

ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารลูพาลบิจีนินจากเถาว์ลยเป็รียง

ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง



นายกันต์ธร สุทธิธรรม

นางสาวเจตวดี อนันต์ธนาเกษม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

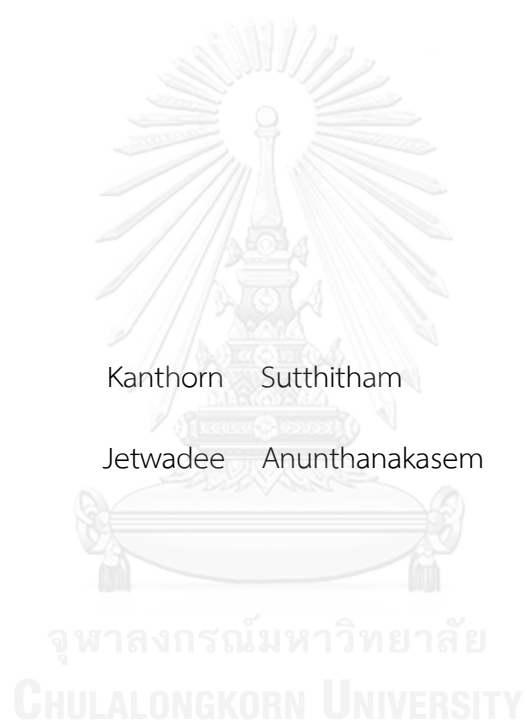
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Cytotoxicity of lupalbigenin from *Derris scandens*  
against ovarian cancer cell lines



A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Doctor of Pharmacy Program in Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University

2016

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

**บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์**

ชื่อโครงการ	: ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารลูพาลบิจินินจากเถาวัลย์เปรียง ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง	
หัวหน้าโครงการ	: นายกันต์ธร สุทธิธรรม	5536505533
ผู้ร่วมโครงการ	: นางสาวเจตวดี อนันต์ธนาเกษม	5536514133
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	: รศ. ภญ. ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ	: ผศ. ดร.วรัญญู พูลเจริญ	
สาขา/ภาควิชา	: การค้นพบและพัฒนายา/เภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์	

ลูพาลบิจินินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากเถาของเถาวัลย์เปรียง มีรายงานถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาในเซลล์มะเร็งรังไข่ ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เซลล์มะเร็งรังไข่สองชนิด ได้แก่ SKOV3 ซึ่งเป็นเซลล์ adenocarcinoma และ PA-1 ซึ่งเป็นเซลล์ teratocarcinoma ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของลูพาลบิจินิน พบว่าความเข้มข้นของลูพาลบิจินินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SKOV3 และ PA-1 ได้ร้อยละ 50 มีค่าเป็น  $52.12 \pm 5.49$  และ  $29.37 \pm 1.61$  ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ลูพาลบิจินินที่ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ได้ร้อยละ 50 สามารถกระตุ้นให้ SKOV3 เกิดการตายแบบ apoptosis และมี การแสดงออกของเอนไซม์ caspase หลายชนิด เมื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3, 8 และ 9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการตายแบบ apoptosis พบการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นจึงลดลง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตายแบบ apoptosis เพิ่มเติมโดยละเอียด เพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

ในขณะที่เซลล์ PA-1 เมื่อได้รับลูพาลบิจินินที่ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ได้ร้อยละ 50 นั้นกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ necrosis ในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 และพบการตายแบบ apoptosis ในชั่วโมงที่ 72 สอดคล้องกับผลการแสดงออกของเอนไซม์ caspase หลายชนิดหลังจากชั่วโมงที่ 48 ทั้งนี้ลูพาลบิจินินมีผลกระตุ้นให้เซลล์ PA-1 เกิดการตายแบบ necrosis ช่วงแรกและแบบ apoptosis ตามมาในช่วงหลัง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์ของลูพาลบิจินินต่อเซลล์ PA-1 เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดต่อไป

คณะเภสัชศาสตร์

ลายมือชื่อนิติ.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิติเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

**Abstract**

**Senior project title** : Cytotoxicity of lupalbigenin from *Derris scandens* against ovarian cancer cell lines

**Students' name** : Mr. Kanthorn Sutthitham 5536505533  
: Miss Jetwadee Ananthanakasem 5536514133

**Advisor/Co-advisor** : Assoc. Prof. Suchada Sukrong Ph.D.,  
Asst. Prof. Waranyoo Phoolcharoen Ph.D

**Field/Department** : Drug Discovery and Development/ Pharmacognosy and  
Pharmaceutical Botany

Lupalbigenin is a flavonoid extracted from stems of *Derris scandens* Benth. Previous study showed that lupalbigenin has cytotoxicity against many cancer cells such as lung and breast cancer cells. However, cytotoxicity against ovarian cancer cells has not been carried out yet. In this study, we aimed to investigate the cytotoxicity of lupalbigenin against two types of ovarian cancer cell lines, SKOV3 (adenocarcinoma) and PA-1 (teratocarcinoma). It was found that lupalbigenin exhibits cytotoxicity towards SKOV3 and PA-1. The IC<sub>50</sub> of SKOV3 and PA-1 were 52.12±5.49 and 29.37±1.61 μM, respectively. From flow cytometry analysis, lupalbigenin induced apoptosis in SKOV3 by multicaspase enzymes expression. Multicaspase enzymes including caspase-1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 enzyme play an important role in apoptosis. In real-time PCR, the expression of caspase-3, 8 and 9 genes gradually increased until 24 h and then decreased. In further study, expression of proteins related to apoptosis need to be done. It would provide more evidence concerning the clearly mechanism of action of lupalbigenin.

