจินินสามารถยับยั้งการแบ่งตัวทดแทนตัวเองผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ casein kinase 2 α (CK2 α) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก [15] และจากการศึกษาของ Xu Zhang และคณะ (2014) พบว่าอะพิจินินสามารถลดการแสดงออกของ SALL4 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและลดการกระตุ้น β -catenin ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว [17] แต่การศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินินในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอยังไม่พบแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินินต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนมาตรฐานที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน

1.2 คำถามงานวิจัย

อะพิจินินมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้หรือไม่

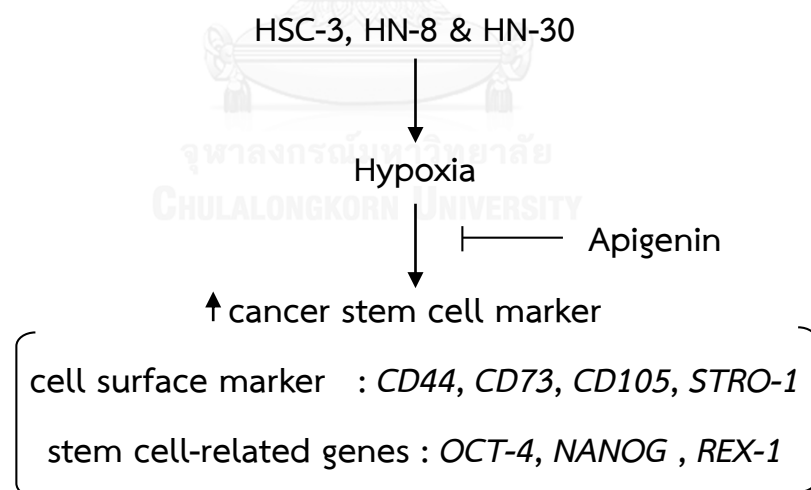
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง
2. เพื่อศึกษาผลของอะพิจินินต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจน

1.4 สมมติฐาน

1. สภาวะพร่องออกซิเจนมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ
2. อะพิจินินมีฤทธิ์ลดการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจน

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย



ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดพร่องออกซิเจน และศึกษาผลของอะพิจินินต่อการลดการแสดงออกยีนดังกล่าวเมื่อถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ HSC-3, HN-8 และ HN-30

1.6 คำสำคัญ

cancer stem cells, hypoxia, apigenin, head and neck cancer cell carcinoma

1.7 รูปแบบงานวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Experimental research)

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงฤทธิ์ของอะพิจินต่อการยับยั้งการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนในเซลล์มะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอชนิดสแควร์มีส เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน จากข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาอะพิจินในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งศีรษะและลำคอต่อไปในอนาคต



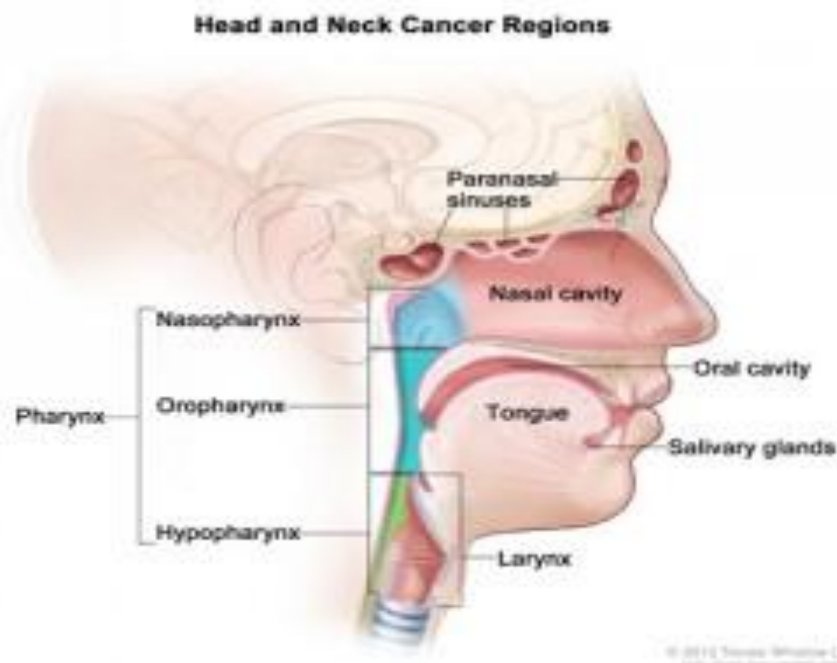
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคมะเร็งศีรษะและลำคอ

โรคมะเร็งศีรษะและลำคอ (Head and neck cancers) เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 6 ของโลก [1] จากข้อมูลในปี 2008 พบว่าประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งที่ริมฝีปาก ช่องปาก และคอหอย 1,500 ราย [18] และข้อมูลจากทั่วโลกในปี 2012 พบว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งศีรษะและลำคอรายใหม่ถึง 650,000 ราย และมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้นี้ 35,000 ราย [19] ผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเป็นผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปี และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงคิดเป็นอัตราส่วนในเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 5 รายต่อ 1 ราย [2] มะเร็งศีรษะและลำคอสามารถพบได้หลายตำแหน่ง ได้แก่ ช่องปาก คอหอย โพรงจมูก และโพรงในกระดูกศีรษะ โดยร้อยละ 90 ของมะเร็งในบริเวณศีรษะและลำคอเป็นเซลล์มะเร็งชนิด squamous carcinoma และอีกร้อยละ 10 ประกอบด้วย lymphomas ซึ่งเป็นมะเร็งที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว adenocarcinoma ซึ่งเป็นมะเร็งที่พัฒนามาจากเซลล์จากต่อมต่างๆของร่างกาย และ sarcomas ซึ่งเป็นมะเร็งที่พัฒนามาจากเซลล์ที่สร้างกล้ามเนื้อ กระดูกอ่อน กระดูกและหลอดเลือด ปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการเกิดมะเร็งชนิดนี้ ได้แก่ การสูบบุหรี่ การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ตำแหน่งที่พบมะเร็ง เพศและอายุของผู้ป่วย การติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น Human Papillomavirus (HPV) ค่าดัชนีมวลกาย (BMI) ที่สูง ประวัติการป่วยเป็นโรคมะเร็งของครอบครัวผู้ป่วย [3, 20] วิธีการในการรักษาโรคมะเร็งศีรษะและลำคอในปัจจุบัน ได้แก่ การผ่าตัด การฉายรังสี และการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด เช่น ยาเคมีบำบัดกลุ่มแพลตินัม ยาในกลุ่มแอนติเมตาบอไลต์ (antimetabolites) และยาในกลุ่มแทคเซน (taxanes) เป็นต้น [1] การรักษาโรคมะเร็งศีรษะและลำคอจะขึ้นอยู่กับการวินิจฉัยของแพทย์ว่ามะเร็งอยู่ในระยะใด โดยสามารถแบ่งประเภทในการรักษาออกเป็น 2 ประเภท คือ มะเร็งในระยะ 1 และระยะ 2 (stage I/II tumors) รักษาโดยการผ่าตัด (surgery) และ/หรือการฉายรังสี (radiation therapy) ส่วนมะเร็งในระยะที่ 3 และระยะ 4 ซึ่งมีการลุกลามไปยังอวัยวะอื่นจะรักษาด้วยการการผ่าตัดร่วมกับการฉายรังสี และ/หรือการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) หรืออาจใช้ทั้ง 3 วิธีคือ การผ่าตัด การฉายรังสี และการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดร่วมกัน โดยสามารถประเมินระยะของโรคได้จาก T (tumor), N (node) และ M (metastasis) [21]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในมะเร็งศีรษะและลำคอและมะเร็งกระดูก พบว่า การให้ยาเคมีบำบัดในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งลงได้ แต่ก็พบการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรคในระยะเวลาต่อมา [7, 22] ทั้งนี้สาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งเป็นเพราะการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดไม่จำเพาะต่อการกำจัดเซลล์กลุ่มหนึ่งภายในก้อนมะเร็ง คือ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง



รูป 2-1 ภาพแสดงตำแหน่งที่พบมะเร็งศีรษะและลำคอ

(ที่มา: <http://www.omegahospitals.com/blog/learning-more-about-head-and-neck-cancer>)

2.2 เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells)

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells) เป็นกลุ่มเซลล์ที่พบได้ในปริมาณที่น้อยมากภายในก้อนมะเร็ง (tumors) จากการประมุขวิชาการเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยสมาคมวิจัยโรคมะเร็งแห่งอเมริกันให้คำนิยามสำหรับเซลล์ต้นกำเนิดว่า เซลล์ดังกล่าวเป็นกลุ่มเซลล์ที่พบในก้อนเนื้องอก โดยเซลล์กลุ่มนี้มีความสามารถในการรักษาสมบัติการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง และเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสามารถสร้างมะเร็งรุ่นใหม่ที่มีลักษณะผสมผสานและประกอบกันเป็นก้อนเนื้องอกได้ [23]

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะมีการแสดงออกของคุณลักษณะเฉพาะตัว แบ่งออกเป็น 4 ประการ คือ

1. การเพิ่มความสามารถในการก่อมะเร็ง (tumorigenic) เมื่อมีการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเข้าสู่หนูทดลอง
2. การพบโปรตีนตัวบ่งชี้บนผิวเซลล์ ซึ่งจะมีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง
3. ก้อนมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะมีลักษณะผสมผสาน ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีและไม่มีความสามารถในการก่อมะเร็ง
4. เซลล์จะมีความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง ที่สามารถรักษาคุณสมบัติดังกล่าวได้เมื่อปลูกถ่ายเข้าสู่สัตว์ทดลองจากรุ่นสู่รุ่น [7]

นอกจากคุณลักษณะเฉพาะดังกล่าวแล้วยังมีคุณสมบัติเฉพาะอื่นๆ ได้แก่ ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) การแปรสภาพเป็นเซลล์อื่น ซึ่งสมบัติดังกล่าวส่งผลต่อการ

แพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) การต้านต่อการรักษา (therapy resistance) และการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง (tumor recurrence) [4]

จากทฤษฎีเซลล์ต้นกำเนิดของโรคมะเร็งที่มีสมมติฐานว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอาจเกิดจากการสะสมตัวของเซลล์ต้นกำเนิดที่กลายพันธุ์ (mutation) หรือเกิดการแบ่งตัวทดแทนตัวเองมากกว่าปกติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังนั้นคุณสมบัติพิเศษของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจึงมีความคล้ายคลึงกับคุณสมบัติพิเศษของเซลล์ต้นกำเนิดปกติ [24]

เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) คือ เซลล์ที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงสามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้และสามารถเกิดการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น

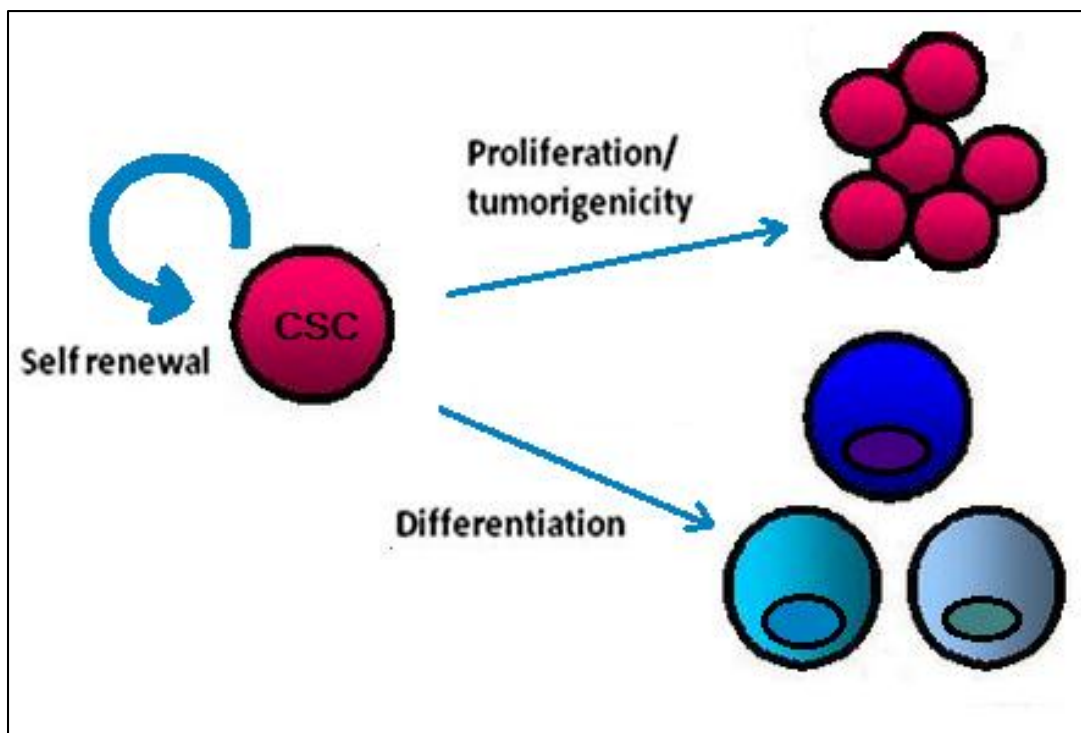
เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาออกเป็น 2 ประเภทหลัก คือ

1. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells; ESCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากกลุ่มเซลล์ชั้นใน (Inner cell mass; ICM) ของตัวอ่อนในระยะบลาสโทซิสต์ (blastocyst) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้จะมีความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ต่างๆของร่างกายได้ทุกชนิด [25]

2. เซลล์ต้นกำเนิดเต็มวัย (adult stem cells; ASCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากอวัยวะต่างๆของวัยผู้ใหญ่ มีความสามารถในการเจริญไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้อย่างจำกัด (multipotent cell) มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวน้อยกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน [26]

โดยคุณสมบัติพิเศษต่างๆของเซลล์ต้นกำเนิดสามารถนิยามได้ ดังนี้

- Self-renewal เป็นกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์และยังได้เซลล์ลูกอย่างน้อย 1 เซลล์ที่ยังคงความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดไว้ได้ [27]
- Cell differentiation เป็นกระบวนการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเซลล์อื่นที่มีความจำเพาะในการตอบสนองต่อการกระตุ้นของร่างกาย
- Cell proliferation เป็นกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์



รูป 2-2 ภาพแสดงการเกิด Self-renewal, Cell proliferation และ Cell differentiation

ความสามารถก่อมะเร็งของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นคุณลักษณะเฉพาะ ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นได้จากการศึกษาของ Hajj MA และคณะ ในปี 2003 พบว่า เมื่อแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจากการแสดงออกของ $CD44$ และ $CD24$ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งเต้านมจะมีการแสดงออกในรูปแบบของ $CD44^+CD24^-$ เมื่อแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกดังกล่าวจากก้อนมะเร็งและปลูกถ่ายเข้าสู่หนูที่ถูกกดการแสดงออกของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย แม้เป็นการปลูกถ่ายโดยใช้เซลล์ในปริมาณที่น้อยมากเพียง 100 เซลล์ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสามารถสร้างก้อนเนื้ออกใหม่ได้ในหนูทดลอง ในขณะที่การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกในรูปแบบอื่นนอกเหนือจาก $CD44^+CD24^-$ โดยใช้เซลล์มากกว่าการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งถึง 100 เท่า หรือปริมาณ 10,000 เซลล์ พบว่า เซลล์มะเร็งไม่สามารถก่อให้เกิดเนื้ออกในหนูทดลองได้ [28]

คุณสมบัติการแบ่งตัวทดแทนตนเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง แสดงให้เห็นได้จากการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและเซลล์มะเร็งโดยใช้วิธี Serial transplantation พบว่า เมื่อปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งและเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจากมนุษย์เข้าสู่หนูทดลอง เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะสามารถเหนี่ยวนำให้หนูตัวรับเกิดมะเร็งได้และมะเร็งที่เกิดขึ้นมีคุณลักษณะเช่นเดียวกับมะเร็งของมนุษย์ ในขณะที่หนูที่ปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งที่ไม่ใช่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะไม่พัฒนาไปเป็นมะเร็ง และเมื่อแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจากหนูตัวแรกมาปลูกถ่ายในหนูตัวที่ 2 และปลูกถ่ายจากหนูตัวที่ 2 ไปสู่หนูตัวต่อไป จะพบว่าเซลล์กลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดมะเร็งในหนูตัวรับได้อย่างต่อเนื่อง เซลล์มะเร็งที่เกิด

จากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีความสามารถในการก่อมะเร็งและเซลล์ที่ไม่มีความสามารถในการก่อมะเร็ง

ความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิด แบ่งออกเป็น 2 แบบหลัก คือ

1. การแบ่งตัวแบบสมมาตร (Symmetric division) การแบ่งตัวแบบนี้เป็นการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มประชากรเซลล์ต้นกำเนิด เนื่องจากเซลล์ลูกที่ได้จากการแบ่งตัวจะคงความสามารถในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ทั้งสองเซลล์

2. แบบอสมมาตร (Asymmetric division) เป็นการแบ่งตัวเซลล์ได้เซลล์ลูกทั้งสองเซลล์มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน คือ เซลล์ต้นกำเนิดที่คงลักษณะเดิมและเซลล์ที่มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะที่จะไม่มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด

ส่วนเซลล์มะเร็งจะมีการเจริญเติบโต โดยมีวงชีพของเซลล์เหมือนเซลล์ปกติ คือ เซลล์จะแบ่งตัวให้เป็นเซลล์มะเร็งสองเซลล์ [29]

2.3 cancer stem cell marker

การระบุการคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดในก้อนมะเร็งสามารถทำได้โดยอาศัยการตรวจวัดแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell marker) ต่างๆ ซึ่งจะมีการแสดงออกในมะเร็งแต่ละชนิดแตกต่างกันไป เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอ มักพบการแสดงออกที่จำเพาะของ cell surface marker ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น *CD44*, *CD73* และ *CD105* เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell-related genes) ได้แก่ *OCT-4*, *NANOG* และ *REX-1* เป็นต้น

2.3.1 OCT-4

OCT-4 ย่อมาจาก Octamer binding transcription factor 4 เป็นยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิดการแบ่งตัวทดแทนตัวเองและแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิด [30] ตัวอย่างเช่น มะเร็งศีรษะและลำคอ [31] มะเร็งเต้านม [32] และมะเร็งปอด [33] เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มการแสดงออกของ *OCT-4* มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง [30] และการต้านต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด [34]

จากการศึกษาของ Chen YC และคณะ (2008) พบว่าในมะเร็งปอด เซลล์ที่มีการแสดงออกของ *CD133* จะพบการแสดงออกของ *OCT-4* ในระดับสูงซึ่งจะสัมพันธ์กับความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเองและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด และพบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ *OCT-4* ในเซลล์มะเร็งปอดที่มีการแสดงออกของ *CD133* จะยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง การสร้างโคโลนีและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสของมะเร็ง [35]

จากการศึกษาของ Dong Z และคณะ (2012) ในผู้ป่วยมะเร็งตับ [36] และการศึกษาของ Chen YC และคณะ (2008) ในมะเร็งปอด [35] พบว่า การแสดงออกของ *OCT-4* ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงของผู้ป่วย อันเนื่องมาจากพบการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งที่เพิ่มขึ้นของการต้านต่อการรักษาด้วยการฉายรังสีและยาเคมีบำบัดซึ่งสอดคล้องกับจากการศึกษาของ Ventela S และคณะ พบว่า การแสดงออกร่วมกันของ *OCT-4* และ CIP2A (ยีนเป้าหมายของ *OCT-4*) มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อยาเคมีบำบัดและความสามารถในการก่อกำเนิดของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ [30]