The necrosis of PA-1 was observed by flow cytometry analysis after lupalbigenin treatment. However, the apoptotic cells were also detected after 72 h treatment correlating to multicaspase expression which gradually increased after 48 hours. This interesting result suggested that lupalbigenin can induce cell death by both apoptosis and necrosis pathways since the necrosis cells were early detected within 12 h after treatment and apoptotic cells were determined later. Nevertheless, the exact mode of action of lupalbigenin against PA-1 need to be clarified.

Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University

Student's signature.....  
Advisor's signature.....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## คำนำ

โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้บัณฑิตเภสัชศาสตร์ได้มีการเรียนรู้ให้มีความเชี่ยวชาญ ในด้านที่ตนสนใจ รวมถึงฝึกฝนตนเอง ทั้งในเรื่องของการคิดวิเคราะห์ การคิดวางแผนการทำงาน อย่างเป็นระบบ การทำงานเป็นทีม รวมถึงการวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนานาวิชาชีพ และส่งเสริมสุขภาพที่ดีให้แก่ประชาชน

รายงานโครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเสนอผลการวิจัยในหัวข้อเรื่อง ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารลูพาลบิจินินจากเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง ซึ่งมีเนื้อหาในเรื่อง ของที่มาและความสำคัญของโครงการ ขั้นตอนและวัสดุที่ใช้ในการศึกษา ผลการวิจัยรวมถึงการอภิปราย และสรุปผลการวิจัย ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความมุ่งหวังว่ารายงานฉบับนี้จะสามารถนำไปวิจัยเพิ่มเติมเพื่อหา กลไกของสารชนิดนี้ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ รวมไปถึงเพื่อสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาที่สามารถใช้ยับยั้ง มะเร็งรังไข่หรือใช้เป็นประโยชน์กับผู้ป่วยมะเร็งได้ในอนาคต หากโครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ มีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขห่อง อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิญญู พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดทั้งให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ รวมถึงช่วยตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการปริญญาโทครั้งนี้ จนทำให้โครงการปริญญาโทและรายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรียรัตน์ พรธาดาวิทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังไข่

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกษัชกร.ดร.ปิติ จันทร์วรโชติ ภาควิชาเภสัชวิทยาและ สรีระวิทยา ที่ได้ให้คำแนะนำในเรื่องลักษณะการตายของเซลล์ รวมถึงข้อแนะนำต่างๆที่ใช้ประกอบการทำโครงการปริญญาโทครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.จिरยุทธ์ ใจแก้ว ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในด้านต่างๆโดยเฉพาะในเรื่องของการทำ real-time PCR จนกระทั่งโครงการปริญญาโทครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ เกษัชกรหญิง นภัสวรรณ ภูริจารุโรจน์ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเภสัชเวช และเภสัชพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือตลอดจนคำแนะนำ วิธีการในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังไข่และการทำ MTT assay

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารบัญ

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์	ก
คำนำ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1    ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2    วัตถุประสงค์	1
1.3    วิธีการดำเนินงานโดยย่อ	2
1.4    ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การปริทัศน์วรรณกรรม	5
2.1    ธรรมชาติของเซลล์มะเร็ง	5
2.2    ประเภทของมะเร็งรังไข่	6
2.3    เซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง	8
2.4    การตายของเซลล์	9
2.5    การออกฤทธิ์ของยาต้านมะเร็ง	13
2.6    การศึกษาฤทธิ์ของลูพาลบิซีนินที่ผ่านมา	15
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย	17
3.1    อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	17
3.2    สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	18

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารบัญ (ต่อ)

3.3	เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	19
3.4	วิธีการที่ใช้ในงานวิจัย	19
บทที่ 4	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	23
4.1	ผลการวิจัย	23
4.1.1	การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วย MTT assays	23
4.1.2	ผลการทดลองในเซลล์มะเร็งรังไข่ เพาะเลี้ยง SKOV3	24
4.1.3	ผลการทดลองในเซลล์มะเร็งรังไข่ เพาะเลี้ยง PA-1	27
4.2	อภิปรายผล	29
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย	33
	รายการอ้างอิง	35

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงผลความเข้มข้นของจุพาลปิฉินินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 23



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 กระบวนการตายแบบ necrosis และกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยผ่านโปรตีน caspase	12
ภาพที่ 2 กระบวนการ apoptosis แบบอาศัยและไม่อาศัยโปรตีน caspase	13
ภาพที่ 3(ก)ภาพถ่ายเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆด้วยกำลังขยาย 10เท่า	24
ภาพที่ 3(ข) ภาพถ่ายเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆด้วยกำลังขยาย 20 เท่า	24
ภาพที่ 3(ค) กราฟแสดงผลการเกิด apoptosis ในเซลล์SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจินิน ที่ระยะเวลาต่างๆโดยย้อมเซลล์ด้วยสี Annexin V/7-AAD	24
ภาพที่ 3(ง) กราฟแสดงผลเอนไซม์ caspase หลายชนิดในเซลล์SKOV3 หลังได้รับ ลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆโดยย้อมเซลล์ด้วยสี FLICA/7-AAD	24
ภาพที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณการแสดงออกของยีน caspaseของเซลล์ SKOV3	26
ภาพที่ 5(ก) ภาพถ่ายเซลล์ PA-1หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆด้วยกำลังขยาย 10เท่า	27
ภาพที่ 5(ข) ภาพถ่ายเซลล์ PA-1หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆด้วยกำลังขยาย 20 เท่า	27
ภาพที่ 5(ค) กราฟแสดงผลการเกิด apoptosis ในเซลล์PA-1 หลังได้รับลูพาลบิจินิน ที่ระยะเวลาต่างๆโดยย้อมเซลล์ด้วยสี Annexin V/7-AAD	27
ภาพที่ 5(ง) กราฟแสดงผลเอนไซม์ caspase หลายชนิดในเซลล์PA-1หลังได้รับลูพาลบิจินิน ที่ระยะเวลาต่างๆโดยย้อมเซลล์ด้วยสี FLICA/7-AAD	27
ภาพที่ 6(ก) แผนภูมิแท่งแสดงรูปแบบการตายของเซลล์ PA-1 หลังได้รับลูพาลบิจินิน	34

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

### สารบัญญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ 6(ข) แผนภูมิแท่งแสดงรูปแบบการตายของเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจีนิน	34
ภาพที่ 6(ค) แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ caspase enzyme ของเซลล์ PA-1 หลังได้รับลูพาลบิจีนิน	34
ภาพที่ 6(ง) แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ caspase enzyme ของเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจีนิน	34



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

FBS	=	Fetal bovine serum
%	=	ร้อยละ
°C	=	องศาเซลเซียส
μl	=	microliter (ไมโครลิตร)
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
μM	=	micromolar (ไมโครโมลาร์)
MTT	=	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	=	nanometer (นาโนเมตร)
IC <sub>50</sub>	=	The half maximal inhibitory concentration
ml	=	milliliter (มิลลิลิตร)
FLICA	=	Fluorescent-Labeled Inhibitor of Caspases
7-AAD	=	7-aminoactinomycin D
PCR	=	Polymerase chain reaction
cDNA	=	complementary DNA
mM	=	millimolar (ไมโครโมลาร์)
M	=	molar (โมลาร์)
dNTP	=	Deoxynucleotide
RT buffer	=	reverse transcriptase buffer
DTT	=	Dithiothreitol
RNase OUT	=	Recombinant Ribonuclease Inhibitor
GAPDH	=	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคมะเร็งคร่าชีวิตมนุษย์มากที่สุดในอันดับ 1 ทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก พบว่าในปี พ.ศ. 2557 มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 70,000 คนหรือคิดเป็น 16.71% จากสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั้งหมดและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 จนถึงปัจจุบัน<sup>1</sup> มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) เป็นมะเร็งทางนรีเวชที่พบมากเป็นอันดับสอง คิดเป็น 5.6 คนต่อประชากร 100,000 คน<sup>1</sup> แม้ว่าอุบัติการณ์จะไม่สูงเท่ามะเร็งบางชนิด แต่มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งชนิดที่มีความรุนแรงมากที่สุดโรคมะเร็งทางนรีเวช และมีอัตราการเสียชีวิตมากที่สุด สตรีที่หมดประจำเดือนแล้วเสี่ยงที่จะพบก้อนเนื้องอกบริเวณรังไข่ ที่เป็นเนื้องอกมะเร็งถึง 40% จากการเกิดก้อนเนื้องอกทั้งหมด<sup>2</sup> อีกทั้งมะเร็งรังไข่ยังไม่มีวัคซีนในการป้องกัน

ในปัจจุบันมีการรักษาด้วยวิธีต่างๆ เช่น การรักษาเคมีบำบัด การฉายรังสี การผ่าตัด และการใช้ยา โดยสามารถรักษาให้หายขาดได้หากตรวจพบและเริ่มรับการรักษาในระยะเริ่มต้น<sup>3</sup> มีสารจากธรรมชาติหลายชนิดที่นำมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งรังไข่ เช่น paclitaxel จากเปลือกของต้น Pacific yew<sup>4</sup> และ etoposide จากรากของต้น mayapple<sup>5,6</sup>

ลูพาลบิจินินเป็นสารธรรมชาติที่สกัดได้จากเถาของเถาวัลย์เปรียง มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งมาแล้วหลายชนิด<sup>7,8</sup> แต่ยังไม่พบการศึกษาในมะเร็งรังไข่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของลูพาลบิจินินต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนายาต้านมะเร็งได้ในอนาคต

### 1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์และกลไกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงของลูพาลบิจินินที่สกัดจากเถาวัลย์เปรียง
2. หาค่าความเข้มข้นลูพาลบิจินินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของ โครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของ โครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

### 1.3 วิธีการดำเนินงานโดยย่อ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 และ SKOV3
2. ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของลูพาลบิจีนินและหาค่า  $IC_{50}$ 
  - 2.1. แบ่งเซลล์รังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 และ SKOV3 ลงใน plate แล้วบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}C$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ซ้ำมคิน
  - 2.2. เตรียมสารละลายลูพาลบิจีนินให้มีความเข้มข้น 1 5 25 50 100 และ 200  $\mu M$
  - 2.3. ให้สารละลายลูพาลบิจีนินความเข้มข้น 1 5 25 50 และ 100  $\mu M$  แก่เซลล์ PA-1 และความเข้มข้น 5 25 50 100 และ 200  $\mu M$  แก่เซลล์ SKOV3
  - 2.4. นำเซลล์ที่ให้สารแล้วไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}C$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
  - 2.5. ดูดสารออกให้หมดแล้วเติมสารละลาย MTT แล้วบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}C$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
  - 2.6. ดูดสาร MTT ออกแล้วเติม DMSO
  - 2.7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader
3. ทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์โดยถ่ายภาพจากกล้อง Inverted Microscope และทดสอบ Annexin V and Dead Cell
  - 3.1. แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 และ SKOV3 ลงใน plate แล้วบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}C$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ซ้ำมคิน
  - 3.2. เตรียมสารละลายลูพาลบิจีนินที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  ของแต่ละเซลล์
  - 3.3. ให้สารละลายลูพาลบิจีนินแก่เซลล์ PA-1 และ SKOV3
  - 3.4. ทำการทดสอบที่ 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการให้สาร โดยเก็บไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}C$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5%
  - 3.5. เมื่อครบแต่ละเวลาแล้วนำเซลล์ไปถ่ายภาพด้วยกล้อง Inverted Microscope