จากการศึกษาของ Wang YD และคณะ (2013) แสดงให้เห็นว่า *OCT-4* เป็นยีนที่มีบทบาทหลักเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์จำเพาะของเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ และการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ในมะเร็งปากมดลูกพบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *OCT-4* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการแสดงออกในเซลล์ปกติ การแสดงออกมากกว่าปกติของ *OCT-4* จะสัมพันธ์กับการเพิ่มความสามารถในการก่อกำเนิดและยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของมะเร็ง โดย *OCT-4* จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของ miR-125b ซึ่งการแสดงออกของ miR-125b ที่มากกว่าปกติส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน BAK1 ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของมะเร็งปากมดลูก [37]

2.3.2 NANOG

NANOG เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ยีนดังกล่าวที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเองและแปรสภาพเป็นเซลล์อื่นของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ผ่านกลไก LIF/Stat3 [38] และเป็นยีนที่มีการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิด ตัวอย่างเช่น มะเร็งศีรษะและลำคอ [33] มะเร็งเต้านม [39] มะเร็งลำไส้ [40] เป็นต้น จากการการศึกษาของ Yang L และคณะ (2012) ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ พบว่า การแสดงออกของ *NANOG* มีความสัมพันธ์กับการเจริญของมะเร็ง โดยเมื่อระดับการแสดงออกของ *NANOG* ลดลง จะยับยั้งการพัฒนาของมะเร็งด้วยการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและการแสดงออกของ *NANOG* ที่เพิ่มขึ้นจะเหนี่ยวนำการดื้อต่อยาเคมีบำบัดและกระตุ้นการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง [41]

จากการศึกษาของ Meng HM และคณะ (2010) พบว่า การแสดงออกมากกว่าปกติของ *NANOG* มีผลกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของมะเร็ง โดย *NANOG* จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของ Slug และ Snail ซึ่งมีผลควบคุม EMT และการแสดงออกของ *NANOG* สามารถใช้พยากรณ์โรคที่แย่งได้ ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง [42]

จากการศึกษาของ Shan J และคณะ (2012) พบว่า การเพิ่มการแสดงออกของ *NANOG* ในเซลล์มะเร็งจะมีความสัมพันธ์กับผลการรักษาที่แย่งของผู้ป่วยมะเร็งตับ โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *NANOG* จะแสดงความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเอง ความสามารถสร้างโคโลนี และความสามารถก่อกำเนิดในระยะเริ่มต้น ซึ่งสมบัติดังกล่าวสอดคล้องตามคำนิยามของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เซลล์ที่มีการแสดงออกของ *NANOG* จะดื้อต่อยาเคมีบำบัด เช่น sorafenib และ cisplatin และสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็ง การยับยั้งและเพิ่มการแสดงออกของ *NANOG* มีผลต่อการเพิ่มและลดการแสดงออกของ IGF1R และเมื่อยับยั้งการทำงานของ IGF1R จะส่งผลต่อการยับยั้ง

ความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเองและลดการแสดงออกของ *NANOG* ดังนั้นในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *NANOG* มีบทบาทรักษาสมบัติการแบ่งตัวทดแทนตัวเองผ่านกลไกการทำงานของ IGF1R [42]

จากการศึกษาของ Sun C และคณะ (2013) พบว่า *NANOG* เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์หลักที่มีบทบาทแบ่งตัวทดแทนตัวเอง การแสดงออกมากกว่าปกติของ *NANOG* สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งและลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ โดย *NANOG* จะกระตุ้นการทำงานของ NODAL และ CRIPTO-1 ซึ่งจะส่งผลเพิ่มการแสดงออกของ SNAIL และเกิดฟอสโฟรีเลชันของ SMAD3 นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกร่วมกันของ *NANOG* และ P-SMAD3 สามารถใช้ทำนายการพยากรณ์โรคที่แย่งในมะเร็งตับได้ [43]

2.3.3 REX-1

REX-1 (*Zfp-42*) เป็นยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการเกิดการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นและการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน [44] โดยมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการแปรสภาพเป็นเซลล์อื่นของ *REX-1* จะเกิดผ่านการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วย four putative cysteine-histidine (C_2H_2) zinc finger domains ที่มีความคล้ายคลึงกับ Yin Yang-1 (YY1) transcription factor [24]

จากการศึกษาของ Bhandari DR และคณะ (2010) พบว่า *REX-1* เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน มีบทบาทเกี่ยวกับการแปรสภาพเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะผ่านกลไก STAT การแสดงออกของ *REX-1* ในเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ สามารถควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการแปรสภาพเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะโดยยับยั้งการแสดงออกของ p38 MAPK ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ MKK3 การแสดงออกของ *REX-1* ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย สามารถควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการแปรสภาพเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ p38 MAPK [45]

จากการศึกษาของ Son MY และคณะ (2013) พบว่า *REX-1* มีบทบาทเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะของเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ *REX-1* มีการควบคุมเชิงบวกต่อ cyclin B1/B2 ผ่านการเข้าจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ และสามารถเหนี่ยวนำ cyclin B/CDK1 ให้เกิดฟอสโฟรีเลชันของ DRP1 ที่ตำแหน่ง Ser616 นำไปสู่การเกิดไมโทคอนเดรียฟิชชัน [46]

2.3.4 CD44

CD44 เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์ ยีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการในเซลล์ ได้แก่ การเจริญเติบโต การรอดชีวิต การเกิดการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น การเคลื่อนที่ (motility) และมีผลเพิ่มการแพร่กระจายและการเจริญของเซลล์ [47] *CD44* สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอ (HNSCC) โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *CD44* จะมีคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ ความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเอง การแปรสภาพเป็นเซลล์อื่น นอกจากนี้การ

แสดงออกของยีนนี้ยังมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง ด้านต่อการรักษาด้วยการฉายรังสี เพิ่มความเสี่ยงในการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งศีรษะและลำคอ [48]

จากการศึกษาของ Takaishi S และคณะ (2009) พบว่า เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่มีการแสดงออกของ *CD44* จะแสดงความสามารถแบ่งตัวทดแทนตัวเองและการแปรสภาพเป็นเซลล์อื่นที่มีความจำเพาะ เพิ่มการติดต่อยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ *CD44* จะขาดความสามารถในการก่อมะเร็ง โดยการยับยั้ง *CD44* มีผลลดการสร้างโคโลนีและก้อนเนื้ออกจากการปลูกถ่ายเข้าสู่หนูที่ถูกกดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันจะมีขนาดเล็ก [49]

จากการศึกษาของ Kokko LL และคณะ (2011) พบว่า การแสดงออกของ *CD44* มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค การพยากรณ์ของโรคที่แย่งในมะเร็งศีรษะและลำคอ และอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในช่วงระยะเวลา 5 ปีหลังการตรวจพบโรค โดยการแสดงออกมากกว่าปกติของ *CD44* สามารถใช้พยากรณ์ความรุนแรงของโรคได้ในมะเร็งศีรษะและลำคอจากคอหอยและกล่องเสียง ซึ่งสามารถช่วยในการตัดสินใจหาแนวทางในการรักษาโรคต่อไปได้ [48]

จากการศึกษาของ Shigeishi H และคณะ (2014) พบว่าในมะเร็งศีรษะและลำคอ receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) มีความเกี่ยวข้องกับ *CD44* และมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยภายนอกเซลล์ RHAMM จะจับกับ HA และเกิดการทำงานร่วมกับ *CD44* ให้ผลกระตุ้น Ras, MEK1/2 และ ERK1/2 นำไปสู่การกระตุ้นการทรานสคริปชันของยีนที่เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ [50]

จากการศึกษาของ Patel SS และคณะ (2014) พบว่า *CD44* เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่นิยมใช้ศึกษาในมะเร็งชนิดก้อน เซลล์และเนื้อเยื่อมะเร็งศีรษะและลำคอที่มีการแสดงออกของ *CD44* จะแสดงความสามารถก่อมะเร็งและการติดต่อยาเคมีบำบัด การแสดงออกของ *CD44* สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในระยะเวลา 5 ปีและถ้าพบการแสดงออกพร้อมกับ *ALDH* และ *STAT3* จะสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ [51]

2.3.5 *CD73*

CD73 หรือ ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT) เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่มีการแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์และมักพบการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic cells) จากการศึกษาที่หลากหลายก่อนหน้า พบว่า *CD73* มีความเกี่ยวข้องกับ cell-cell และ cell-matrix interactions การติดต่อยาเคมีบำบัด การแพร่กระจายของมะเร็ง [52] มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง [53] มะเร็งเต้านม [54] เป็นต้น

จากการศึกษาของ Stagg J และคณะ (2012) พบว่า *CD73* สามารถกระตุ้นการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน โดยจะย่อยทำลาย extracellular ATP ที่ปลดปล่อยจากเซลล์มะเร็ง (dying cancer cells) ในสภาวะพร่องออกซิเจน นอกจากนี้ *CD73* ยังมีผลกระตุ้นการก่อมะเร็งในระยะเริ่มต้นจากการเหนี่ยวนำของสารก่อมะเร็งและการเจริญของมะเร็ง โดยการยับยั้งการเฝ้าระวังของระบบภูมิคุ้มกัน (immunosurveillance) ผ่าน IFN- γ , NK cells, และ *CD8*⁺ T cells [55]

จากการศึกษาของ Rockenbach L และคณะ (2014) พบว่า การแสดงออกของ *CD73* มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของมะเร็งและก่อความรุนแรงของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มีบทบาทเกี่ยวกับการแพร่กระจาย การหลบหลีกภูมิคุ้มกัน การเจริญของเซลล์มะเร็งและการดื้อต่อยาเคมีบำบัด เป็นต้น [56]

จากการศึกษาของ Allard B และคณะ (2014) พบว่าในมะเร็งเต้านม พบการแสดงออกของ *CD73* มีความเกี่ยวข้องกับผลการรักษาที่แย่งและการดื้อต่อยาเคมีบำบัด โดย *CD73* จะถูกควบคุมการแสดงออกจาก adenosine A2A/A2B receptor [57]

2.3.6 *CD105*

CD105 เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์ มีบทบาทสำคัญในการเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และกระบวนการสร้างโลหิต (hematopoiesis) โดยพบการแสดงออกที่สูงขึ้นที่เยื่อหลอดเลือด (vascular endothelium) ในบริเวณที่เกิดการอักเสบและการเจริญของมะเร็ง [58] และเป็นยีนที่มีการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิด ตัวอย่างเช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก [59] มะเร็งศีรษะและลำคอ [60] และมะเร็งรังไข่ [61] มีรายงานว่า *CD105* มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เยื่อที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferating endothelial cells) และมีการแสดงออกในระดับที่สูงในการสร้างหลอดเลือดเพื่อขยายขอบเขตของมะเร็งชนิดก้อน [59]

จากการศึกษาของ Bock AJ และคณะ (2011) พบว่า *CD105* มีการทำงานร่วมกับ TGF- β และมีบทบาทเกี่ยวกับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเซลล์มะเร็งรังไข่ และกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งผ่านสภาวะพร่องออกซิเจน ในเซลล์มะเร็งมักพบการแสดงออกของ *CD105* ที่บริเวณเซลล์บุผนังหลอดเลือด ไฮโปทาลัสซิม [61]

จากการศึกษาของ Allard B และคณะ (2014) *CD105* มีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมสมดุลภายในหลอดเลือด จะพบการแสดงออกที่เซลล์บุผนังหลอดเลือด, monocytes, neural crest stem cells, adult bone marrow เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง, macrophages, stromal cells และ fibroblasts กลไกการทำงานของ *CD105* จะเข้าจับกับ TGF- β 1 และ TGF- β 3 (type II receptor) และ *CD105* ที่บริเวณภายนอกเซลล์และในไฮโปทาลัสซิม มีกลไกการทำงานผ่านการจับ T β RII และ type I receptors ALK5 และ ALK1 [62]

2.3.7 *STRO-1*

STRO-1 (stromal precursor antigen-1) เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่มีการแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์ เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่แสดงออกบริเวณผิวเซลล์ของเซลล์จากไขกระดูกในชั้นสโตรมอล (stromal BM cells) สามารถใช้ในการระบุแยกและใช้อธิบายลักษณะของ human BM stromal cell

โดยจากการศึกษาของ Klonisch และคณะ (2008) พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cell ; MSC) ที่มีการแสดงออกของ *STRO-1* จะมีความสามารถในการแปร

สภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้แก่ hematopoiesis-supportive stromal cells, pericytes, adipocytes, myofibroblasts, myocytes, cardiomyocytes, osteoblasts, chondrocytes และ neurons [63]

จากการศึกษาของ Hernanda PY และคณะ (2013) พบว่า เซลล์มะเร็งระดับจะพบการแสดงออกของ *STRO-1* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ จะพบเซลล์ดังกล่าวได้ที่หลอดเลือดฝอยและหลอดเลือดดำที่ตับ บริเวณที่มีการอักเสบของตับ [64]

จากการศึกษาของ Laothumthut T และคณะ (2015) เซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟัน ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันจะมีการแสดงออกของ *STRO-1* โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *STRO-1* มีบทบาทต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ [65]

นอกจากนี้การแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค การแพร่กระจายของมะเร็ง และการดื้อต่อวิธีการฉายรังสีหรือการให้ยาเคมีบำบัด [66]

การต่อการรักษาของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เกิดจากหลายปัจจัย คือ

1. เซลล์อยู่ในภาวะสงบ โดยจะพักตัวอยู่ในระยะจี 0 (G₀)
2. เซลล์มีความสามารถในการซ่อมแซมระดับดีเอ็นเอ
3. เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนบริเวณผิวเซลล์ที่มีบทบาทในการกำจัดยาออกจากเซลล์ในระดับที่สูง
4. เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนที่ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส
5. สภาพแวดล้อมที่เซลล์ดำรงอยู่

2.4 นิชของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell niche)

นิชเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง คือ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และมีบทบาทในการรักษาคุณสมบัติเฉพาะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น การแบ่งตัวทดแทนตนเอง ตัวอย่างนิชที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ หลอดเลือด [67] และสภาวะพร่องออกซิเจน [10]

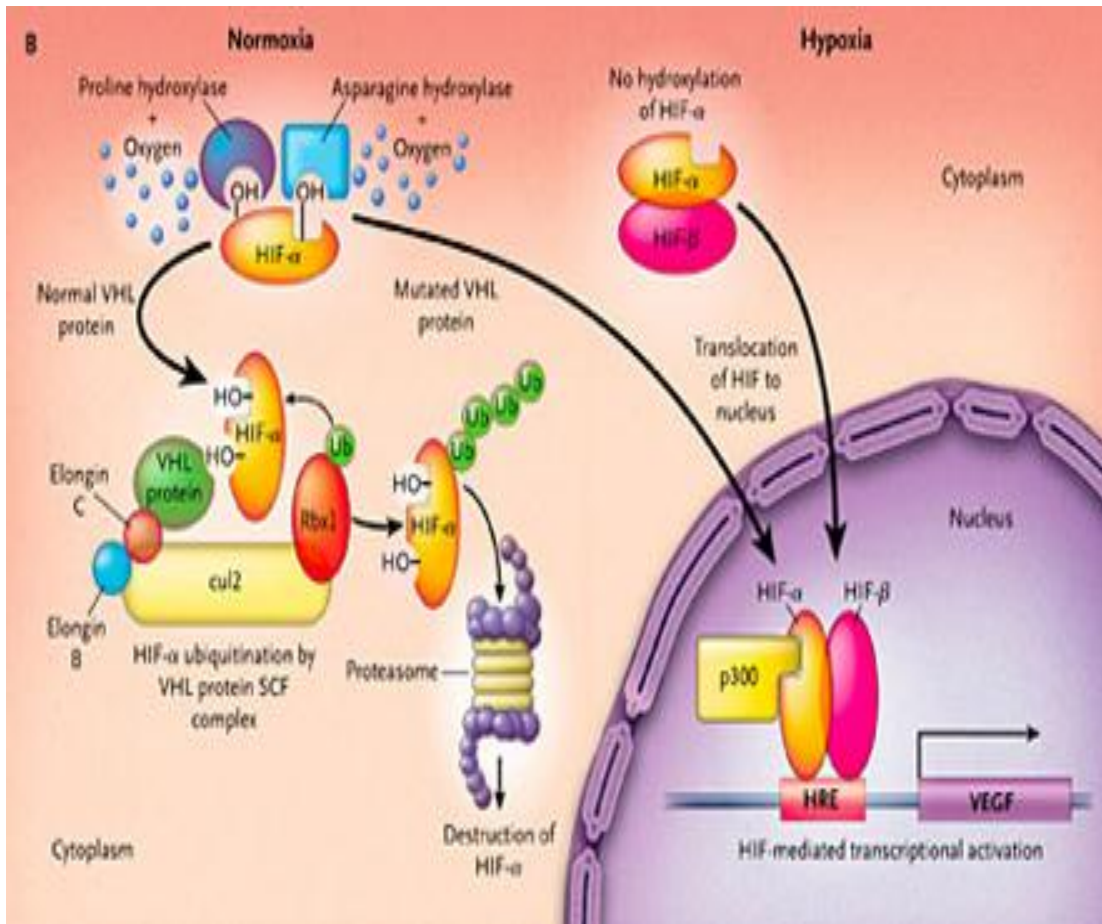
2.4.1 สภาวะพร่องออกซิเจน

สภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) เป็นนิชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง พบได้ในมะเร็งทุกชนิดที่มีลักษณะเป็นก้อน (solid tumors) และมีบทบาทควบคุมลักษณะทางชีวภาพของมะเร็งอย่างหลากหลาย ได้แก่ สนับสนุนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง และดื้อต่อยาเคมีบำบัด [5] โดยสภาวะพร่องออกซิเจนเป็นสภาวะที่มีระดับออกซิเจนลดลงจากสภาวะปกติ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวมากกว่าปกติและพบความผิดปกติในการสร้างหลอดเลือด จากความผิดปกติดังกล่าวนี้ทำให้การนำออกซิเจนและสารอาหารไปเลี้ยงที่บริเวณดังกล่าวไม่เพียงพอ ในสภาวะพร่องออกซิเจนนี้มะเร็งจะมีการปรับตัวโดยสร้างโปรตีนที่มีบทบาทต่อการดำรงอยู่ของก้อนมะเร็ง เช่น โปรตีน *VEGF* ที่มีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือด

ใหม่ของมะเร็ง เป็นต้น โปรตีนเหล่านี้จะถูกควบคุมการแสดงออกด้วยทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่สำคัญคือ HIF-1 α [68]