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- 3.6. trypsinized เซลล์ออกจาก plate แล้วเติม Annexin V and Dead Cell reagent บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- 3.7. นำไปวัดผลด้วยเครื่อง Guava® EasyCyte flow cytometry
4. ทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำโปรตีน Caspase ที่มีบทบาทต่อการเกิด apoptosis
  - 4.1. แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 และ SKOV3 ลงใน plate แล้วบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ซ้ำมคืน
  - 4.2. เตรียมสารละลายลูพาลบิจินินที่ความเข้มข้น IC<sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์
  - 4.3. ทำการทดสอบที่ 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการให้สาร เก็บเซลล์ไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5%
  - 4.4. เมื่อครบแต่ละเวลาแล้ว trypsinized เซลล์ออกจาก plate แล้วเติม caspase reagent บ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 30 นาที
  - 4.5. เมื่อครบเวลา เติม 7AAD บ่มต่อในที่มืด 10 นาที
  - 4.6. นำไปวัดผลด้วยเครื่อง Guava® EasyCyte flow cytometry
5. ทดสอบการแสดงออกของยีน Caspase หลังให้ลูพาลบิจินิน
  - 5.1. แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 และ SKOV3 ลงใน plate แล้วบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ซ้ำมคืน
  - 5.2. เตรียมสารละลายลูพาลบิจินินที่ความเข้มข้น IC<sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์
  - 5.3. ทำการทดสอบที่ 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการให้สาร เก็บเซลล์ไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5%
  - 5.4. เมื่อครบเวลา ทำให้เซลล์แตกและหลุดออกมาจาก plate
  - 5.5. สกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด Purelink® RNA mini purification kit
  - 5.6. เปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้ชุด Superscript III 1<sup>st</sup> strand synthesis system
  - 5.7. นำไป PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- 5.8. นำ cDNA มาเติม taq Polymerase และ primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH ที่เป็น house keeping gene เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการปรับค่าโปรตีนชนิดอื่นๆ เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน
- 5.9. นำไปวัดผลโดยเครื่อง real time PCR

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของลูพาลบิจีนินต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง SKOV3 และ PA-1
2. ทราบค่าความเข้มข้นลูพาลบิจีนินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) ของลูพาลบิจีนินที่เวลา 24 ชั่วโมง
3. ทราบรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 และ SKOV3 ที่เกิดขึ้นหลังได้รับลูพาลบิจีนิน

  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
 are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



## บทที่ 2

### การปริทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ธรรมชาติของเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งคือเซลล์ที่มีการแบ่งตัวผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมได้ มีความสามารถในการรุกรานเซลล์อื่นๆ สามารถแพร่กระจายไปกับระบบน้ำเหลืองเพื่อไปเจริญเติบโตเป็นก้อนมะเร็งที่จุดอื่นๆได้ ข้อสันนิษฐานการเกิดมะเร็งเท่าที่ทราบในปัจจุบันมี 2 รูปแบบคือ Stochastic model และ Hierarchy model ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบต่างกันว่า Stochastic model จะเชื่อว่าเซลล์ปกติทุกเซลล์ในร่างกายจะสามารถกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ แต่ต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมี<sup>9,10,11</sup> อาหาร<sup>12,13,14</sup> การอักเสบติดเชื้อ<sup>12,15</sup> การได้รับรังสี<sup>12,16,17</sup> สารที่มีการสัมผัสทางกายภาพ<sup>18,19</sup> เป็นต้น แต่ Hierarchy model เชื่อว่ามีแค่เพียงบางเซลล์เท่านั้นที่จะสามารถเกิดเป็นมะเร็ง หรือมีโอกาสที่จะเกิดมะเร็งได้ ส่วนเซลล์อื่นๆจะไม่กลายเป็นมะเร็ง<sup>20</sup> ซึ่งเซลล์ที่กลายเป็นมะเร็งนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ไปเรื่อยๆ ก่อให้เกิดการโตของก้อนมะเร็ง โดยจะเรียกเซลล์ที่แบ่งตัวเป็นก้อนมะเร็งนี้ว่า Cancer Stem Cell (CSC)<sup>21,22,23</sup> มีแบบจำลองที่เกี่ยวกับเซลล์แต่ละชนิดในก้อนมะเร็งที่ไม่เหมือนกันของ Hierarchy model อีก 3 แบบจำลอง คือ Clonal evolution model เชื่อว่าแต่ละเซลล์มีความรุนแรงและความสามารถในการแบ่งตัวไม่เท่ากัน<sup>24</sup> CSC สามารถเคลื่อนที่ไปตามระบบน้ำเหลืองเพื่อเกิดเป็นก้อนมะเร็งที่จุดใหม่ หรือที่เรียกว่า metastasis<sup>25,26,27</sup> โดยลักษณะการ metastasis จะคล้ายการเกิด Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) ของเซลล์ปกติ<sup>28</sup> ที่เป็นกระบวนการเปลี่ยนจากเซลล์ epithelial ที่เกาะพื้นผิว เป็นเซลล์ mesenchymal ที่เหมาะแก่การเคลื่อนที่<sup>29</sup> การเปลี่ยนแปลงนี้จะทำให้เกิดการย้ายที่ของเซลล์และเกิดการดื้อยาได้<sup>30,31</sup> นอกจาก EMT และ CSC จะมี marker ที่แตกต่างกันแล้ว<sup>32,33</sup> ยังมีความแตกต่างกันที่ EMT จะแบ่งตัวได้เร็วกว่าและไม่สามารถไปที่อวัยวะอื่นๆแล้วแบ่งตัวต่อได้ ส่วน CSC จะแบ่งตัวได้ช้า เมื่อไปที่อวัยวะอื่นๆแล้วยังสามารถแบ่งตัวก่อเนื้องอกหรือมะเร็งได้<sup>34</sup> สรุปคือหากไม่ใช่ CSC จะไม่สามารถไปเกิดก้อนเนื้องอกใหม่ที่จุดอื่นได้

การแบ่งตัวของเซลล์โดยปกติจะมีการควบคุมที่ check point ในบางขั้นตอน เพื่อตรวจสอบความพร้อมของเซลล์ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการต่อไป<sup>35</sup> หากเซลล์มีความผิดปกติ หรือสารต่างๆภายในเซลล์ไม่พร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์ check point จะส่งสัญญาณเพื่อให้เซลล์ที่ผิดปกตินั้นหยุดการแบ่งตัว<sup>36,37,38,39</sup> แต่เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวที่ผิดปกติ เกิดจากความผิดปกติของการทำงานของ check point

หรือการกระตุ้นการเกิดการผลิตสัญญาณต่างๆ เช่น P53 P21 หรือ Mad2 เป็นต้น<sup>40,41</sup>

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## 2.2 ประเภทของมะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่มีการแบ่งชนิดได้หลายแบบด้วยกัน หากแบ่งชนิดตาม Cancer Treatment Centers of America จะแยกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ<sup>42,43,44,45</sup> ดังนี้

1. common epithelial tumors หรือมะเร็งชนิดเนื้อเยื่อบุผิว คือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อช่องท้อง (coelomic epithelium) มีอุบัติการณ์สูงที่สุด แบ่งเป็นชนิดย่อยๆได้เป็น
  - 1.1. serous tumors พบอุบัติการณ์ประมาณ 80% ของมะเร็งชนิดเนื้อเยื่อบุผิว เซลล์มีลักษณะเป็น columnar เรียงซ้อนกันจนแน่น ก้อนมะเร็งมีลักษณะเป็นถุงน้ำ หรือลักษณะเนื้อแน่นปนกับถุงน้ำ มีการลามออกไปนอกผิวรังไข่<sup>46,47,48</sup>
  - 1.2. mucinous tumors เซลล์จะมีลักษณะเป็น Tall columnar เรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ พยาธิสภาพมักจะพบพร้อมกันในรังไข่ทั้ง 2 ข้าง ส่วนใหญ่จะเป็นถุงน้ำผสมกับส่วนที่แน่นทึบ ผิวนอกเรียบ แต่เมื่อตัดก้อนจะพบถุงซ้อนกันหลายถุง<sup>46,47,48</sup>
  - 1.3. endometrioid tumors เซลล์จะมีลักษณะคล้าย endometrium เป็นเซลล์ stratified columnar พยาธิสภาพมีลักษณะเป็นถุงน้ำเนื้อแน่น มีเลือดออกในถุงน้ำบางครั้ง บริเวณที่เป็นเนื้อแน่นจะคล้ายดอกกะหล่ำ<sup>46,47,48</sup>
  - 1.4. clear-cell tumors เซลล์จะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มี cytoplasm ใส (clear cell) มีขนาดใหญ่ และเซลล์ Hobnail cell ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่จนเกือบเต็มเซลล์ ยื่นเป็นหัวตะปูลู่อยู่ทางด้านช่องว่าง พยาธิสภาพมักเป็นก้อนมะเร็งที่ปูดขึ้นมาในผนังด้านในของถุงน้ำ<sup>46,47,48</sup>
  - 1.5. transitional cell (Brenner) tumors จะมีลักษณะคล้ายเซลล์มะเร็งในเยื่อกระเพาะปัสสาวะ แต่จะมีก้อนเนื้องอก Brenner ร่วมด้วย<sup>46,48</sup>
  - 1.6. mixed epithelial tumors เป็นชนิดที่มีลักษณะผสมผสานของมะเร็งชนิดเนื้อเยื่อบุผิวหลายๆแบบเข้าด้วยกัน
  - 1.7. undifferentiated and unclassified tumors เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถระบุหรือแยกชนิดได้

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2. germ cell tumors คือมะเร็งที่เกิดขึ้นจากเซลล์กลุ่มแรก (primordial germ cells) ของตัวอ่อน (embryo) ที่จะเติบโตมาเป็นอวัยวะเพศที่สร้างไข่หรือสเปิร์มในวัยเจริญพันธุ์ (gonads) จึงทำให้เกิดก้อนเนื้องอกเกิดขึ้นใน gonads หรือบริเวณช่องกลางลำตัว<sup>49,50</sup> แบ่งชนิดย่อยๆได้เป็น
  - 2.1. Teratoma จะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อจาก germ cell หรือเซลล์ต้นกำเนิด คือ ectoderm mesoderm และ endoderm และพบ neural elements ซึ่งชนิดนี้จะสามารถแบ่งความรุนแรงออกเป็น 3 ระดับตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเซลล์ปกติ และปริมาณ immature neuroepithelium<sup>46,47,48</sup>
  - 2.2. Dysgerminoma มะเร็งชนิดนี้จะมีเซลล์รูปร่างกลม รี หรือเหลี่ยม เรียงตัวกันเป็นกลุ่ม และจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีจุดสีแทรกอยู่ พยาธิสภาพเป็นก้อนเนื้อแน่น มีหย่อมเลือดออกหรือเนื้อตาย (necrosis) อยู่บ้าง<sup>46,48</sup>
  - 2.3. Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) มะเร็งชนิดนี้จะพบที่รังไข่ข้างเดียว เซลล์มี Schiller-Duval body คลุมด้วย flattened หรือ irregular endothelium ตรงกลางจะมีหลอดเลือดแดงฝอยอยู่ มี eosinophilic globules อยู่ในเซลล์<sup>46,47,48</sup>
  - 2.4. Embryonal carcinoma
  - 2.5. Polyembryoma
  - 2.6. Choriocarcinoma
  - 2.7. Mixed germ-cell tumors
  