2.4.2 กลไกการตอบสนองระดับเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน

Hypoxia-inducible factors (HIFs) เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของกระบวนการต่างๆ เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับออกซิเจน โดย HIFs ประกอบด้วย 2 หน่วย คือ แอลฟาหน่วย (HIF- α) และเบต้าหน่วย (HIF- β) ในปัจจุบัน HIF- α ประกอบด้วย 3 ไอโซฟอร์ม คือ HIF-1 α , HIF-2 α และ HIF-3 α โดย HIF-1 α และ HIF-2 α จะมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกัน ความแตกต่างของ 2 ไอโซฟอร์มนี้คือ HIF-1 α จะมีการตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจนในภาวะพยาธิสภาพของร่างกาย ส่วน HIF-2 α จะตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจนในภาวะปกติของร่างกายและ HIF-2 α จะมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างจำเพาะมากกว่า แต่ทั้ง HIF-1 α และ HIF-2 α จะให้ผลควบคุมเชิงบวกของการแสดงออกของยีนหลายชนิด ในขณะที่ HIF-3 α จะให้ผลควบคุมเชิงบวกของการแสดงออกของยีนเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับออกซิเจน [69] ภายใต้สภาวะปกติจะไม่พบการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 α เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวจะถูกทำลายผ่านโปรตีโอโซม (proteasomal) โดยในสภาวะปกติจะมีออกซิเจนเป็นโคแฟคเตอร์ในการทำงานร่วมกับเอนไซม์โพลีไฮดรอกซีเลส (prolyl hydroxylases ; PHD) และเกิดกระบวนการไฮดรอกซีเลชันที่ตำแหน่งกรดอะมิโนโพรลีนในโปรตีนของ HIF-1 α หลังการเกิดกระบวนการไฮดรอกซีเลชันของเอนไซม์ PHD โปรตีน HIF-1 α จะเข้าจับกับโปรตีนวอน ฮิปเพิล-ลินเดา (Von Hippel Lindau ; VHL) ส่งผลให้เกิดกระบวนการยูบิควิตินชัน (ubiquitination) และโปรตีน HIF-1 α จะถูกจับทำลายผ่านโปรตีโอโซม ส่วนกระบวนการไฮดรอกซีเลชันของเอนไซม์ FIH-1 (Factor-inhibiting hypoxia 1) ที่ตำแหน่งแอสพาราจिन ส่งผลยับยั้งการจับกันของโปรตีน HIF-1 α และโปรตีน CBP/p300 ส่งผลให้โปรตีน HIF-1 α ไม่สามารถถูกกระตุ้นการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้ ส่วนในสภาวะพร่องออกซิเจนโปรตีน HIF-1 α จะไม่ถูกจับทำลายผ่านโปรตีโอโซมเนื่องจากสภาวะดังกล่าวจะขาดออกซิเจนซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์จึงไม่เกิดการจับกันระหว่างโปรตีน HIF-1 α และโปรตีน VHL แต่โปรตีน HIF-1 α จะถูกจับกับโปรตีน p300/CBP ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกันของ HIF-1 α และ HIF-1 β และเคลื่อนเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายคือ HRE (hypoxia response element) ภายในนิวเคลียส หลังจากนั้นจะเกิดการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดเพื่อให้เกิดการปรับตัวตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจน [68]



รูป 2-3 รูปแสดงกลไกการจับทำลายของโปรตีน HIF-1 α ภายใต้สภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ (ซ้าย) และการคงอยู่ของโปรตีน HIF-1 α ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน (ขวา) ที่มา:(<http://www.biooncology.com/researcheducation/vegf/tumors/rcc/biology>)

2.4.3 ภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

จากการศึกษาของ Chenggang และคณะ (2003) พบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนมีผลในการกระตุ้นบริเวณ promoter ของ *CD105* และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยการเพิ่มการแสดงออกของ *CD105* ซึ่งมีบทบาทในการปกป้องตัวเองเพื่อเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์บุผนังหลอดเลือดในสภาวะพร่องออกซิเจน [70]

จากการศึกษาของ Kelly และคณะ (2006) และ Yang และคณะ (2009) ในมะเร็งสมอง พบว่า ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน HIF-2 α จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ *OCT-4* ผ่านการเข้าจับที่บริเวณ *OCT-4* promoter [71]

การศึกษาของ Keith B และ Simon MC (2007) พบว่า HIFs มีบทบาทต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน โดยการแสดงออกของ HIFs มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่

เพิ่มขึ้นของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ *OCT-4* ซึ่งการเพิ่มการแสดงออกของยีนนี้จะส่งผลในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการเจริญพัฒนาย้อนกลับ (dedifferentiation) และแสดงลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิด เช่น การแบ่งตัวทดแทนตนเองหรือการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นที่มีผลในการเจริญของเซลล์มะเร็ง [72]

การศึกษาของ Heddleston และคณะ (2010) พบว่า การเพิ่มขึ้นของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจนจะเกิดผ่าน HIF ซึ่งเป็น ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งและมีความสัมพันธ์กับการเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ [8]

จากการศึกษาของ Yuanyuan และคณะ (2011) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนจะเหนี่ยวนำให้ระดับการแสดงออกของ HIF-1 α และ HIF-2 α สูงขึ้นซึ่งจะสัมพันธ์กับการเพิ่มการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ *OCT-4* และ *NANOG* [9]

จากการศึกษาของ John และคณะ (2011) พบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนจะเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *CD73* ผ่านการกระตุ้น HIF-1 α ในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งสมอง มะเร็งผิวหนัง และมะเร็งเต้านม เป็นต้น [55]

จากการศึกษาของ Wang Z และคณะ (2011) พบว่า การระบุการมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งเต้านมจะอาศัยการแสดงออก *CD44* และ *CD24* โดยเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเต้านมจะมีการแสดงออกของ *CD44* แต่จะไม่พบหรือพบการแสดงออกที่น้อยมากของ *CD24* และยังพบว่า ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนจะมีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 α ซึ่งมีผลเพิ่มการแสดงออกของ *CD44* ได้ในมะเร็งเต้านม [73]

จากการศึกษาของ Krishnamachary B และคณะ (2011) พบว่า *CD44* เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์ มีบทบาทต่อการเจริญและการแพร่กระจายของมะเร็ง การเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะพร่องออกซิเจนด้วยแก๊สและ CoCl_2 (200 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะส่งผลเพิ่มการแสดงออกของ *VEGF* และ *CD44* เมื่อเทียบกับที่สภาวะปกติ และพบว่า HIF-1 α ส่งผลต่อการแสดงออกของ *CD44* ที่เพิ่มขึ้นในมะเร็งเต้านม [74]

จากการศึกษาของ Sarah และคณะ (2012) ในมะเร็งเต้านม แสดงให้เห็นว่า สภาวะพร่องออกซิเจนจะขับเคลื่อนให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์ต้นกำเนิดผ่าน HIF-1 α โดยเกิดผ่าน Akt/ β -catenin signaling pathway การทดลองในหลอดทดลอง (in vitro) และสัตว์ทดลอง (in vivo) โดยการกระตุ้น Akt และ Wnt pathway จะส่งผลต่อการเพิ่มการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งเต้านม [75]

จากการศึกษาของ Costa AF และคณะ (2012) พบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนมีผลกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ HIF-1 α ซึ่งสภาวะดังกล่าวไม่เพียงส่งผลเพิ่มการแสดงออกของ *VEGF* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้หลักของการสร้างหลอดเลือดใหม่ แต่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ *CD105* ที่มีการแสดงออกบริเวณเซลล์บุผนังหลอดเลือดในได้มะเร็งต่อมต่อมน้ำลาย [76]

Miyazawa K และคณะ (2013) ศึกษาการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆ คือ *NANOG*, *OCT4*, *CD133* และ *NESTIN* พบว่าในมะเร็งต่อมลูกหมากตัวบ่งชี้ที่มีการ

แสดงออกชัดเจนที่สุดคือ *NANOG* นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของ HIF-1 α มีผลต่อการแสดงออกของ *NANOG* [77]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะพร่องออกซิเจนมีผลเพิ่มการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น *OCT-4*, *NANOG*, *CD44* และ *CD105* เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนายาหรือสารสมุนไพรที่มีผลต่อการลดการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างๆ เหล่านี้ ซึ่งจะมีการเพิ่มการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน น่าจะส่งผลลดจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและสามารถใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต

2.5 สมุนไพรกับการรักษาโรคมะเร็ง

สารสมุนไพรถือเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของการพัฒนายาชนิดต่างๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกาการพัฒนายาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งกว่าร้อยละ 50-60 ได้จากส่วนต่างๆของพืชสมุนไพร [78] ในปัจจุบันสารที่มีผลกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งยังมีการศึกษาที่ค่อนข้างจำกัด จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาและการค้นหาสารสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพรักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต

2.5.1 อะพิจินิน (apigenin)

อะพิจินิน (apigenin ; 4',5,7,-trihydroxyflavone) เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่พบได้ในพืช ผักและผลไม้หลายชนิด ได้แก่ เซเลอรี (celery) หัวหอม แอปเปิ้ล และส้ม เป็นต้น [11] จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอะพิจินินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง (chemopreventive) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของมะเร็งหลายชนิด [13, 79]

2.5.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของอะพิจินินในมะเร็งชนิดต่างๆ

จากการศึกษาของ Liu และคณะ (2005) ในมะเร็งปอด พบว่า อะพิจินินสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดและยับยั้งการแสดงออกของ VEGF ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 α [80]

จากการศึกษาของ Jing และคณะ (2005) พบว่า อะพิจินินมีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง (anti-tumor) โดยสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการแพร่กระจายของมะเร็งผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 และ VEGF ในเซลล์มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer cells) [81]

จากการศึกษาของ Khan TH และคณะ (2005) ผลของอะพิจินินต่อเซลล์มะเร็งตับแสดงให้เห็นว่า อะพิจินินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการปลดปล่อย TNF- α IFN- γ และเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ caspases [16]

จากการศึกษาของ Kaur P และคณะ (2007) ศึกษาผลของอะพิจินินในมะเร็งต่อมลูกหมากในหนู พบว่า หนูที่ได้รับอะพิจินินทางปาก 20 และ 50 ไมโครกรัม ต่อวันเป็นเวลา 6 วันต่อสัปดาห์

นาน 20 สัปดาห์ จะมีปริมาตรของก้อนมะเร็งต่อมลูกหมากที่ลดลงและสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อม้ำเหลียง ปอด และตับของหนู โดยหนูที่ได้รับอะพิเจนินจะมีน้ำหนักของก้อนมะเร็งที่ลดลงเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังสามารถลดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเพิ่มการตายของเซลล์ในมะเร็ง [79]

จากการศึกษาของ Philip B และคณะ (2010) ศึกษาฤทธิ์ของอะพิเจนินในมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) 2 ชนิด คือ myeloid และ erythroid พบว่าอะพิเจนินมีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ผ่านการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะ G₂/M phase ใน myeloid HL60 cells และ G₀/G₁ phase ใน erythroid TF1 cells โดยในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด อะพิเจนินมีผลต่อ JAK/STAT และ PI3K/PKB pathway นอกจากนี้ยังเหนี่ยวนำ caspase-dependent apoptosis ใน HL60 แต่ไม่พบการตายของเซลล์มะเร็งใน TF1 cells โดยการออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งของอะพิเจนินเกิดผ่านการหยุดยั้งการเข้าสู่วงจรชีวิตของเซลล์ (cell-cycle arrest) [68]

2.5.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของอะพิเจนินในมะเร็งศีรษะและลำคอ

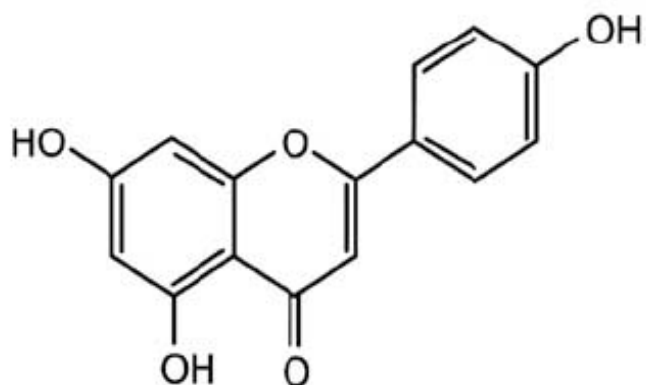
จากการศึกษาของ Masuelli L และคณะ (2011) พบว่า อะพิเจนินสามารถเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสและลดการเกิดฟอสโฟรีเลชั่นของ EGFR และ ErbB2 ที่ตำแหน่งที่จำเพาะต่อการกระตุ้น Ras/Raf/Erk1/2 และ Akt [14]

จากการศึกษาของ Leong และคณะ (2012) พบว่า อะพิเจนินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, และ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันได้ดีกว่าวิตามินซี (ascorbic acid) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอแปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อะพิเจนินยังมีฤทธิ์ในการป้องกันโรคมะเร็งโดยจากการทดสอบสารดังกล่าวเป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมงแสดงให้เห็นถึงผลในการเหนี่ยวนำการหยุดวงจรชีวิตในระยะ G₂/M เพิ่มระดับ ROS ลด glutathione activity และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ TNF-R และ TRAILR signaling pathways และลดการแสดงออกของ Bcl-2 และกระตุ้น caspase-3 [13]

2.5.2 การศึกษาฤทธิ์ของอะพิเจนินในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับผลของอะพิเจนินในเซลล์ต้นกำเนิดมีอยู่อย่างจำกัดและยังไม่พบการศึกษาผลดังกล่าวในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งศีรษะและลำคอ

จากการศึกษาของ Chhabra R และคณะ (2015) พบว่า อะพิเจนินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการสร้าง spheroids formed และยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอะพิเจนินสามารถยับยั้งสมบัติการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยความสามารถของอะพิเจนินในการยับยั้งสมบัติการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเกิดผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน CK2 α ที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ในมะเร็งปากมดลูก [82]



The Chemical structure of apigenin

รูป 2-4 รูปแสดงสูตรโครงสร้างของอะพิจีนิน
(ที่มา : Pattaraporn, *et al.*, 2009)



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารทดสอบ

- อะพิจินิน (Apigenin) (Sigma, USA)

3.1.2 สารเคมีและชุดทดสอบ

- อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM, Gibco, USA)

- ซีรัมจากฟetusวัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)

- แอลกลูตามีน (L-glutamine) (Invitrogen, USA)

- สเตربتอมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate, Invitrogen, USA)

- เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium, Invitrogen, USA)

- แอมโฟเพอริซินบี (Amphotericin, 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-ITM Reverse Transcription system, Promega, USA)

- เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase, Invitrogen, USA)

- ไพรเมอร์สำหรับยีน 18 เอส (Primer for 18S, Sigma, USA)

- ไพรเมอร์สำหรับยีน ออกซ์-4 (Primer for OCT-4, Sigma, USA)

- ไพรเมอร์สำหรับยีน นานอก (Primer for NANOG, Sigma, USA)

- ไพรเมอร์สำหรับยีน เร็กซ์-1 (Primer for REX-1, Sigma, USA)

- โพรเมอร์สำหรับยีน ซีดี44 (Primer for *CD44*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ซีดี73 (Primer for *CD73*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน ซีดี105 (Primer for *CD105*, Sigma, USA)
- โพรเมอร์สำหรับยีน VEGF (Primer for *VEGF*, Sigma, USA)
- โพรมารีแอนติบอดีจากหนูเมาส์ที่จำเพาะต่อโปรตีน STRO-1 (Mouse primary, BD Biosciences Pharmingen)
 - 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 ซีดี3/ซีดี8/ซีดี45 (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)
- เครื่องสูบลมไฟฟ้า (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 calibur™ 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)
- งานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35, 60 และ 100 มิลลิเมตร (35, 60 and 100 mm. plate, Corning, USA)
- งานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 และ 24 หลุม (6 and 24-wells plate, Corning, USA)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HSC-3, HN-8 และ HN-30

เซลล์ human oral squamous cell carcinoma (HSC-3) พบที่บริเวณลิ้น (tongue) และเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymph node) และเซลล์ head and neck squamous cell carcinoma (HN-8 และ HN-30) เป็นเซลล์มะเร็งปฐมภูมิ (primary tumor) โดยตำแหน่งที่พบของเซลล์ HN-8 และ HN-30 คือ คอหอย (larynx) และหลอดอาหาร (esophagus) ตามลำดับ เพาะเลี้ยงใน dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% FBS, 1% Ab/Am และ 1% L-glu ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂, 95% humidity และ subculture ทุก 2-3 วัน

3.2.2 การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30 ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์ หลุมละ 10×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂, 95% humidity เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เติมสารทดสอบอะพิจาเนสที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลุม เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่สภาวะปกติ (อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂, 95% humidity) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ ด้วย PBS หลุมละ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอ็มทีทีที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายเอ็มทีทีทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายสำหรับละลายผลึก formazan ที่

เกิดขึ้น (glycine buffer และ DMSO) หลุมละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้สีละลายเข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร. ด้วยเครื่อง microplate reader

3.2.3 การวิเคราะห์ผลของสภาวะพร้อมออกซิเจนต่อการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *NANOG*, *OCT-4*, *REX-1*, *CD44*, *CD73*, *CD105* และ *VEGF* ที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HSC-3, HN-8 และ HN-30 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์จานละ 30×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM โดยเติม 0.1% DMSO ที่ทั้งสภาวะปกติ และสภาวะพร้อมออกซิเจน (0.5-1% O_2) เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง และนำเซลล์มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ TRIzol reagent หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้มาทำ reverse transcribed เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NANOG*, *OCT-4*, *REX-1*, *CD44*, *CD73* และ *CD105* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน และใช้ยีน 18S เป็น internal control เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน และใช้ *VEGF* เป็นยีนในการตรวจสอบการเกิดสภาวะพร้อมออกซิเจน แสดงผลโดยการทำให้เจลอิลีกโทรโฟรีซิส และบันทึกภาพด้วย fluorescence microscope เพื่อวิเคราะห์ผลจากความเข้มของแถบ DNA

3.2.4 การวิเคราะห์ผลของอะพีเจนินต่อการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่พบว่าถูกเหนี่ยวนำด้วยสภาวะพร้อมออกซิเจน ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์จานละ 30×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM โดยทดสอบด้วย 0.1% DMSO หรืออะพีเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงที่สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ/หรือ 24 ชั่วโมง ตามการแสดงออกของยีนต่างๆ ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนจากการทดลองก่อนหน้าด้วยเทคนิค RT-PCR และนำเซลล์มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ TRIzol reagent วัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้มาทำ reverse transcribed เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค qRT-PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน โดยใช้ยีน 18S เป็น internal control (แสดงดังตารางที่ 1) เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน

ตาราง 1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทดสอบ

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
<i>18S</i>	5'- GTG ATG CCC TTA GAT GTC C -3'	5'- CCA TCC AAT CGG TAG TAG C -3'
<i>OCT-4</i>	5'- AGA CCC AGC AGC CTC AAA ATC-3'	5'- GCA ACC TGG AGA ATT TGT TCC T-3'
<i>REX-1</i>	5'- AGA ATT CGC TTG AGT ATT CTG A-3'	5'- GGC TTT CAG GTT ATT TGA CTG A-3'
<i>NANOG</i>	5'- GGA AGA GTA GAG GCT GGG GT-3'	5'- TCT CTC CTC TTC CTT CTC CA-3'
<i>CD44</i>	5'- ACA AGT TTT GGT GGC ACG CA-3'	5'- CAA TCT TCT TCA GGT GGA-3'
<i>CD73</i>	5'- ACA CTT GGC CAG TAA AAT AGG G-3'	5'- ATT GCA AAG TGG TTC AAA GTC A-3'
<i>CD105</i>	5'- CAT CAC CTT TGG TGC CTT CC-3'	5'- CTA TGC CAT GCT GCT GGT GGA-3'
<i>VEGF</i>	5'- CAA GGC CAG CAC ATA GGA GA-3'	5'- GGT GGG TGT GTC TAC AGG AA-3'