3. sex-cord stromal tumors ที่เกิดมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หลอดเลือดฝอยมาเลี้ยงมาก เป็นเนื้อเยื่อพื้นผิวของรังไข่หรืออัณฑะ (specialized gonadal stroma) เช่น corpus luteum, Zona pellucida เป็นต้น สามารถแบ่งเป็นชนิดย่อยๆได้คือ
  - 3.1. Granulosa-stromal cell tumors เซลล์จะมีลักษณะเป็น Granulosa cell มี cytoplasm น้อย เมื่อย้อมสีโครมาตินจะเห็นเป็นลักษณะคล้ายเมล็ดกาแฟ พยาธิสภาพมีถุงน้ำภายในก้อน ผิวเรียบ มีส่วนที่เป็นเนื้อแข็งลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆหรือเป็นแผ่นกัน<sup>46,47,48</sup>

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- 3.2. Sertoli-stromal cell tumors
- 3.3. Gonadoblastoma ภายในก้อนมะเร็งจะประกอบด้วย germ cell และ sex-cord stromal elements ส่วนมากจะไม่มี การแพร่กระจาย พบผู้ป่วย 40% ที่เป็นในรังไข่ทั้ง 2 ข้าง<sup>49,511,52</sup>
- 3.4. Sex-cord tumor with annular tubules เกิดจาก sex cords กับ stroma ของ gonad ที่กำลังแบ่งตัวจะพบเซลล์ granulosa และ theca cell ของรังไข่<sup>49</sup>
- 3.5. Unclassified sex-cord tumors คือมะเร็งที่เกิดจาก sex cords ที่ไม่สามารถระบุประเภทได้
- 3.6. Steroid cell tumors

## 2.3 เซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง

### 2.3.1 Teratocarcinoma

หรือเซลล์เพาะเลี้ยง PA-1 คือมะเร็งรังไข่ชนิด germ cell มีความผิดปกติตั้งแต่การแบ่งตัว ในระยะตัวอ่อน (embryo) ซึ่งกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดนั้น (stem cell) ที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ (pluripotent cell) แบ่งตัวได้ไม่สมบูรณ์ โดยแบ่ง nucleus ออกเป็น 2 ชุด แต่ไม่ได้แยกออกจากกัน ไม่เกิดเป็น 2 เซลล์ และคงสภาพอยู่เช่นนั้นโดยไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติใดๆ ไปจนผู้ป่วยมีอายุประมาณหนึ่ง หลังจากนั้นเซลล์นี้จะเกิดการแบ่งตัวและส่งสัญญาณการแบ่งตัว ซึ่งเซลล์นี้แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการท้องมานร่วมด้วย<sup>53,54,55,56</sup>

### 2.3.2 Adenocarcinoma

หรือเซลล์เพาะเลี้ยง SKOV3 คือเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเนื้อเยื่อบุผิว เป็นมะเร็งที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อต่อมซึ่งในที่นี้คือรังไข่ แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการท้องมานร่วมด้วย<sup>54,55,57</sup>

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## 2.4 การตายของเซลล์

การตายของเซลล์ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งเกิดได้จาก 2 กลไกคือ apoptosis และ necrosis ซึ่งกลไกการตายจะมีความแตกต่างกัน คือ

### 2.4.1 การตายแบบ necrosis

การตายในรูปแบบนี้เป็นการตายแบบที่ไม่มีการส่งสัญญาณการตาย เมื่อเกิดขึ้นแล้วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ตามมา มีลักษณะที่ไม่ต่อเนื่อง ซึ่งพยาธิสภาพจะมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเซลล์ สาเหตุการตายรูปแบบนี้อาจมาจากการกระตุ้น RIP1 หรือเรียกว่า RIP1-dependent regulated necrosis หรืออาจผ่านทาง RIP3-dependent regulated necrosis ซึ่งจะมี necrostatins เป็นตัวที่คอยยับยั้งการเกิด necrosis จากกระบวนการนี้ หรือการถูกกระตุ้นผ่าน tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1), trimers recruit TNFR-associated death domain (TRADD), receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1), cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1), cIAP2, TNFR-associated factor 2 (TRAF2) และ TRAF5

เมื่อเกิดการจับกันของตัวรับเหล่านี้จะทำให้ RIP1 ถูก cIAPs เติม ubiquitine ซึ่งเป็นฉลากที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย จึงทำให้เกิด transforming growth factor b (TGFb)-activated kinase 1 (TAK1), TAK1-binding protein 2 (TAB2) และ TAB3 มีปริมาณมากขึ้น ในบางพยาธิสภาพและการทำการทดลอง เมื่อให้ Caspase-8 หรือ caspases ถูกยับยั้งโดยสารที่สนใจ จะทำให้กระตุ้นการตายแบบ necrosis หรืออาจจะถูกเหนี่ยวนำโดยการทำลาย DNA, สารที่เป็น Reactive Oxygen Species (ROS), ในบางครั้งถูกเหนี่ยวนำโดย FADD หรือ FAS-associated ที่เป็นโปรตีนการตาย<sup>58,59</sup> หรืออาจจะเกิดการตายในรูปแบบนี้ได้หากเซลล์มีแหล่งพลังงาน (ATP) ไม่พอและสามารถเปลี่ยนกลับไปตายแบบ apoptosis ได้อีกครั้งหากมีปริมาณ ATP เพียงพอ<sup>60</sup>

ลักษณะสัญญาณของเซลล์ที่เกิดการตายในรูปแบบนี้คือจะมีการบวมพองของเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย เกิดการแตกและปล่อย organell ที่อยู่ภายในเซลล์ออกมา ทำให้บริเวณใกล้เคียงเกิดการอักเสบแต่ไม่มีการส่งสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมากลืนกินเพื่อกำจัดเซลล์ที่ตาย จึงทำให้ขอบเขตการตายไม่ชัดเจนและไม่สามารถนำส่วนของเซลล์ที่ตายนี้กลับมาใช้ใหม่ได้<sup>61,62</sup> เนื่องจากการตายแบบ necrosis จะทำให้เซลล์บวมพอง เยื่อหุ้มเซลล์แตก เกิดเซลล์รั่ว จึงมีการตรวจวัดการตายแบบ necrosis โดยตายย้อมสีที่จะไม่สามารถแพร่เข้าเซลล์ได้หากเยื่อหุ้ม

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เซลล์ไม่เกิดการรั่ว, ย้อมสีนิวเคลียสเพื่อดูลักษณะนิวเคลียสที่จะไม่เกิดการหดตัว หรือสามารถใช้กล้อง Inverted Microscope ส่องดูสัญญาณของเซลล์ได้<sup>63</sup>

## 2.4.2 การตายแบบ apoptosis

การตายในรูปแบบนี้จะเกิดเป็นลำดับขั้น โดยเริ่มจากการส่งสัญญาณการตาย ที่ปกติจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวเคมี หรือบางกรณีอาจจะไม่ผ่านกระบวนการชีวเคมีเลยก็ได้ โดย Phosphatidylserine (PS) ที่อยู่ภายในเซลล์จะเป็นเครื่องหมายการเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในระยะเริ่มต้น สำหรับกระบวนการเกิด apoptosis นี้ยังสามารถแยกได้เป็น 2 แบบคือ

### 2.4.2.1 Extrinsic Apoptosis

หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า execute apoptosis หรือการตายแบบรวดเร็ว จะเกิดจากสภาวะภายนอกเซลล์หรือสารที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular) กระตุ้นตัวรับสัญญาณที่ฝังอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ตัวอย่างสัญญาณที่กระตุ้นการเกิด extrinsic apoptosis เช่น FAS/CD95 ligand (FASL/CD95L), tumor necrosis factor a (TNFa) และ TNF superfamily หรือ TNFSF10 ที่รู้จักกันในชื่อ TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) เป็นต้น ซึ่งตัวรับบางชนิดอาจต้องถูกกระตุ้นก่อนจึงจะทำงาน ที่เรียกรวมว่า dependence receptors เช่น netrin receptors เป็นต้น

สัญญาณเด่นของการตายชนิดนี้คือสัญญาณ FAS ผ่าน pre ligand assembly domain (PLAD) โปรตีนต่างๆ เช่น RIP1 จะมาที่ตัวรับสัญญาณการตายที่เรียกว่า death domain (DD) ซึ่งจะเรียกรวมตัวกันของ FAS RIP1 และ DD ว่า FAS-associated protein with a DD (FADD) แล้ว FADD จะส่งสัญญาณไปกระตุ้น pro-caspase-8 ให้ทำงานกลายเป็น caspase-8 ซึ่งเป็นสัญญาณ caspase ตัวแรกใน extrinsic apoptosis จากนั้นจะเกิดการกระตุ้นไปเรื่อยๆ จนสุดท้ายจะไปกระตุ้น caspase-3 แล้วเซลล์เกิดการ apoptosis ในที่สุด<sup>58,64</sup>

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



### 2.4.2.1 Intrinsic Apoptosis

การตายในรูปแบบนี้จะเกิดจากการกระตุ้นของความเครียดภายในเซลล์ที่มากเกินไป เช่น การเสียหายของ DNA, oxydative stress, ปริมาณแคลเซียมประจุกภายในเซลล์ที่มากเกินไป เป็นต้น ซึ่งจะมี mitochondria เป็นศูนย์กลางในการควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ ที่เยื่อหุ้ม mitochondria จะมีความสมดุลกันระหว่างสัญญาณที่เตรียมพร้อมสำหรับการตาย ยกตัวอย่างเช่น BCL-2 protein family เช่น BAK และ BAX ที่เป็นโปรตีนที่ทำให้เซลล์เกิดรู กับกระบวนการยับยั้งการตาย (pro apoptotic signaling และ anti-apoptotic mechanism)<sup>65,66</sup>

การเกิดกระบวนการตายแบบ intrinsic apoptosis จะเกิดจาก MOMP หรือ cytosolic CYTC ทำงานร่วมกับ APAF1 และ dATP กระตุ้น pro-caspase-9 ให้กลายเป็น caspase-9 ที่สามารถไปกระตุ้น caspase อื่นๆต่อไปได้ โดยสุดท้ายจะไปกระตุ้นที่โปรตีน caspase-3 จนเซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด<sup>58,67</sup>