3.2.5 การวิเคราะห์ผลของอะพีเจนินต่อจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่บริเวณผิวเซลล์ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจน ด้วยวิธี Flow cytometry

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HN-30 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์จานละ 30×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% DMEM ที่มีการเติมซีรัมร้อยละ 10, Ab/Am ร้อยละ 1 และ 1% L-glut ร้อยละ 1 โดยทดสอบด้วย 0.1% DMSO หรืออะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงที่สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 หรือ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างและบ่มเซลล์ด้วย 0.2 โมลาร์ EDTA หลุมละ 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 8 นาที ดูดปิเปตขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ ปิเปตเซลล์ที่ได้ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน 2000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมน้ำสารละลาย FAC buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอน 2000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้งแล้วล้างเซลล์ซ้ำอีกรอบด้วยสารละลาย FAC buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร พักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงแล้วนำไปปั่นตกตะกอน 2000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์มาบ่มด้วยแอนติบอดีและเนกาทีฟคอนโทรลแอนติบอดีของตัวบ่งชี้ต่างๆ คือ mouse anti-human *CD44* (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, BD Biosciences Pharmingen), mouse anti-human *CD105* (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, BD Biosciences Pharmingen) และ mouse anti-human *STRO-1* (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, BD Biosciences Pharmingen) (1:25) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย FAC buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นตกตะกอน 2000 รอบ ดูดสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำเดิมอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดสารละลายเติมทิ้งและเติมน้ำสารละลาย FAC buffer หลอดละ 300 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการแสดงออกระดับโปรตีนด้วย

FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) โดยใช้ Ig isotype control antibody เป็น negative control สำหรับการทดลองนี้

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

แสดงผลข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ข้อมูลจากการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (IC₅₀) แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm SE) วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธีทดสอบความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธีแอลเอสดี (Least Significant Difference : LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส เวอร์ชัน 22 (SPSS version 22.0, SPSS Inc., USA)



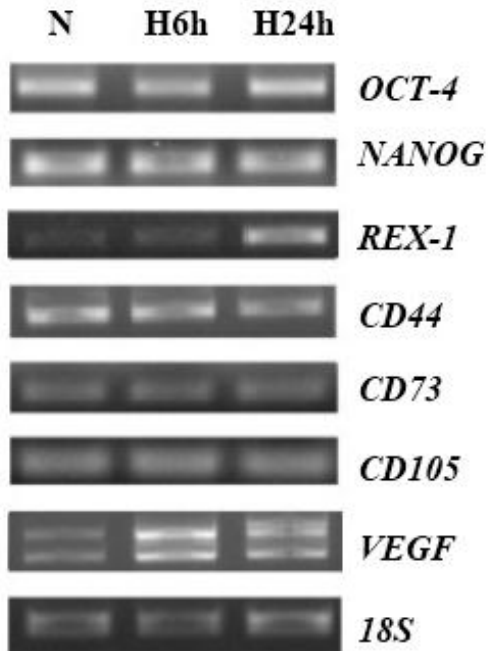
บทที่ 4

ผลการทดลอง

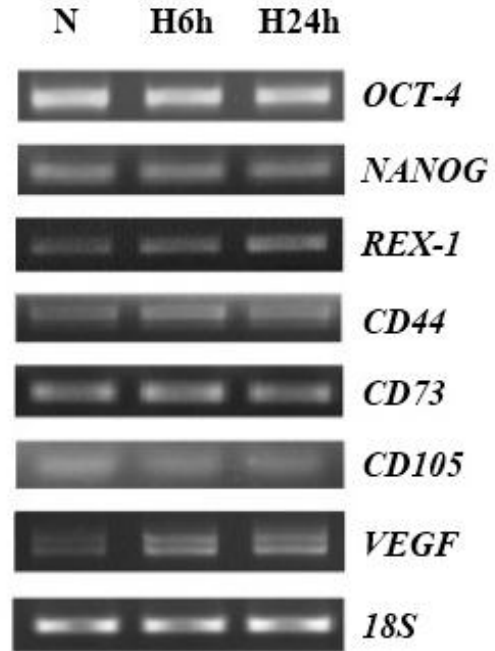
4.1 การศึกษาผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Lima PO และคณะ (2005) ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (human oral squamous carcinoma) พบว่า มีการแสดงออกของ *VEGF* เพิ่มขึ้นทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน [83] ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ *VEGF* เป็นยีนในการตรวจสอบการเกิดสภาวะพร่องออกซิเจน จากการทดสอบด้วยเทคนิค semi quantitative RT-PCR พบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ *VEGF* ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ HSC-3, HN-8 และ HN-30 พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มขึ้นในสภาวะพร่องออกซิเจนทั้งที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ *OCT-4*, *NANOG*, *REX-1*, *CD44*, *CD73* และ *CD105* ในเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน จากผลการทดลองในเซลล์ HSC-3 พบว่า ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน *REX-1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตัวอื่นๆ ได้แก่ *OCT-4*, *NANOG*, *CD44*, *CD73* และ *CD105* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.1A) ผลการทดลองในเซลล์ HN-8 พบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งใดๆที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 4.1B) และการทดลองในเซลล์ HN-30 พบการเหนี่ยวนำการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนที่ระยะเวลาต่างกัน คือ การแสดงออกของ *OCT-4* และ *CD105* จะเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน ขณะที่การแสดงออก *NANOG* และ *REX-1* จะเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้ ส่วน *CD44* จะพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นได้ทั้งที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง แต่ *CD73* ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนที่ระยะเวลาดังกล่าว (ภาพที่ 4.1C) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลจากการทำ scion image ในเซลล์ HN30 กล่าวคือที่เวลา 6 ชั่วโมง สภาวะพร่องออกซิเจนจะเพิ่มการแสดงออกของ *OCT-4*, *CD105*, *CD44* และ *VEGF* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในสภาวะพร่องออกซิเจนที่เวลา 24 ชั่วโมงพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ *NANOG*, *REX-1*, *CD44* และ *VEGF* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1D) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์ HN-30 สามารถตอบสนองการเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน จึงเลือกใช้เซลล์ HN-30 ในการทดลองต่อไป

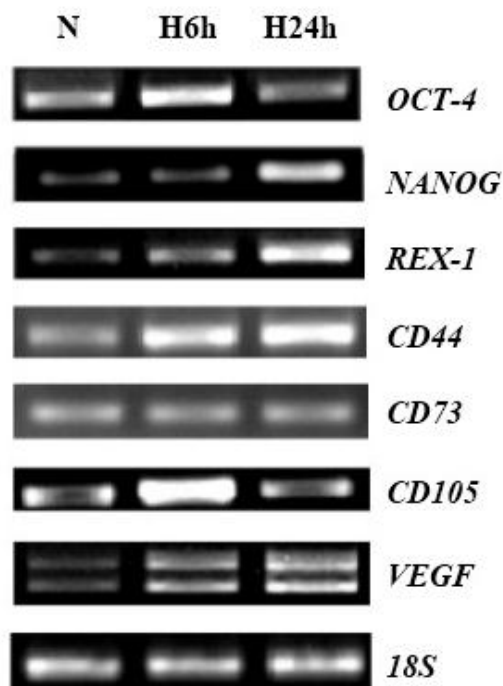
A)

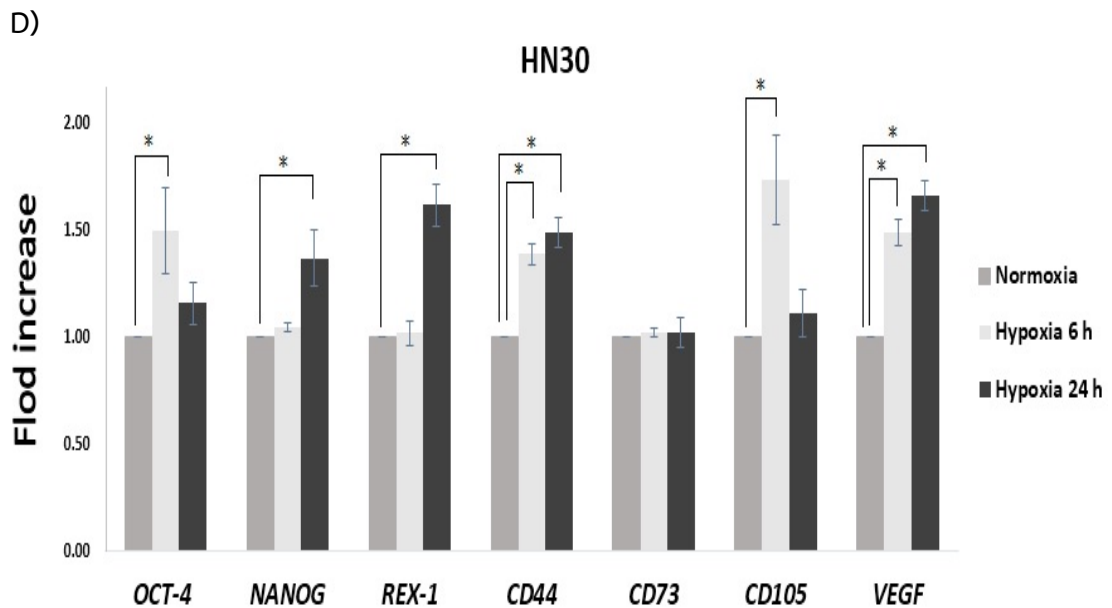


B)



C)



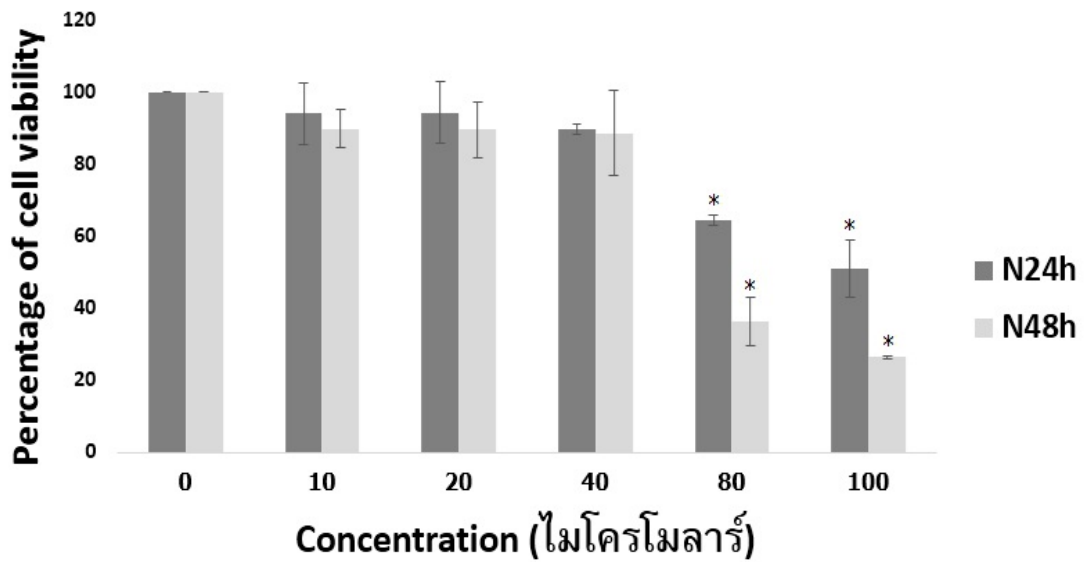


รูป 0-1 การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HSC-3 (A), HN-8 (B) และ HN-30 (C) ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค semi quantitative RT-PCR และการศึกษาเชิงปริมาณของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ไลน์ HN-30 จากการทำให้ Scion Image (D)

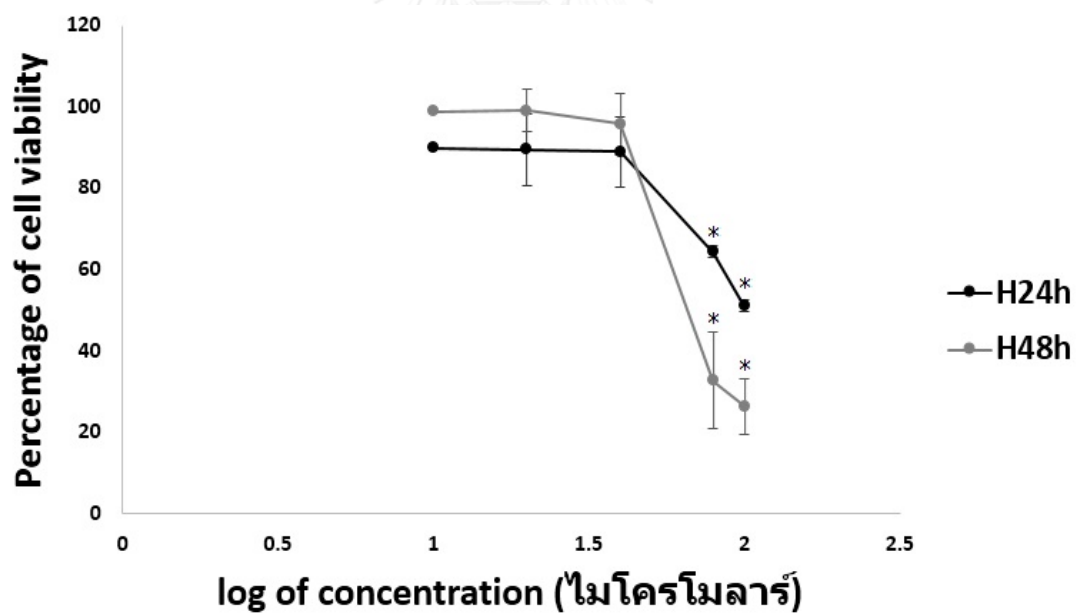
4.2 การศึกษาผลของอะพิจนีนต่อการรอดชีวิตของเซลล์ HN30

จากการศึกษาค่าความเป็นพิษของอะพิจนีนที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในเซลล์ HN-30 ที่สภาวะปกติ (normoxia) ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงตามเวลา และค่าความเข้มข้นของอะพิจนีนที่เพิ่มขึ้น (dose and time dependent manner) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยอะพิจนีนที่ความเข้มข้น 10 – 40 ไมโครโมลาร์ และค่าเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นอะพิจนีน 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากผลการทดลองสามารถคำนวณหาค่า IC₅₀ ของอะพิจนีนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงได้จากกราฟลอการิทึม (Logarithm) (ภาพที่ 4.2B) โดยอะพิจนีนมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 108.43 ± 4.71 ไมโครโมลาร์ และ 70.23 ± 3.83 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

A)



B)

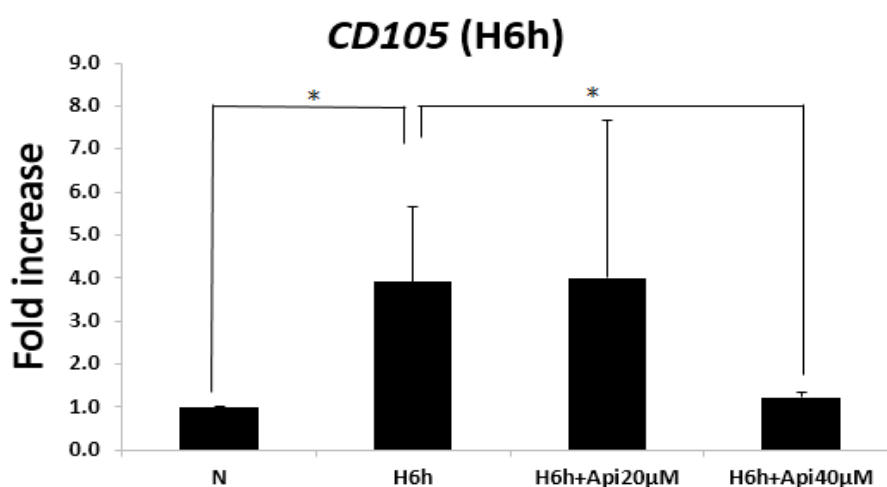


รูป 0-2 ค่าความเป็นพิษของอะพิจนินต่อเซลล์ HN-30 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT assay (A) และกราฟลอการิทึมระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ HN-30 (B) (* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร)

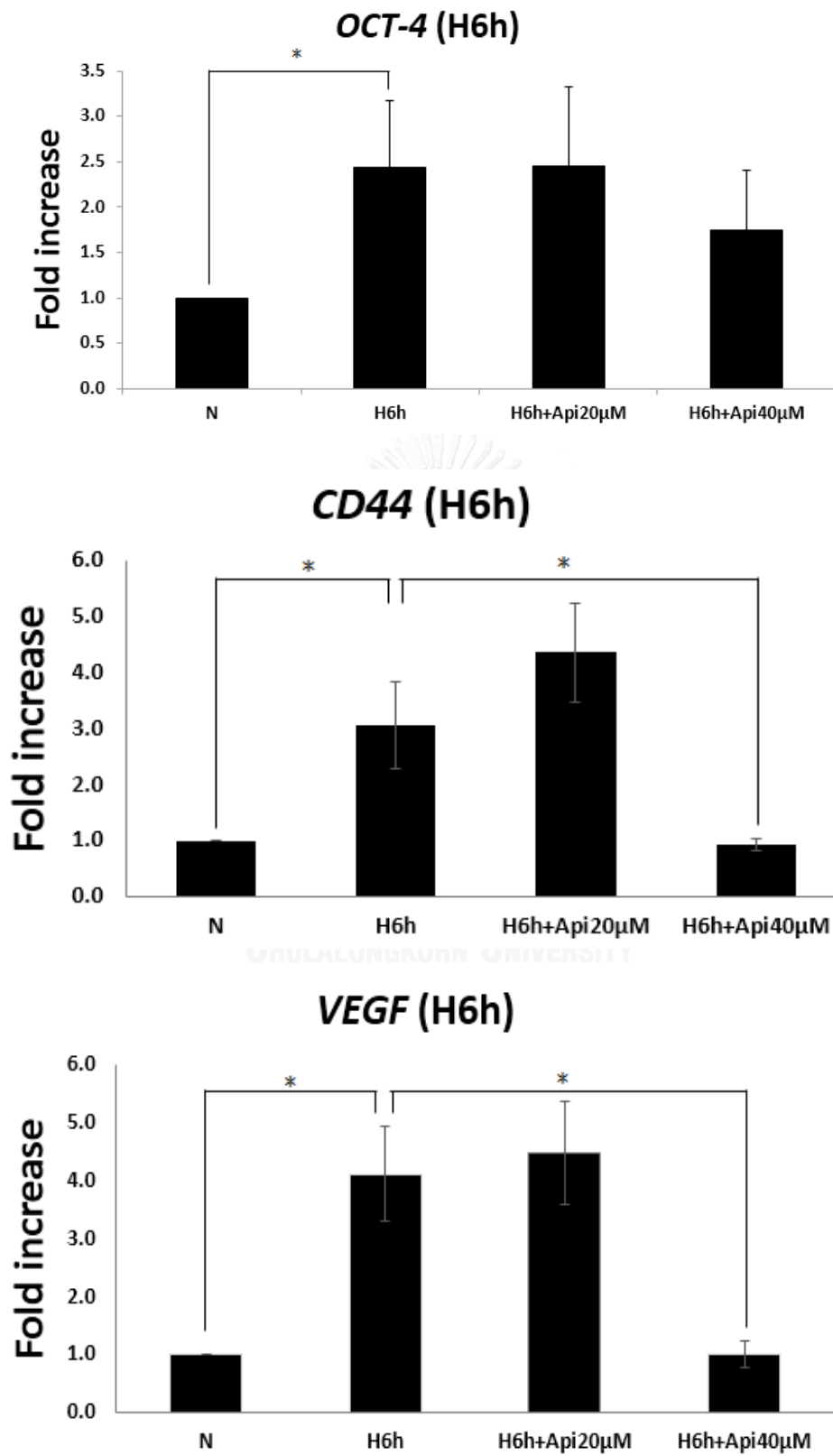
4.3 การศึกษาผลของอะพีเจนินต่อการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจน

จากการทดลองที่ผ่านมา (ภาพที่ 4.2) พบว่าเซลล์ HN-30 มีการตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจน โดยสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่แตกต่างกันใน 2 ช่วงเวลา ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบผลของอะพีเจนินต่อการแสดงออกของ *OCT-4* และ *CD105* ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงภายหลังการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน และศึกษา *REX-1* และ *NANOG* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในส่วนของ *CD44* และ *VEGF* ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบทั้งสองช่วงเวลา โดยพบว่า ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง อะพีเจนินไม่สามารถลดการแสดงออกของ *OCT-4* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อะพีเจนินความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของ *CD105*, *CD44* และ *VEGF* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ การทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า อะพีเจนินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ และ 40 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของ *NANOG*, *CD44* และ *VEGF* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามอะพีเจนินทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *REX-1* จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า อะพีเจนินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของยีนมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่อะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ให้ผลลดการแสดงออกของยีนที่ถูกเพิ่มการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ดังนั้นอะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ให้ผลการลดการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้ดีที่สุดในเซลล์มะเร็ง HN-30 จึงเลือกใช้อะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในการทดลองต่อไป

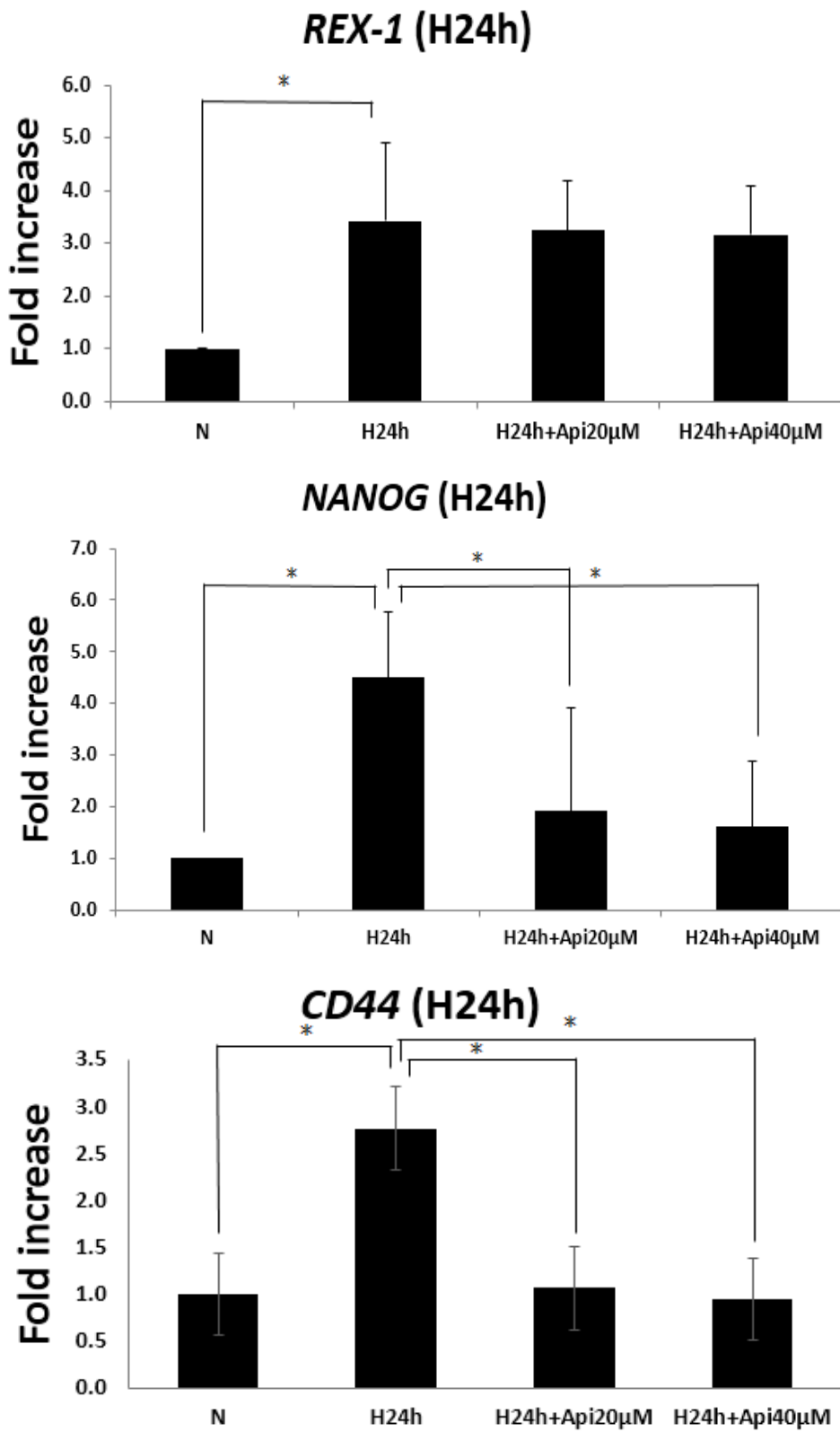
A)



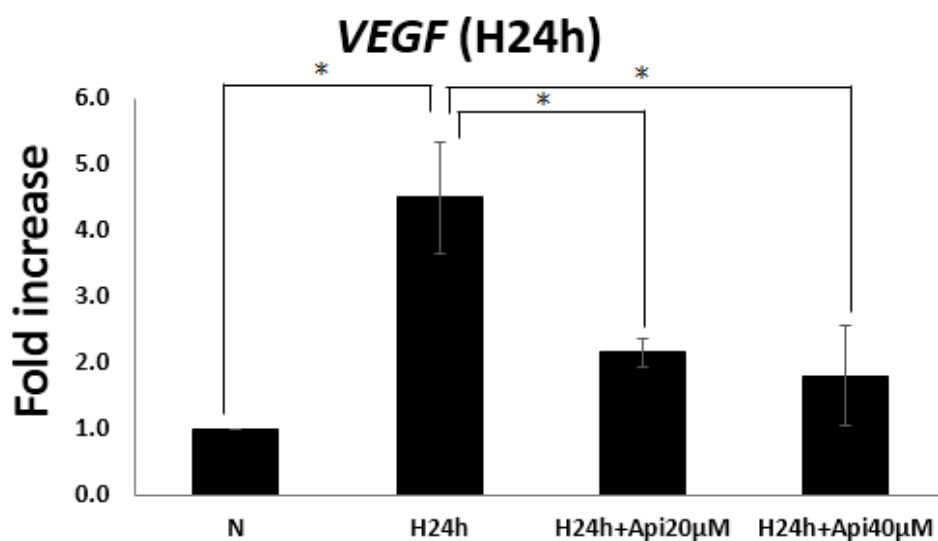
A)



B)



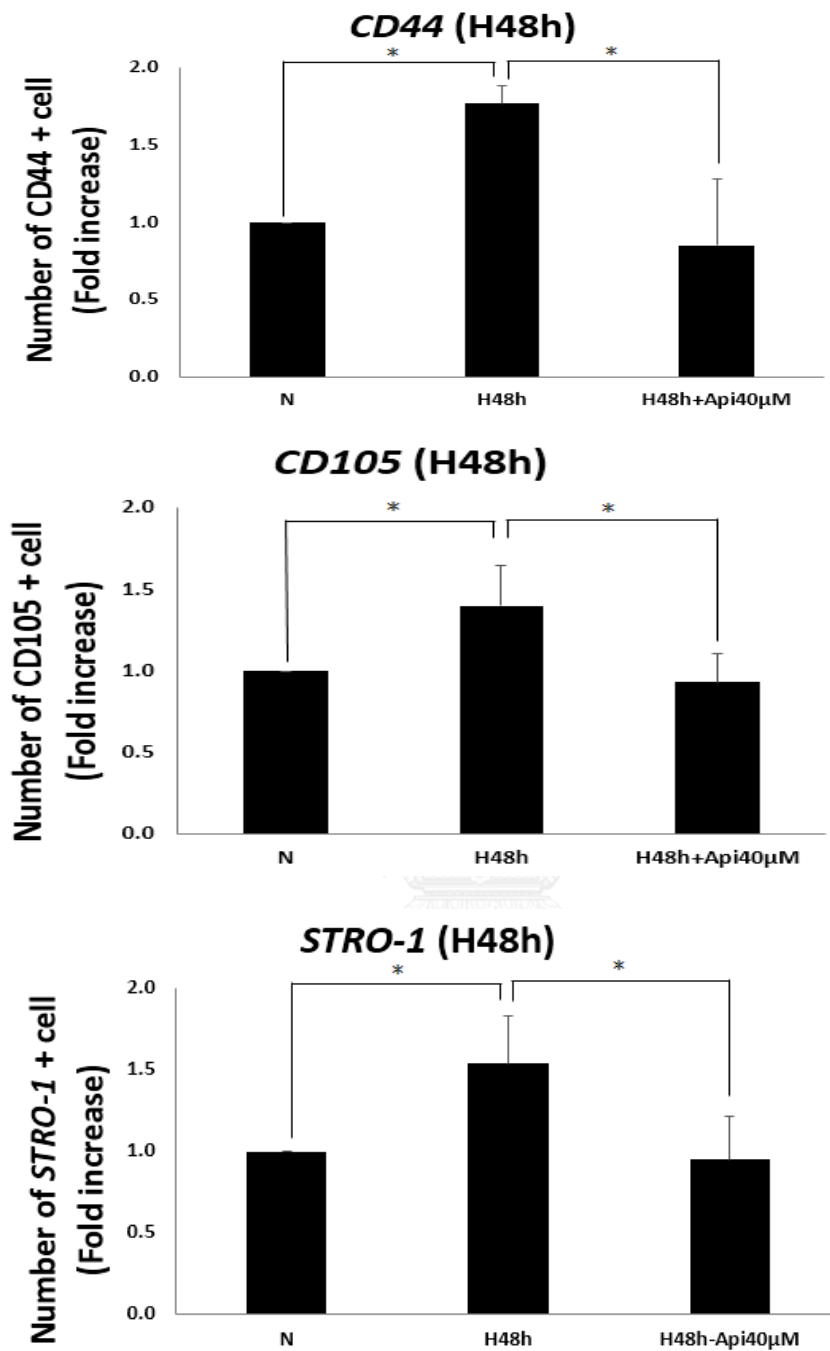
B)



รูป 0-3 การแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการแสดงออก ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน เมื่อได้รับอะพีเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (A) และ 24 ชั่วโมง (B) ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR (* $p < 0.05$ เทียบสภาวะปกติ (normoxia), * $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร)

4.4 ศึกษาผลของอะพีเจนินต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร่องออกซิเจน

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าอะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.3) ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาผลของสารอะพีเจนินต่อการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยทำการศึกษาในยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่บริเวณผิวเซลล์ (Cell Surface Markers) ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Flow Cytometry พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน *CD44*, *CD105* และ *STRO-1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาวะพร่องออกซิเจน และพบว่าอะพีเจนินสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับสารในสภาวะพร่องออกซิเจน (รูปที่ 4.4)



รูป 0-4 จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่บริเวณผิวเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเมื่อได้รับที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Flow cytometry (* $p < 0.05$ เทียบกับสภาวะปกติ, * $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุหนึ่งของการกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรค เนื่องจากการรักษาโดยใช้ยาเคมีบำบัดหรือการฉายรังสีเพียงแค่วัยลดขนาดของก้อนมะเร็ง แต่ไม่มีความจำเพาะในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง [7] ซึ่งเป็นเพียงเซลล์กลุ่มน้อยในก้อนมะเร็ง แต่มีความสำคัญมากต่อการเกิดมะเร็งใหม่ และนำไปสู่การกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรค [2] การใช้ยาที่มีความสามารถในการลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งร่วมกับการรักษาดั้งเดิม น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งให้ดียิ่งขึ้น การศึกษานี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยสนใจศึกษาฤทธิ์ของอะพิจินิน ซึ่งเป็นสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของมะเร็งในมะเร็งหลายชนิด [13, 80, 81]

นิชของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell niche) คือสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และมีบทบาทในการรักษาคุณสมบัติเฉพาะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น การแบ่งตัวทดแทนตนเอง ตัวอย่างนิชที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ หลอดเลือด [67] และสภาวะพร่องออกซิเจน [10] โดยสภาวะพร่องออกซิเจนเป็นสภาวะที่พบได้ในมะเร็งทุกชนิดที่มีลักษณะเป็นก้อน การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สภาวะดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง การปรับเปลี่ยนการเผาผลาญและการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง การกลับมาเป็นซ้ำของรอยโรคหลังการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี เป็นต้น [68, 72] ในการศึกษาพบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิด HN-30 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งจากหลอดอาหารได้ โดยพบการเพิ่มการแสดงออกของ *CD44* ซึ่งเป็นยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดที่สำคัญที่ใช้ในการระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ [48] *CD105* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง [58] นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *NANOG*, *OCT-4* และ *REX-1* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน [41, 84, 85] ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Ma Y และคณะ (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3 และ DU145) พบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ *OCT-4* และ *NANOG* [9] อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าสภาวะดังกล่าวไม่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ *CD73* ซึ่งเป็นยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสภาวะพร่องออกซิเจนมีความจำเพาะในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และจากผลที่ได้อาจสรุปได้ว่าสภาวะพร่องออกซิเจนสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งศีรษะและลำคอ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองในเซลล์ไลน์ชนิดอื่นๆ ได้แก่

HSC-3 และ HN-8 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งจากลิ้นและคอหอย ตามลำดับ พบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนไม่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้เหล่านี้ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้สภาวะพร่องออกซิเจนอาจเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในช่วงเวลาอื่นซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าสภาวะพร่องออกซิเจนไม่มีผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเหล่านี้ แต่อาจมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดอื่น เช่น *CD133* และ *ALDH* เป็นต้น ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการทำการศึกษาต่อไปในอนาคต นอกจากนี้จากผลที่พบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเพิ่มการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้หลายชนิดจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปว่าการเพิ่มระดับออกซิเจนให้แก่เซลล์ ดังที่พบในทางคลินิกในการใช้ออกซิเจนเพื่อรักษามะเร็ง เช่น hyperbaric oxygen therapy [86] จะมีผลลดการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งรวมถึงจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดหรือไม่

มีการศึกษาเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของอะปิเจนินในการรักษามะเร็ง โดยอะปิเจนินสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้ในมะเร็งหลายชนิด [13] ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ อะปิเจนินสามารถเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสและลดการเกิดฟอสโฟริเลชันของ EGFR และ ErbB2 ที่ตำแหน่งที่จำเพาะต่อการกระตุ้น Ras/Raf/Erk1/2 และ Akt [87] นอกจากนี้สารดังกล่าวยังช่วยเพิ่มฤทธิ์ของ cisplatin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ GLUT-1 และ p-Akt [88] ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงค่าความเป็นพิษของอะปิเจนินต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิด HN-30 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งแปรผกผันกับความเข้มข้นของอะปิเจนินและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับสาร ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang Q และคณะ (2009) ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิด KYSE-510 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งจากหลอดอาหารเช่นกัน [89] นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า IC₅₀ จากการทดลองที่ได้กับการทดสอบดังกล่าวที่เวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าค่า IC₅₀ จากทั้งสองการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของอะปิเจนินที่ได้ทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น เช่น เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิด HEP-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งจากกล่องเสียง (larynx) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) เซลล์มะเร็งปอด (H1975) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) และเซลล์มะเร็งรังไข่ (SKOV-3) เป็นต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง [88] แต่พบว่าค่า IC₅₀ นั้นมีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของมะเร็งและตำแหน่งที่พบเซลล์มะเร็ง

สำหรับผลของอะปิเจนินต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งพบว่ายังมีการศึกษาที่จำกัดในมะเร็งบางชนิดเท่านั้น เช่น ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก อะปิเจนินสามารถยับยั้งความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเองผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ CK2 α (casein kinase 2 α) [89] และการศึกษาในมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่าอะปิเจนินสามารถลดการแสดงออกของ SALL4 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการแบ่งตัวทดแทนตัวเองของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและลดการกระตุ้น β -catenin [17] งานวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า อะปิเจนินมีผลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอโดยพบว่าอะปิเจนินสามารถยับยั้งการแสดงออกของ *CD44* ซึ่งเป็นยีนตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการระบุการมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งศีรษะและลำคอ [48] นอกจากนี้ยังสามารถลดการแสดงออกของ *NANOG* และ *CD105* ได้ สำหรับกลไกการแสดงออกของอะปิเจนินในการลดการแสดงออกของ *NANOG*, *CD44* และ *CD105* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้

ว่าอะพีเจนินสามารถลดการแสดงออกของยีนเหล่านี้ผ่าน HIF-1 α เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอะพีเจนินมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 α ได้ในมะเร็งรังไข่ [81] และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า การแสดงออกของ *NANOG*, *CD44* และ *CD105* นั้นอาศัยการทำงานของ HIF-1 α [10, 74, 77, 90] แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าผลของอะพีเจนินนั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด กล่าวคืออะพีเจนินไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ *OCT-4* และ *REX-1* ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีกลไกอื่นๆ นอกเหนือจาก HIF-1 α ที่มีผลต่อการแสดงออกของ *OCT-4* และ *REX-1* เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การแสดงออกของ *OCT-4* อาศัยการทำงานของ HIF-2 α เป็นหลัก [91]

เพื่อพิสูจน์ว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งพบในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ เป็นผลจากการที่สภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ ผู้วิจัยจึงยืนยันผลดังกล่าวด้วยวิธีการ Flow cytometry และพบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ โดยสภาวะดังกล่าวทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มีการแสดงออกของ *CD44*, *CD105* และ *STRO-1* ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลจากการศึกษาของ Soeda A และคณะ ที่ทำการศึกษาในมะเร็งสมองโดยพบว่า สภาวะพร่องออกซิเจนจะกระตุ้นการแบ่งตัวทดแทนตัวเองและการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดผ่านการกระตุ้น HIF-1 α [92] และเป็นที่น่าสนใจว่าอะพีเจนินสามารถลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่บริเวณผิวเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้ โดยผู้วิจัยเลือกทดสอบอะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็งทั้งหมด ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างในการลดการจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่บริเวณผิวเซลล์เมื่อได้รับและไม่ได้รับสารทดสอบอย่างชัดเจน โดยพบว่าอะพีเจนินสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *CD44* และ *CD105* ได้จริงสอดคล้องกับผลที่พบในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *STRO-1* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ [93] ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอะพีเจนินในการใช้เป็นยาต้านมะเร็ง โดยอะพีเจนินไม่เพียงแต่ลดจำนวนของเซลล์มะเร็งเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งด้วย และเพื่อยืนยันข้อสรุปดังกล่าว การศึกษาต่อไปในอนาคตโดยการคัดแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่บริเวณผิวเซลล์จากเซลล์ไลน์ HN-30 ด้วยเทคนิค Flow cytometry และปลูกถ่ายเซลล์ดังกล่าวเข้าสู่หนูที่กีดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย จากนั้นศึกษาถึงผลของอะพีเจนินต่อการเกิดก้อนมะเร็งถือเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก

สำหรับความปลอดภัยในการใช้อะพีเจนินนั้น การศึกษาที่ผ่านมาโดย Matsuo M และคณะ ซึ่งทำการศึกษาความเป็นพิษของอะพีเจนินในเซลล์ไลน์ปกติ พบว่าอะพีเจนินที่ความเข้มข้นต่ำจะมีฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์ปกติ เช่น ฤทธิ์ในการปกป้อง human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) ภายใต้สภาวะที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ (oxidative stress) และความเป็นพิษจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น โดยค่า IC₅₀ ของอะพีเจนินในเซลล์ human lung embryonic fibroblasts (TIG-1) และ HUVEC จะมีค่าเท่ากับ 110 ไมโครโมลาร์ [94] ดังนั้นอะพีเจนินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ที่ใช้ในการศึกษานี้ น่าจะเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความ

เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าอะพีเจนินมีความสามารถในการลดการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งยีนเหล่านี้สามารถพบได้ในเซลล์ต้นกำเนิดปกติด้วย จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปว่าอะพีเจนินจะมีผลต่อเซลล์ต้นกำเนิดปกติหรือไม่

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งชนิดต่างๆ มักเป็นการศึกษาโดยใช้ยาที่พัฒนาขึ้นใหม่ร่วมกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดที่ใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น การศึกษาของ Hirsch HA และคณะ (2012) ซึ่งพบว่าสาร Metformin ที่ใช้อย่างแพร่หลายสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคอ้วน และกลุ่มอาการรังไข่มีถุงน้ำหลายใบ (PCOS) มีฤทธิ์ในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งเต้านม โดย Metformin จะยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B และการฟอสโฟรีเลชันของ STAT3 ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง นอกจากนี้สารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งผ่านการยับยั้งกลไกที่ตอบสนองต่อการอักเสบเมื่อใช้ร่วมกับการรักษาด้วย doxorubicin [95] การศึกษาของ Sun TM และคณะ (2013) พบว่าการใช้ gold nanoparticles ร่วมกับ doxorubicin จะเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งโดยสามารถลดการสร้าง mammosphere และความสามารถก่อมะเร็งในระยะเริ่มต้น ยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งในหนูทดลอง ผ่าน poly (ethylene glycol) spacer และ hydrazone bond ได้ในมะเร็งเต้านม [96] และการศึกษาของ Ke XY และคณะ (2014) พบว่าการใช้ thioridazine (THZ) ร่วมกับ doxorubicin จะมีผลยับยั้งทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ในมะเร็งเต้านม [86] และเมื่อพิจารณาค่า IC₅₀ ของอะพีเจนินที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับค่า IC₅₀ ใน HUVEC และ TIG-1 [94] ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษา ควรเลือกใช้อะพีเจนินที่ความเข้มข้นต่ำและมีฤทธิ์ลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตถึงกลไกในระดับชีวโมเลกุลของอะพีเจนินต่อการลดการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้ต่างๆ นั้นน่าสนใจเป็นอย่างมากในการเพิ่มองค์ความรู้ดังกล่าวและทราบถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาใช้เป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

นอกจากสารอะพีเจนินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่ใช้ในการทดสอบได้แล้ว สารดังกล่าวยังสามารถลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนได้อีกด้วย หรือ ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า สารอะพีเจนินสามารถลดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ในมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยลดการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิด *CD44*, *NANOG*, *OCT-4* และ *CD105* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและลดการแสดงออกของโปรตีน *CD44*, *CD105* และ *STRO-1* ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน

รายการอ้างอิง

- [1] Argiris A, K.M., Raben D, Ferris RL, *Head and neck cancer*. Lancet, 2008. **371**: p. 1695-1709.
- [2] U, S., *Monitoring photodynamic therapy of head and neck malignancies with optical spectroscopies*. World J Clin Cases, 2013. **1**: p. 96-105.
- [3] Zhang Z, F.M., Jacques EN, *The biology of head and neck cancer stem*. Oral Oncol, 2012. **48**: p. 1-9.
- [4] Yin X, L.Y., Zhang BH, Ren ZG, Qiu SJ, Yi Y and Fan J, *Coexpression of Stemness Factors Oct4 and Nanog Predict Liver Resection*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**: p. 2877–2887.
- [5] Satpute PS, H.V., Ahmed R, Yadav L, *Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**: p. 5579-5587.
- [6] Fujiwara D, K.K., Nohara S, Iwanuma Y, Kajiyama Y, *The usefulness of three-dimensional cell culture in induction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell lines*. Biochem. Biophys Res Comm, 2013. **434**: p. 773-778.
- [7] Siclari VA, Q.L., *Targeting the osteosarcoma cancer stem cell*. J Orthopaedic Sur Res, 2010. **5**: p. 1-10.
- [8] Heddleston JM, L.Z., Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN, *Hypoxia inducible factors in cancer stem cells*. Brit J Cancer, 2010. **102**: p. 789 - 795.
- [9] Ma Y, L.D., Liu J, Axcrone K, Kvalheim G, Stokke T, Nesland JM, Suo Z, *Prostate Cancer Cell Lines under Hypoxia Exhibit Greater Stem-Like Properties*. Plos one, 2011. **6**: p. 1-13.
- [10] Li Z, B.S., Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN, *Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells*. Cancer Cell 2009. **15**: p. 501-513.
- [11] Wu K, Y.L., Xia W, *Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells*. World J Gastroenterol, 2005. **11**: p. 4461-4464.

- [12] Shukla S, M.G., Flask CA, Fu P, Mishra A, Resnick MI, Gupta S, *Blockade of B-Catenin Signaling by Plant Flavonoid Apigenin Suppresses Prostate Carcinogenesis in TRAMP Mice*. *Cancer Res*, 2007. **67**: p. 6925-6935.
- [13] Chan LP, C.T., Ding HY, Chen PR, Chiang FY, Kuo PL, Liang CH, *Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. **1820**: p. 1081–1091.
- [14] Swanson HI, C.E., Helton WB, Gairola CG, Valentino J, *Impact of apigenin and kaempferol on human head and neck squamous cell carcinoma*. *Oral Med*, 2014. **117**: p. 214-220.
- [15] R, C., *Cervical cancer stem cells: opportunities and challenges*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015. **1**: p. 1-9.
- [16] Khan TH, S.S., *Apigenin induces apoptosis in Hep G2 cells: Possible role of TNF- γ and IFN- γ* . *Toxicol*, 2006. **217**: p. 206-212.
- [17] Zhang X, Y.X., Zhu W, Qian H, Xu W, *SALL4: An emerging cancer biomarker and target*. *Cancer Lett*, 2014. **357**: p. 1-8.
- [18] Chaisrisawatsuk S, c.P., *Human Papillomavirus and Head and Neck Carcinogenesis*. *Siriraj Med J*, 2008. **60**: p. 233-234.
- [19] Yadav NK, S.P., Singh P, Bansode FW, Singh RK, *Role of cytokine signalling in head and neck cancers*. *Int J App Basic Med Sci*, 2012. **2**: p. 102-107.
- [20] Hashibe M, B.P., Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Maso LD, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Filho VW et al., *Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 2009. **18**: p. 541-550.
- [21] Moskowitz HS, G.J., *Oncogenomics/Proteomics of Head and Neck Cancers*. *Head and Neck Cancer*, 2011. **1**: p. 81-91.
- [22] Z, C., *The Cancer Stem Cell Concept in Progression of Head and Neck Cancer*. *Jour of Oncol*, 2009. **1**: p. 1-9.

- [23] Clarke MF, D.J., Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL and Wahl GM, *Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**: p. 9339-9344.
- [24] Mongan NP, M.K., Gudas LJ, *The Putative Human Stem Cell Marker, Rex-1 (Zfp42): Structural Classification and Expression in Normal Human Epithelial and Carcinoma Cell Cultures*. *Mol carcinogen*, 2006. **45**: p. 887–900.
- [25] Mitsui K, T.Y., Itoh H, Segawa K, et al., *The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells*. *Cell*, 2003. **113**(1): p. 631-642.
- [26] Yu Z, P.T., Lisantic MP, Pestell RG, *Cancer stem cells*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012. **44**: p. 2144– 2151.
- [27] He S, N.D., Morrison SJ, *Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **25**: p. 377–406.
- [28] Hajj MA, W.M., Hernandez AB, Morrison SJ, Clarke MF, *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Pnas*, 2003. **7**: p. 3983–3988.
- [29] Reya T, M.S., Clarke MF, Weissman IL, *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**: p. 105-111.
- [30] Ventela S, S.E., Mannermaa L, Makela JA, Kulmala J, Loyttyniemi E, Strauss L, Carpen O, Toppari J, Grenman R, Westermarck J, *CIP2A is an Oct4 target gene involved in head and neck squamous cell cancer oncogenicity and radioresistance*. *Oncotarget*, 2014. **6**: p. 144-158.
- [31] Sinha N, M.S., Das DN, Panda PK, Bhutia SK, *Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer*. *Oral oncolo*, 2013. **49**: p. 854–862.
- [32] Ezeh UI, T.P., Reijo RA, Clark AT, *Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma*. *Cancer*, 2005. **104**: p. 2255–2265.
- [33] Chiou SH, Y.C., Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF, *Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and*

- high-grade oral squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**: p. 4085-4095.
- [34] Ponti D, C.A., Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Daidone MG, *Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties*. Cancer Res, 2005. **65**: p. 5506–5511. .
- [35] Chen YC, H.H., Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL and Tsai ML, *Oct-4 Expression Maintained Cancer Stem-Like Properties in Lung Cancer-Derived CD133-Positive Cells*. Plos one, 2008. **3**: p. 1-14.
- [36] Dong Z, Z.Q., Luo H, Zou J, Cao C, Liang J, Wu D, Liu L, *Increased expression of OCT4 is associated with low differentiation and tumor recurrence in human hepatocellular carcinoma*. Pathology, 2011. **208**: p. 527– 533.
- [37] Wang YD, C.N., Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS, *OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. 1-10.
- [38] Mitsui K, S.K., Tokuzawa Y, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S, *The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells*. Cell, 2003. **113**: p. 631-642.
- [39] GV, G., *“Stemness” genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management*. J Clin Oncol, 2008. **26**: p. 2846-2853.
- [40] Saiki Y, I.S., Mimori K, Takatsuno Y, Nagahara M, Ishii H, Yamada K, Mori M *Comprehensive analysis of the clinical significance of inducing pluripotent stemness-related gene expression in colorectal cancer cells*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**: p. 2638-2644.
- [41] Yang L, Z.X., Zhang M, Zhang J, Sheng Y, Sun X, Chen Q, Wang LX, *Increased Nanog Expression Promotes Tumor Development and Cisplatin Resistance in Human Esophageal Cancer Cells*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**: p. 943-952.
- [42] Shan J, S.J., Liu L, Xia F, Xu C, Duan G, Xu Y, Ma Q, Yang Z, Zhang Q, Ma L, Liu J, Xu S, Yan X, Bie P, Cui Y, Bian XW and Qian C, *Nanog Regulates Self-Renewal of Cancer Stem Cells Through the Insulin-Like Growth Factor Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma*. Hepatology, 2012. **56**: p. 1004-1014.

- [43] Suna C, S.L., Jiang K, Gaoa DM, Kang XN, Wang K, Zhang S, Huang S, Qin X, Li Y, Liu YK, *NANOG promotes liver cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition through NODAL/SMAD3 signaling pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**: p. 1099- 1108.
- [44] Langroudi L, F.M., Soleimani M, Atashi A, Golestaneh AF, *Induction of differentiation by down-regulation of Nanog and Rex-1 in cord blood derived unrestricted somatic stem cells*. Mol Biol Rep, 2013. **40**: p. 4429–4437.
- [45] Bhandari DR, S.K., Roh KH, Jung JW, Kang SK, *REX-1 Expression and p38 MAPK Activation Status Can Determine Proliferation/Differentiation Fates in Human Mesenchymal Stem Cells*. Plos one, 2010. **5**: p. 1-10.
- [46] Son MY, C.H., Han YM, Cho YS, *Unveiling the Critical Role of REX1 in the Regulation of Human Stem Cell Pluripotency*. Stem cell, 2013. **31**: p. 2374–2387.
- [47] Du L, W.H., He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu, Y, Chen Q, *CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells*. Clin Cancer Res, 2008. **14**: p. 1-15.
- [48] Kokko LL, H.S., Maula SM, Alanen K, Grenman R, Kinnunen I, Ventela S, *Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma*. Oral Oncol, 2011. **47**: p. 510–516.
- [49] Takaishi S, O.T., Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC, *Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44*. Stem cell, 2009. **27**: p. 1006-1020.
- [50] Shigeishi H, H.K., Takechi M, *Role of receptor for hyaluronan α -mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers*. Cancer Res Clin Oncol, 2014. **140**: p. 1629-1640.
- [51] Patel SS, S.K., Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM, *Cancer Stem Cells and Stemness Markers in Oral Squamous Cell Carcinomas*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**: p. 8549-8556.
- [52] B, Z., *CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy*. Cancer Res, 2010. **1**: p. 6408.

- [53] Wu XR, H.X., Chen YF, Yuan RX, Zeng Y, Lian L, Zou YF, Wu XJ, Lan P *High Expression of CD73 as a Poor Prognostic Biomarker in Human Colorectal Cancer*. *J Surg Oncol*, 2012. **106**: p. 130-137.
- [54] Zhi X, C.S., Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L, *RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion*. *Clin Exp Metastasis*, 2007. **24**: p. 439-448.
- [55] Stagg J, B.P., Divisekera U, Liu MCP, Moller A, Darcy PK, Smyth MJ, *CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2012. **72**: p. 2190-2196.
- [56] Rockenbach L, B.E., Dietrich F, Figueir F, Pugliese M, Edelweiss MI, BuenoMorrone F, Sevigny J, Battastini AO, *NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression*. *Purin Signal*, 2014. **10**: p. 421-430.
- [57] Allard B, T.M., Stagg J, *Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. **18**: p. 863-881.
- [58] Park S, D.T., Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N, *Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways*. *J Cell Sci*, 2013. **126**: p. 1392-1405.
- [59] Gohary YM, S.J., Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R, Saad RS, *Endoglin (CD105) and Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Markers in Prostatic Adenocarcinoma*. *Am J Clin Pathol*, 2007. **127**: p. 572-579.
- [60] Marioni G, G.E., Giacomelli L, Marcheseragona R, Staffieri C, Staffieri A, Marino F, *Endoglin (CD105) expression in head and neck basaloid squamous cell carcinoma*. *Acta Otolaryngol*, 2005. **125**: p. 307-311.
- [61] Bock AJ, S.H., Kærn J, Berner A, Staff AC, Davidson B, *Endoglin (CD105) expression in ovarian serous carcinoma effusions is related to chemotherapy status*. *Tumor Biol*, 2011. **32**: p. 589-596.
- [62] Morris E, C.I., Bujor A, Hant F, Mummery C, Dijke PT, Trojanowska M, *Endoglin promotes TGF- β /Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts*. *J Cell Physiol*, 2011. **226**: p. 3340-3348.

- [63] Klonisch SH, P.T., Wiechec E, Pocar P, Mustafa T, Seifert A, Zahl C, Gerlach KL, Biermann K, Steger K, *Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples*. Arch Immunol Ther Exp, 2008. **56**: p. 165-180.
- [64] Hernanda PY, G.A., LaanLW, Broker ME, Hoogduijn MJ, Ijzermans JN, Bruno MJ, Janssen HL, Peppelenbosch MP, Pan Q, *Tumor promotion through the mesenchymal stem cell compartment in human hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2013. **11**: p. 1-11.
- [65] Laothumthut T, J.J., Paemanee A, Roytrakul S, Chunhabundit P, *Shotgun proteomics analysis of proliferating STRO-1-positive human dental pulp cell after exposure to nacreous water-soluble matrix*. Clin Oral Invest, 2015. **19**: p. 261-270.
- [66] Han L, S.S., Gong T, Zhang Z, Sun X, *Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy*. Acta Pharm Sinica B, 2013. **3**: p. 65-75.
- [67] Borovski T, S.E.M.F., Vermeulen L, Medema JP, *Cancer Stem Cell Niche: The Place to Be*. Cancer Res, 2011. **71**: p. 634-639.
- [68] Philip B, I.K., Sánchez RM, Ralph SJ, *HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression*. Carcinogenesis, 2013. **34**: p. .1699–1707.
- [69] M, K.Q.a.C., *Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)*. Mole phar, 2006. **70**: p. 1469-1480.
- [70] Li C, I.R., Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, Kumar S, *CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells*. J Cell Sci, 2003. **116**: p. 2677-2685.
- [71] Covello KL, K.J., Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B, *HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth*. Genes Development, 2005. **20**: p. 557-570.
- [72] Keith B, S.M., *Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer*. Cell, 2007. **129**: p. 465-472.

- [73] Wang Z, S.Q., Wang Z, Gu Y, Shen Y, Sun M, Deng M, Zhang H, Fang J, Zhang S, Xie F, *Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1 α in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study*. *Pathol Res Pract*, 2011. **207**: p. 505- 513.
- [74] Krishnamachary B, P.M., Nimmagadda S, Mironchik Y, Raman V, Solaiyappan M, Semenza GL, Pomper MG, Bhujwalla ZM, *Hypoxia Regulates CD44 and Its Variant Isoforms through HIF-1 α in Triple Negative Breast Cancer*. *Plos one*, 2012. **7**: p. 1-9.
- [75] Conley SJ, G.E., Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, Clouthier AG, Wicha MS, *Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia*. *Pnas*, 2011. **109**: p. 2784–2789.
- [76] Costa AF, T.M., Mariano VF, Soares AB, Chone CT, Crespo AN, Fresno MF, Llorente JL, Suarez C, Araujo VC, Hermsen M, Altemani A, *Levels and patterns of expression of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, glucose transporter-1 and CD105 in adenoid cystic carcinomas with high-grade transformation*. *Histopathol*, 2012. **60**: p. 816-825.
- [77] Miyazawa K, T.T., Nakai D, Morita N, Suzuki K, *Immunohistochemical expression of four different stem cell markers in prostate cancer: High expression of NANOG in conjunction with hypoxia-inducible factor-1 α expression is involved in prostate epithelial malignancy*. *Oncology Lett*, 2014. **8**: p. 985-992.
- [78] Wang H, K.T., Shu L, Su Z, Fuentes F, Lee JH, Kong AN, *Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012. **12**: p. 1281–1305.
- [79] Kaur P, S.S., Gupta S, *Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**: p. 2210-2217.
- [80] Liu LZ, F.J., Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH, *Apigenin Inhibits Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Human Lung Cancer*

- Cells: Implication of Chemoprevention of Lung Cancer*. Mol Pharm, 2005. **68**: p. 635-643.
- [81] Fang J, X.C., Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH, *Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways*. FASEB J, 2005. **19**: p. 342-353.
- [82] Liu J, C.X., Xiao Q, Quan MF, *Apigenin inhibits HeLa sphere forming cells through inactivation of casein kinase 2 α* . Mole Med Report, 2015. **11**: p. 665-669.
- [83] Lima PO, J.C., Oliveira DT, Pereira MC, *Hypoxic Condition and Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Anticancer res, 2014. **34**: p. 605-612.
- [84] Atlasi Y, M.S., Ziaee SA, Bahrami AR, *OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**: p. 1598-1602.
- [85] Shushan E, T.J., GuDas LJ, Bergman Y, *Rex-1, a Gene Encoding a Transcription Factor Expressed in the Early Embryo, Is Regulated via Oct-3/4 and Oct-6 Binding to an Octamer Site and a Novel Protein, Rox-1, Binding to an Adjacent Site*. Mol cell biol, 1998. **18**: p. 1866-1878.
- [86] Ke XY, L.V., Gao SJ, Tong YW, Hedrick JL, Yang YY, *Co-delivery of thioridazine and doxorubicin using polymeric micelles for targeting both cancer cells and cancer stem cells*. Biomaterials, 2014. **35** p. 1096-1108.
- [87] Masuelli L, M.L., Quaranta A, Palumbo C, Pompa G, Izzi V, Canini A, Modesti A, Galvano F, Bei R, *Apigenin induces apoptosis and impairs head and neck carcinomas EGFR/ErbB2 signaling*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1060-1068.
- [88] Xu YY, W.T., Zhou SH, Bao YY, Yang QY, Fan J, Huang J, *Apigenin suppresses GLUT-1 and p-AKT expression to enhance the chemosensitivity to cisplatin of laryngeal carcinoma Hep-2 cells: an in vitro study*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**: p. 3938-3947.
- [89] Zhang Q, Z.X., Wang ZJ, *Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis*. Toxicol. in Vitro., 2009. **23**: p. 797-807.

- [90] Krishnamachary B, P.M., Nimmagadda S, Mironchik Y, Raman V, Solaiyappan M, Semenza2 GL, et al., *Hypoxia Regulates CD44 and Its Variant Isoforms through HIF-1 α in Triple Negative Breast Cancer*. PLOS ONE, 2012. **7**: p. 1-9.
- [91] Hu YY, F.L., Li SZ, Chen Y, Li JC, Han J, Liang L, Li L, Ji CC, Zheng MH, Han H, *Hif-1 α and Hif-2 α differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells*. Cancer Lett, 2014. **349**: p. 67-76.
- [92] Soeda A, P.M., Lee D, Mintz A, Theotokis AA, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park1 DM, *Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α* . Oncogene, 2009. **28**: p. 3949-3959.
- [93] Kolf CM, C.E., Tuan RS, *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**: p. 1-10.
- [94] Matsuo M, S.N., Saga N, Kaneko T, *Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**: p. 253-259
- [95] Hirsch HA, I.D., Struhl K, *Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth*. Pnas, 2012. **110**: p. 972-977.
- [96] Sun TM, W.Y., Wang F, Du JZ, Mao CQ, Sun CY, Tang RZ, Liu Y, Zhu J, Zhu YH, Yang XZ, Wang J, *Cancer stem cell therapy using doxorubicin conjugated to gold nanoparticles via hydrazone bonds*. Biomaterials, 2014. **35**: p. 836-845.



ภาคผนวก ก
รายละเอียดการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาผลของสภาวะพร้อมออกซิเจนต่อการแสดงออกของยีนตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

ตาราง 2 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ OCT-4 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

OCT4

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.5267	.20502	.11837	1.0174	2.0360	1.32	1.73
H24	3	1.1633	.10066	.05812	.9133	1.4134	1.07	1.27
Total	9	1.2300	.25990	.08663	1.0302	1.4298	1.00	1.73

ตาราง 3 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ OCT-4 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

OCT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.436	2	.218	12.539	.007
Within Groups	.104	6	.017		
Total	.540	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: OCT4

LSD

(I) condition		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N	H6	-.52667	.10767	.003	-.7901	-.2632
	H24	-.16333	.10767	.180	-.4268	.1001
H6	N	.52667	.10767	.003	.2632	.7901
	H24	.36333	.10767	.015	.0999	.6268
H24	N	.16333	.10767	.180	-.1001	.4268
	H6	-.36333	.10767	.015	-.6268	-.0999

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

ตาราง 4 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ NANOG ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

NANOG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.0500	.02000	.01155	1.0003	1.0997	1.03	1.07
H24	3	1.3667	.12741	.07356	1.0502	1.6832	1.22	1.45
Total	9	1.1389	.18388	.06129	.9975	1.2802	1.00	1.45

ตาราง 5 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ NANOG ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

NANOG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.237	2	.119	21.393	.002
Within Groups	.033	6	.006		
Total	.270	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: NANOG

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	-.05000	.06080	.442	-.1988	.0988
	H24	-.36667*	.06080	.001	-.5154	-.2179
H6	N	.05000	.06080	.442	-.0988	.1988
	H24	-.31667*	.06080	.002	-.4654	-.1679
H24	N	.36667*	.06080	.001	.2179	.5154
	H6	.31667*	.06080	.002	.1679	.4654

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

ตาราง 6 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ REX-1 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

REX-1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.0167	.02517	.01453	.9542	1.0792	.99	1.04
H24	3	1.6233	.09504	.05487	1.3872	1.8594	1.53	1.72
Total	9	1.2133	.31149	.10383	.9739	1.4528	.99	1.72

ตาราง 7 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ REX-1 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

REX-1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.757	2	.378	117.445	.000
Within Groups	.019	6	.003		
Total	.776	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: REX-1

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
N H6	-.01667	.04635	.731	-.1301	.0967
N H24	-.62333	.04635	.000	-.7367	-.5099
H6 N	.01667	.04635	.731	-.0967	.1301
H6 H24	-.60667	.04635	.000	-.7201	-.4933
H24 N	.62333	.04635	.000	.5099	.7367
H24 H6	.60667	.04635	.000	.4933	.7201

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

ตาราง 8 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ CD44 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

CD44

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.3867	.04726	.02728	1.2693	1.5041	1.35	1.44
H24	3	1.4900	.07000	.04041	1.3161	1.6639	1.42	1.56
Total	9	1.2922	.22764	.07588	1.1172	1.4672	1.00	1.56

ตาราง 9 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ CD44 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

CD44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.400	2	.200	84.173	.000
Within Groups	.014	6	.002		
Total	.415	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: CD44

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	-.38667*	.03981	.000	-.4841	-.2892
	H24	-.49000*	.03981	.000	-.5874	-.3926
H6	N	.38667*	.03981	.000	.2892	.4841
	H24	-.10333*	.03981	.041	-.2008	-.0059
H24	N	.49000*	.03981	.000	.3926	.5874
	H6	.10333*	.03981	.041	.0059	.2008

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

ตาราง 10 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ CD73 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

CD73

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.0200	.02646	.01528	.9543	1.0857	1.00	1.05
H24	3	1.0233	.00577	.00333	1.0090	1.0377	1.02	1.03
Total	9	1.0144	.01740	.00580	1.0011	1.0278	1.00	1.05

ตาราง 11 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ CD73 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

CD73

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	2	.000	1.955	.222
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.002	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: CD73

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	-.02000	.01277	.168	-.0512	.0112
	H24	-.02333	.01277	.117	-.0546	.0079
H6	N	.02000	.01277	.168	-.0112	.0512
	H24	-.00333	.01277	.803	-.0346	.0279
H24	N	.02333	.01277	.117	-.0079	.0546
	H6	.00333	.01277	.803	-.0279	.0346

ตาราง 12 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ CD105 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

CD105

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.7367	.21455	.12387	1.2037	2.2696	1.49	1.88
H24	3	1.1100	.10392	.06000	.8518	1.3682	1.05	1.23
Total	9	1.2822	.36420	.12140	1.0023	1.5622	1.00	1.88

ตาราง 13 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ CD105 ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

CD105

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.947	2	.474	25.007	.001
Within Groups	.114	6	.019		
Total	1.061	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: CD105

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
N H6	-.73667 [*]	.11238	.001	-1.0117	-.4617
N H24	-.11000	.11238	.365	-.3850	.1650
H6 N	.73667 [*]	.11238	.001	.4617	1.0117
H6 H24	.62667 [*]	.11238	.001	.3517	.9017
H24 N	.11000	.11238	.365	-.1650	.3850
H24 H6	-.62667 [*]	.11238	.001	-.9017	-.3517

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

ตาราง 14 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ VEGF ในเซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดย

กำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติเป็น 1 ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

Descriptives

VEGF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.4867	.05686	.03283	1.3454	1.6279	1.44	1.55
H24	3	1.6567	.06658	.03844	1.4913	1.8221	1.60	1.73
Total	9	1.3811	.29839	.09946	1.1517	1.6105	1.00	1.73



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: CD105

LSD

(I) condition		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N	H6	-2.92333 [*]	1.25264	.035	-5.6100	-.2367
	H24	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H6A2	-3.00000 [*]	1.25264	.031	-5.6866	-.3134
	H6A4	-.22333	1.25264	.861	-2.9100	2.4633
	H24A2	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H24A4	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
H6	N	2.92333 [*]	1.25264	.035	.2367	5.6100
	H24	2.92333 [*]	1.25264	.035	.2367	5.6100
	H6A2	-.07667	1.25264	.952	-2.7633	2.6100
	H6A4	2.70000 [*]	1.25264	.049	.0134	5.3866
	H24A2	2.92333 [*]	1.25264	.035	.2367	5.6100
	H24A4	2.92333 [*]	1.25264	.035	.2367	5.6100
H24	N	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H6	-2.92333 [*]	1.25264	.035	-5.6100	-.2367
	H6A2	-3.00000 [*]	1.25264	.031	-5.6866	-.3134
	H6A4	-.22333	1.25264	.861	-2.9100	2.4633
	H24A2	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H24A4	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
H6A2	N	3.00000 [*]	1.25264	.031	.3134	5.6866
	H6	.07667	1.25264	.952	-2.6100	2.7633
	H24	3.00000 [*]	1.25264	.031	.3134	5.6866
	H6A4	2.77667 [*]	1.25264	.044	.0900	5.4633
	H24A2	3.00000 [*]	1.25264	.031	.3134	5.6866
	H24A4	3.00000 [*]	1.25264	.031	.3134	5.6866
H6A4	N	.22333	1.25264	.861	-2.4633	2.9100
	H6	-2.70000 [*]	1.25264	.049	-5.3866	-.0134
	H24	.22333	1.25264	.861	-2.4633	2.9100
	H6A2	-2.77667 [*]	1.25264	.044	-5.4633	-.0900
	H24A2	.22333	1.25264	.861	-2.4633	2.9100
	H24A4	.22333	1.25264	.861	-2.4633	2.9100
H24A2	N	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H6	-2.92333 [*]	1.25264	.035	-5.6100	-.2367
	H24	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H6A2	-3.00000 [*]	1.25264	.031	-5.6866	-.3134
	H6A4	-.22333	1.25264	.861	-2.9100	2.4633
	H24A4	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
H24A4	N	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H6	-2.92333 [*]	1.25264	.035	-5.6100	-.2367
	H24	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866
	H6A2	-3.00000 [*]	1.25264	.031	-5.6866	-.3134
	H6A4	-.22333	1.25264	.861	-2.9100	2.4633
	H24A2	0.00000	1.25264	1.000	-2.6866	2.6866

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

ตาราง 15 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ VEGF ใน เซลล์ HN -30 ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ ทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลอง แต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA

VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.697	2	.348	136.361	.000
Within Groups	.015	6	.003		
Total	.712	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: VEGF

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	.48667*	.04128	.000	-.5877	-.3857
	H24	-.65667*	.04128	.000	-.7577	-.5557
H6	N	.48667*	.04128	.000	.3857	.5877
	H24	-.17000*	.04128	.006	-.2710	-.0690
H24	N	.65667*	.04128	.000	.5557	.7577
	H6	.17000*	.04128	.006	.0690	.2710

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

2. การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

ตาราง 16 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ HN-30 เมื่อได้รับสารอะพิจิเจนินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 100

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
H24h								
Api0uM	3	100.0000	0.00000	0.00000	100.0000	100.0000		
Api10uM	3	93.9300	8.72311	5.03629	72.2606	115.5994		
Api20uM	3	94.2200	8.51733	4.91748	73.0618	115.3782		
Api40uM	3	89.5167	1.46029	.84310	85.8891	93.1442		
Api80uM	3	64.2667	1.45514	.84013	60.6519	67.8814		
Api100uM	3	51.0033	8.08014	4.66507	30.9312	71.0755		
Total	18	82.1561	19.21728	4.52956	72.5996	91.7126		
H48h								
Api0uM	3	100.0000	0.00000	0.00000	100.0000	100.0000		
Api10uM	3	89.8467	5.35434	3.09133	76.5458	103.1476		
Api20uM	3	89.4933	7.60680	4.39179	70.5970	108.3897		
Api40uM	3	88.5333	11.75865	6.78886	59.3232	117.7434		
Api80uM	3	36.4233	6.80947	3.93145	19.5077	53.3390		
Api100uM	3	26.3767	.38760	.22378	25.4138	27.3395		
Total	18	71.7789	30.32077	7.14667	56.7007	86.8571		

ตาราง 17 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ HN-30 เมื่อได้รับสารอะพิจิเจนินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
H24h	Between Groups	5841.815	5	1168.363	32.131	.000
	Within Groups	436.352	12	36.363		
	Total	6278.168	17			
H48h	Between Groups	15086.297	5	3017.259	66.725	.000
	Within Groups	542.635	12	45.220		
	Total	15628.932	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
H24h	Api0uM	Api10uM	6.07000	4.92360	.241	-4.6576	16.7976	
		Api20uM	5.78000	4.92360	.263	-4.9476	16.5076	
		Api40uM	10.48333	4.92360	.055	-.2443	21.2109	
		Api80uM	35.73333	4.92360	.000	25.0057	46.4609	
		Api100uM	48.99667	4.92360	.000	38.2691	59.7243	
	Api10uM	Api0uM	-6.07000	4.92360	.241	-16.7976	4.6576	
		Api20uM	-.29000	4.92360	.954	-11.0176	10.4376	
		Api40uM	4.41333	4.92360	.388	-6.3143	15.1409	
		Api80uM	29.66333	4.92360	.000	18.9357	40.3909	
		Api100uM	42.92667	4.92360	.000	32.1991	53.6543	
	Api20uM	Api0uM	-5.78000	4.92360	.263	-16.5076	4.9476	
		Api10uM	.29000	4.92360	.954	-10.4376	11.0176	
		Api40uM	4.70333	4.92360	.358	-6.0243	15.4309	
		Api80uM	29.95333	4.92360	.000	19.2257	40.6809	
		Api100uM	43.21667	4.92360	.000	32.4891	53.9443	
	Api40uM	Api0uM	-10.48333	4.92360	.055	-21.2109	2.443	
		Api10uM	-4.41333	4.92360	.388	-15.1409	6.3143	
		Api20uM	-4.70333	4.92360	.358	-15.4309	6.0243	
		Api80uM	25.25000	4.92360	.000	14.5224	35.9776	
		Api100uM	38.51333	4.92360	.000	27.7857	49.2409	
	Api80uM	Api0uM	-35.73333	4.92360	.000	-46.4609	-25.0057	
		Api10uM	-29.66333	4.92360	.000	-40.3909	-18.9357	
		Api20uM	-29.95333	4.92360	.000	-40.6809	-19.2257	
		Api40uM	-25.25000	4.92360	.000	-35.9776	-14.5224	
		Api100uM	13.26333	4.92360	.020	2.5357	23.9909	
	Api100uM	Api0uM	-48.99667	4.92360	.000	-59.7243	-38.2691	
		Api10uM	-42.92667	4.92360	.000	-53.6543	-32.1991	
		Api20uM	-43.21667	4.92360	.000	-53.9443	-32.4891	
		Api40uM	-38.51333	4.92360	.000	-49.2409	-27.7857	
		Api80uM	-13.26333	4.92360	.020	-23.9909	-2.5357	
	H48h	Api0uM	Api10uM	10.15333	5.49057	.089	-1.8096	22.1163
			Api20uM	10.50667	5.49057	.080	-1.4563	22.4696
			Api40uM	11.46667	5.49057	.059	-.4963	23.4296
			Api80uM	63.57667	5.49057	.000	51.6137	75.5396
			Api100uM	73.62333	5.49057	.000	61.6604	85.5863
		Api10uM	Api0uM	-10.15333	5.49057	.089	-22.1163	1.8096
			Api20uM	.35333	5.49057	.950	-11.6096	12.3163
			Api40uM	1.31333	5.49057	.815	-10.6496	13.2763
			Api80uM	53.42333	5.49057	.000	41.4604	65.3863
			Api100uM	63.47000	5.49057	.000	51.5071	75.4329
Api20uM		Api0uM	-10.50667	5.49057	.080	-22.4696	1.4563	
		Api10uM	-.35333	5.49057	.950	-12.3163	11.6096	
		Api40uM	.96000	5.49057	.864	-11.0029	12.9229	
		Api80uM	53.07000	5.49057	.000	41.1071	65.0329	
		Api100uM	63.11667	5.49057	.000	51.1537	75.0796	
Api40uM		Api0uM	-11.46667	5.49057	.059	-23.4296	4.963	
		Api10uM	-1.31333	5.49057	.815	-13.2763	10.6496	
		Api20uM	-.96000	5.49057	.864	-12.9229	11.0029	
		Api80uM	52.11000	5.49057	.000	40.1471	64.0729	
		Api100uM	62.15667	5.49057	.000	50.1937	74.1196	
Api80uM		Api0uM	-63.57667	5.49057	.000	-75.5396	-51.6137	
		Api10uM	-53.42333	5.49057	.000	-65.3863	-41.4604	
		Api20uM	-53.07000	5.49057	.000	-65.0329	-41.1071	
		Api40uM	-52.11000	5.49057	.000	-64.0729	-40.1471	
		Api100uM	10.04667	5.49057	.092	-1.9163	22.0096	
Api100uM		Api0uM	-73.62333	5.49057	.000	-85.5863	-61.6604	
		Api10uM	-63.47000	5.49057	.000	-75.4329	-51.5071	
		Api20uM	-63.11667	5.49057	.000	-75.0796	-51.1537	
		Api40uM	-62.15667	5.49057	.000	-74.1196	-50.1937	
		Api80uM	-10.04667	5.49057	.092	-22.0096	1.9163	

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

3. การศึกษาผลของอะพิจเงินต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน

ตาราง 18 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ OCT-4 ในเซลล์มะเร็ง คีระและลำคอก เมื่อได้รับสารอะพิจเงินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives

OCT4

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	2.4333	.73704	.42553	.6024	4.2643	1.73	3.20
H24	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6A2	3	2.4533	.88161	.50900	.2633	4.6434	1.49	3.22
H6A4	3	1.7400	.66836	.38588	.0797	3.4003	1.31	2.51
H24A2	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H24A4	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
Total	21	1.5181	.77589	.16931	1.1649	1.8713	1.00	3.22

ตาราง 19 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ OCT-4 ในเซลล์มะเร็ง คีระและลำคอก เมื่อได้รับสารอะพิจเงินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

ANOVA

OCT4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.506	6	1.418	5.615	.004
Within Groups	3.534	14	.252		
Total	12.040	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: OCT4

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	-1.43333	.41025	.004	-2.3132	-.5534
	H24	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H6A2	-1.45333	.41025	.003	-2.3332	-.5734
	H6A4	-.74000	.41025	.093	-1.6199	.1399
	H24A2	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H24A4	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
H6	N	1.43333	.41025	.004	.5534	2.3132
	H24	1.43333	.41025	.004	.5534	2.3132
	H6A2	-.02000	.41025	.962	-.8999	.8599
	H6A4	.69333	.41025	.113	-.1866	1.5732
	H24A2	1.43333	.41025	.004	.5534	2.3132
	H24A4	1.43333	.41025	.004	.5534	2.3132
H24	N	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H6	-1.43333	.41025	.004	-2.3132	-.5534
	H6A2	-1.45333	.41025	.003	-2.3332	-.5734
	H6A4	-.74000	.41025	.093	-1.6199	.1399
	H24A2	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H24A4	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
H6A2	N	1.45333	.41025	.003	.5734	2.3332
	H6	.02000	.41025	.962	-.8599	.8999
	H24	1.45333	.41025	.003	.5734	2.3332
	H6A4	.71333	.41025	.104	-.1666	1.5932
	H24A2	1.45333	.41025	.003	.5734	2.3332
	H24A4	1.45333	.41025	.003	.5734	2.3332
H6A4	N	.74000	.41025	.093	-.1399	1.6199
	H6	-.69333	.41025	.113	-1.5732	.1866
	H24	.74000	.41025	.093	-.1399	1.6199
	H6A2	-.71333	.41025	.104	-1.5932	.1666
	H24A2	.74000	.41025	.093	-.1399	1.6199
	H24A4	.74000	.41025	.093	-.1399	1.6199
H24A2	N	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H6	-1.43333	.41025	.004	-2.3132	-.5534
	H24	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H6A2	-1.45333	.41025	.003	-2.3332	-.5734
	H6A4	-.74000	.41025	.093	-1.6199	.1399
	H24A4	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
H24A4	N	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H6	-1.43333	.41025	.004	-2.3132	-.5534
	H24	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799
	H6A2	-1.45333	.41025	.003	-2.3332	-.5734
	H6A4	-.74000	.41025	.093	-1.6199	.1399
	H24A2	0.00000	.41025	1.000	-.8799	.8799

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

ตาราง 20 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ *NANOG* ในเซลล์มะเร็งคีร์ชะและลำคอก เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives

NANOG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H24	3	4.1700	1.86019	1.07398	-.4510	8.7910	2.03	5.40
H6A2	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6A4	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H24A2	3	1.5900	2.14028	1.23569	-3.7268	6.9068	.03	4.03
H24A4	3	1.1733	1.37773	.79543	-2.2491	4.5958	.28	2.76
Total	21	1.5619	1.49213	.32561	.8827	2.2411	.03	5.40

ตาราง 21 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ *NANOG* ในเซลล์มะเร็งคีร์ชะและลำคอก เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

ANOVA

NANOG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.651	6	4.108	2.893	.048
Within Groups	19.878	14	1.420		
Total	44.529	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: NANOG

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A2	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6A4	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H6	N	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A2	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6A4	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H24	N	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H6	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H6A2	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H6A4	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H24A2	2.58000*	.97293	.019	.4933	4.6667
	H24A4	2.99667*	.97293	.008	.9099	5.0834
H6A2	N	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A4	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H6A4	N	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A2	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H24A2	N	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H6	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H24	-2.58000*	.97293	.019	-4.6667	-.4933
	H6A2	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H6A4	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H24A4	.41667	.97293	.675	-1.6701	2.5034
H24A4	N	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H6	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H24	-2.99667*	.97293	.008	-5.0834	-.9099
	H6A2	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H6A4	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H24A2	-.41667	.97293	.675	-2.5034	1.6701

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

ตาราง 22 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ REX-1 ในเซลล์มะเร็งรังสีและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives

REX1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H24	3	3.4300	1.49228	.86157	-.2770	7.1370	2.03	5.00
H6A2	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6A4	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H24A2	3	3.2400	.93440	.53948	.9188	5.5612	2.19	3.98
H24A4	3	3.1733	.91675	.52929	.8960	5.4507	2.13	3.85
Total	21	1.9776	1.31810	.28763	1.3776	2.5776	1.00	5.00

ตาราง 23 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ REX-1 ในเซลล์มะเร็งรังสีและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

ANOVA

REX1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.867	6	4.478	7.955	.001
Within Groups	7.881	14	.563		
Total	34.748	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: REX1

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24	-2.43000*	.61260	.001	-3.7439	-1.1161
	H6A2	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H6A4	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24A2	-2.24000*	.61260	.003	-3.5539	-.9261
	H24A4	-2.17333*	.61260	.003	-3.4872	-.8594
H6	N	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24	-2.43000*	.61260	.001	-3.7439	-1.1161
	H6A2	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H6A4	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24A2	-2.24000*	.61260	.003	-3.5539	-.9261
	H24A4	-2.17333*	.61260	.003	-3.4872	-.8594
H24	N	2.43000*	.61260	.001	1.1161	3.7439
	H6	2.43000*	.61260	.001	1.1161	3.7439
	H6A2	2.43000*	.61260	.001	1.1161	3.7439
	H6A4	2.43000*	.61260	.001	1.1161	3.7439
	H24A2	.19000	.61260	.761	-1.1239	1.5039
	H24A4	.25667	.61260	.682	-1.0572	1.5706
H6A2	N	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H6	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24	-2.43000*	.61260	.001	-3.7439	-1.1161
	H6A4	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24A2	-2.24000*	.61260	.003	-3.5539	-.9261
	H24A4	-2.17333*	.61260	.003	-3.4872	-.8594
H6A4	N	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H6	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24	-2.43000*	.61260	.001	-3.7439	-1.1161
	H6A2	0.00000	.61260	1.000	-1.3139	1.3139
	H24A2	-2.24000*	.61260	.003	-3.5539	-.9261
	H24A4	-2.17333*	.61260	.003	-3.4872	-.8594
H24A2	N	2.24000*	.61260	.003	.9261	3.5539
	H6	2.24000*	.61260	.003	.9261	3.5539
	H24	-.19000	.61260	.761	-1.5039	1.1239
	H6A2	2.24000*	.61260	.003	.9261	3.5539
	H6A4	2.24000*	.61260	.003	.9261	3.5539
	H24A4	.06667	.61260	.915	-1.2472	1.3806
H24A4	N	2.17333*	.61260	.003	.8594	3.4872
	H6	2.17333*	.61260	.003	.8594	3.4872
	H24	-.25667	.61260	.682	-1.5706	1.0572
	H6A2	2.17333*	.61260	.003	.8594	3.4872
	H6A4	2.17333*	.61260	.003	.8594	3.4872
	H24A2	-.06667	.61260	.915	-1.3806	1.2472

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

ตาราง 24 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ *CD44* ในเซลล์มะเร็งรังสีรักษาและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives

CD44

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	3.0600	.78689	.45431	1.1053	5.0147	2.34	3.90
H24	3	2.7700	.40286	.23259	1.7692	3.7708	2.31	3.06
H6A2	3	4.3567	.87237	.50366	2.1896	6.5238	3.62	5.32
H6A4	3	.9233	.10970	.06333	.6508	1.1958	.80	1.01
H24A2	3	1.0700	.05292	.03055	.9386	1.2014	1.01	1.11
H24A4	3	.9533	.36611	.21137	.0439	1.8628	.65	1.36
Total	21	2.0190	1.37013	.29899	1.3954	2.6427	.65	5.32

ตาราง 25 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ *CD44* ในเซลล์มะเร็งรังสีรักษาและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

ANOVA

CD44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.162	6	5.694	23.564	.000
Within Groups	3.383	14	.242		
Total	37.545	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: CD44

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	-2.06000 [*]	.40135	.000	-2.9208	-1.1992
	H24	-1.77000 [*]	.40135	.001	-2.6308	-.9092
	H6A2	-3.35667 [*]	.40135	.000	-4.2175	-2.4958
	H6A4	.07667	.40135	.851	-.7842	.9375
	H24A2	-.07000	.40135	.864	-.9308	.7908
	H24A4	.04667	.40135	.909	-.8142	.9075
H6	N	2.06000 [*]	.40135	.000	1.1992	2.9208
	H24	.29000	.40135	.482	-.5708	1.1508
	H6A2	-1.29667 [*]	.40135	.006	-2.1575	-.4358
	H6A4	2.13667 [*]	.40135	.000	1.2758	2.9975
	H24A2	1.99000 [*]	.40135	.000	1.1292	2.8508
	H24A4	2.10667 [*]	.40135	.000	1.2458	2.9675
H24	N	1.77000 [*]	.40135	.001	.9092	2.6308
	H6	-.29000	.40135	.482	-1.1508	.5708
	H6A2	-1.58667 [*]	.40135	.001	-2.4475	-.7258
	H6A4	1.84667 [*]	.40135	.000	.9858	2.7075
	H24A2	1.70000 [*]	.40135	.001	.8392	2.5608
	H24A4	1.81667 [*]	.40135	.000	.9558	2.6775
H6A2	N	3.35667 [*]	.40135	.000	2.4958	4.2175
	H6	1.29667 [*]	.40135	.006	.4358	2.1575
	H24	1.58667 [*]	.40135	.001	.7258	2.4475
	H6A4	3.43333 [*]	.40135	.000	2.5725	4.2942
	H24A2	3.28667 [*]	.40135	.000	2.4258	4.1475
	H24A4	3.40333 [*]	.40135	.000	2.5425	4.2642
H6A4	N	-.07667	.40135	.851	-.9375	.7842
	H6	-2.13667 [*]	.40135	.000	-2.9975	-1.2758
	H24	-1.84667 [*]	.40135	.000	-2.7075	-.9858
	H6A2	-3.43333 [*]	.40135	.000	-4.2942	-2.5725
	H24A2	-.14667	.40135	.720	-1.0075	.7142
	H24A4	-.03000	.40135	.941	-.8908	.8308
H24A2	N	.07000	.40135	.864	-.7908	.9308
	H6	-1.99000 [*]	.40135	.000	-2.8508	-1.1292
	H24	-1.70000 [*]	.40135	.001	-2.5608	-.8392
	H6A2	-3.28667 [*]	.40135	.000	-4.1475	-2.4258
	H6A4	.14667	.40135	.720	-.7142	1.0075
	H24A4	.11667	.40135	.776	-.7442	.9775
H24A4	N	-.04667	.40135	.909	-.9075	.8142
	H6	-2.10667 [*]	.40135	.000	-2.9675	-1.2458
	H24	-1.81667 [*]	.40135	.000	-2.6775	-.9558
	H6A2	-3.40333 [*]	.40135	.000	-4.2642	-2.5425
	H6A4	.03000	.40135	.941	-.8308	.8908
	H24A2	-.11667	.40135	.776	-.9775	.7442

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

ตาราง 26 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ *CD105* ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives

CD105

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	3.9233	1.75032	1.01055	-.4247	8.2714	2.57	5.90
H24	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6A2	3	4.0000	3.66001	2.11311	-5.0920	13.0920	1.32	8.17
H6A4	3	1.2233	.12741	.07356	.9068	1.5398	1.14	1.37
H24A2	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H24A4	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
Total	21	1.8781	1.86476	.40692	1.0293	2.7269	1.00	8.17

ตาราง 27 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ *CD105* ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

ANOVA

CD105

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36.595	6	6.099	2.591	.067
Within Groups	32.951	14	2.354		
Total	69.546	20			

ตาราง 28 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives

VEGF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
H6	3	4.1200	.81707	.47173	2.0903	6.1497	3.18	4.66
H24	3	4.5133	.84198	.48612	2.4217	6.6049	3.64	5.32
H6A2	3	4.4900	.89146	.51468	2.2755	6.7045	3.47	5.12
H6A4	3	1.0033	.22234	.12837	.4510	1.5556	.87	1.26
H24A2	3	2.1567	.21079	.12170	1.6330	2.6803	1.98	2.39
H24A4	3	1.8133	.76794	.44337	-.0943	3.7210	1.36	2.70
Total	21	2.7281	1.60887	.35108	1.9957	3.4604	.87	5.32

ตาราง 29 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิเจนินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

ANOVA

VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	46.060	6	7.677	18.823	.000
Within Groups	5.710	14	.408		
Total	51.769	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: VEGF

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	-3.12000*	.52143	.000	-4.2384	-2.0016
	H24	-3.51333*	.52143	.000	-4.6317	-2.3950
	H6A2	-3.49000*	.52143	.000	-4.6084	-2.3716
	H6A4	-.00333	.52143	.995	-1.1217	1.1150
	H24A2	-1.15667*	.52143	.044	-2.2750	-.0383
	H24A4	-.81333	.52143	.141	-1.9317	.3050
H6	N	3.12000*	.52143	.000	2.0016	4.2384
	H24	-.39333	.52143	.463	-1.5117	.7250
	H6A2	-.37000	.52143	.490	-1.4884	.7484
	H6A4	3.11667*	.52143	.000	1.9983	4.2350
	H24A2	1.96333*	.52143	.002	.8450	3.0817
	H24A4	2.30667*	.52143	.001	1.1883	3.4250
H24	N	3.51333*	.52143	.000	2.3950	4.6317
	H6	.39333	.52143	.463	-.7250	1.5117
	H6A2	.02333	.52143	.965	-1.0950	1.1417
	H6A4	3.51000*	.52143	.000	2.3916	4.6284
	H24A2	2.35667*	.52143	.000	1.2383	3.4750
	H24A4	2.70000*	.52143	.000	1.5816	3.8184
H6A2	N	3.49000*	.52143	.000	2.3716	4.6084
	H6	.37000	.52143	.490	-.7484	1.4884
	H24	-.02333	.52143	.965	-1.1417	1.0950
	H6A4	3.48667*	.52143	.000	2.3683	4.6050
	H24A2	2.33333*	.52143	.001	1.2150	3.4517
	H24A4	2.67667*	.52143	.000	1.5583	3.7950
H6A4	N	.00333	.52143	.995	-1.1150	1.1217
	H6	-3.11667*	.52143	.000	-4.2350	-1.9983
	H24	-3.51000*	.52143	.000	-4.6284	-2.3916
	H6A2	-3.48667*	.52143	.000	-4.6050	-2.3683
	H24A2	-1.15333*	.52143	.044	-2.2717	-.0350
	H24A4	-.81000	.52143	.143	-1.9284	.3084
H24A2	N	1.15667*	.52143	.044	.0383	2.2750
	H6	-1.96333*	.52143	.002	-3.0817	-.8450
	H24	-2.35667*	.52143	.000	-3.4750	-1.2383
	H6A2	-2.33333*	.52143	.001	-3.4517	-1.2150
	H6A4	1.15333*	.52143	.044	.0350	2.2717
	H24A4	.34333	.52143	.521	-.7750	1.4617
H24A4	N	.81333	.52143	.141	-.3050	1.9317
	H6	-2.30667*	.52143	.001	-3.4250	-1.1883
	H24	-2.70000*	.52143	.000	-3.8184	-1.5816
	H6A2	-2.67667*	.52143	.000	-3.7950	-1.5583
	H6A4	.81000	.52143	.143	-.3084	1.9284
	H24A2	-.34333	.52143	.521	-1.4617	.7750

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

4. การศึกษาผลของอะพิจเงินต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในสภาวะพร้อมออกซิเจน

ตาราง 30 แสดงข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิจเงินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าเป็น 1

Descriptives							
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
CD44	N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000
	H48	3	1.7700	.11269	.06506	1.4901	2.0499
	H48hApi40uM	3	.7500	.25710	.14844	.1113	1.3887
	Total	9	1.1733	.48133	.16044	.8034	1.5433
CD105	N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000
	H48	3	1.4000	.24556	.14177	.7900	2.0100
	H48hApi40uM	3	.9267	.17214	.09939	.4990	1.3543
	Total	9	1.1089	.26676	.08892	.9038	1.3139
STRO-1	N	3	1.0000	0.00000	0.00000	1.0000	1.0000
	H48	3	1.5700	.29103	.16803	.8470	2.2930
	H48hApi40uM	3	.9467	.26839	.15496	.2799	1.6134
	Total	9	1.1722	.35877	.11959	.8964	1.4480

ตาราง 31 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการแสดงออกของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของตัวบ่งชี้การมีอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ เมื่อได้รับสารอะพิจเงินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะพร้อมออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD44	Between Groups	1.696	2	.848	32.280	.001
	Within Groups	.158	6	.026		
	Total	1.853	8			
CD105	Between Groups	.389	2	.195	6.495	.032
	Within Groups	.180	6	.030		
	Total	.569	8			
STRO-1	Between Groups	.716	2	.358	6.855	.028
	Within Groups	.313	6	.052		
	Total	1.030	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CD44	N	H48	-.77000*	.13233	.001	-1.0938	-.4462
		H48hApi40uM	.25000	.13233	.108	-.0738	.5738
	H48	N	.77000*	.13233	.001	.4462	1.0938
		H48hApi40uM	1.02000*	.13233	.000	.6962	1.3438
	H48hApi40uM	N	-.25000	.13233	.108	-.5738	.0738
		H48	-1.02000*	.13233	.000	-1.3438	-.6962
CD105	N	H48	-.40000*	.14137	.030	-.7459	-.0541
		H48hApi40uM	.07333	.14137	.623	-.2726	.4193
	H48	N	.40000*	.14137	.030	.0541	.7459
		H48hApi40uM	.47333*	.14137	.015	.1274	.8193
	H48hApi40uM	N	-.07333	.14137	.623	-.4193	.2726
		H48	-.47333*	.14137	.015	-.8193	-.1274
STRO-1	N	H48	-.57000*	.18663	.022	-1.0267	-.1133
		H48hApi40uM	.05333	.18663	.785	-.4033	.5100
	H48	N	.57000*	.18663	.022	.1133	1.0267
		H48hApi40uM	.62333*	.18663	.016	.1667	1.0800
	H48hApi40uM	N	-.05333	.18663	.785	-.5100	.4033
		H48	-.62333*	.18663	.016	-1.0800	-.1667

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



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Vari: NANOG

LSD

(I) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
N	H6	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A2	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6A4	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H6	N	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A2	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6A4	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H24	N	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H6	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H6A2	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H6A4	3.17000*	.97293	.006	1.0833	5.2567
	H24A2	2.58000*	.97293	.019	.4933	4.6667
	H24A4	2.99667*	.97293	.008	.9099	5.0834
H6A2	N	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A4	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H6A4	N	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H6	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24	-3.17000*	.97293	.006	-5.2567	-1.0833
	H6A2	0.00000	.97293	1.000	-2.0867	2.0867
	H24A2	-.59000	.97293	.554	-2.6767	1.4967
	H24A4	-.17333	.97293	.861	-2.2601	1.9134
H24A2	N	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H6	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H24	-2.58000*	.97293	.019	-4.6667	-.4933
	H6A2	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H6A4	.59000	.97293	.554	-1.4967	2.6767
	H24A4	.41667	.97293	.675	-1.6701	2.5034
H24A4	N	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H6	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H24	-2.99667*	.97293	.008	-5.0834	-.9099
	H6A2	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H6A4	.17333	.97293	.861	-1.9134	2.2601
	H24A2	-.41667	.97293	.675	-2.5034	1.6701

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

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวยุวภรณ์ เกตุแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2533 เข้าศึกษาในหลักสูตร
วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา
2551 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาในระดับปริญญาตรี บ้านเลขที่ 67 หมู่ 3 ถนน
เศรษฐกิจ 1 ตำบลคลองมะเดื่อ อำเภอกะทู้ม้าน จังหวัดสมุทรสาคร 74110