การตายแบบ extrinsic หรือ intrinsic apoptosis นี้ขึ้นอยู่กับ การจับตัวรับสัญญาณการตายของสารต่อเซลล์ หากสารจับกับ FAS หรือ netrin-1 ที่เยื่อหุ้มเซลล์<sup>64</sup> จะทำให้เกิดการตายแบบ extrinsic แต่หากสารเข้าไปจับกับสัญญาณการตายที่เยื่อหุ้ม mitochondria หรือที่ DNA จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณการตายแบบ intrinsic ซึ่งสารตัวเดียวกันสามารถจับกับตัวรับแบบใดแบบหนึ่งหรือทั้ง 2 แบบก็เป็นได้ ซึ่งจะมีสัญญาณทุติยภูมิเป็น Cytochrom C (CytC) ที่หลังจาก mitochondria เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของโปรตีน caspase ต่างๆ หรือเซลล์เกิดสัญญาณการตายโดยตรงโดยไม่ผ่านโปรตีน caspase จากการที่เกิดความเครียดภายในเซลล์ เช่น ภายในเซลล์มีปริมาณ ROS มาก, การถูกยับยั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เป็นต้น ทำให้เกิดสัญญาณทุติยภูมิไปทำลาย cytoskeleton หรือส่งสัญญาณไปตัดสาย DNA ออกเป็นท่อนๆเลยก็สามารถพบได้

58

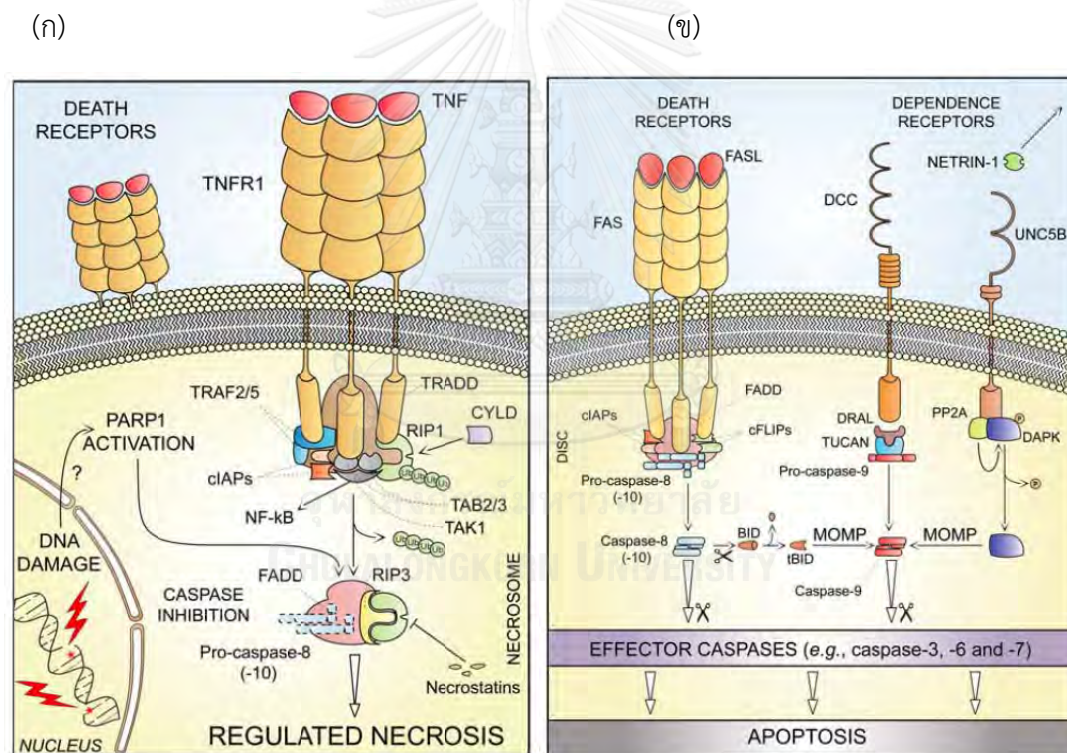
เมื่อเกิดการตายแบบ apoptosis เซลล์จะเกิดการหดตัว จนได้เป็นส่วนหนึ่งของเซลล์เล็กๆ (blebbing) มีลักษณะกลม สาย DNA หักเป็นท่อนๆ มีการหดของนิวเคลียสทำให้ความหนาแน่นเพิ่มขึ้น และจะมีการแสดงออกของโปรตีน caspase โดยโปรตีน caspase-3 จะแสดงออกแน่นอนหากเซลล์เกิดการ apoptosis จากการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน caspase<sup>67</sup>

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

การตายลักษณะนี้จะอาศัย mitochondria และ ATP หากเซลล์มี ATP ที่ไม่เพียงพออาจเกิดการตายแบบ necrosis แทนได้ แต่สามารถเปลี่ยนกลับมาตายในรูปแบบนี้ได้อีกครั้งหากมี ATP เพียงพอ การตายในรูปแบบนี้จะไม่ทำให้เซลล์ข้างเคียงเกิดการอักเสบเพราะจะมีการส่งสัญญาณให้เซลล์ phagocyte มากำจัด apoptotic body เหล่านี้<sup>68</sup>

การตายแบบ apoptosis จะทำให้เซลล์มีการหดตัวของนิวเคลียส และเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่างๆภายในเซลล์เพื่อให้พร้อมต่อการตาย จึงนิยมตรวจสอบการเกิด apoptosis ด้วยการตรวจ PS ที่ในเซลล์ปกติจะอยู่ภายในเซลล์ แต่หากมีสัญญาณให้เกิด apoptosis จะพลิกกลับออกไปอยู่ด้านนอกของเซลล์, การย้อมสีที่นิวเคลียสเพื่อดูลักษณะของนิวเคลียสภายในเซลล์ หรือใช้การส่องกล้อง Inverted Microscope (IM) เพื่อดูสัญญาณของเซลล์ก็สามารถทำได้<sup>63</sup>



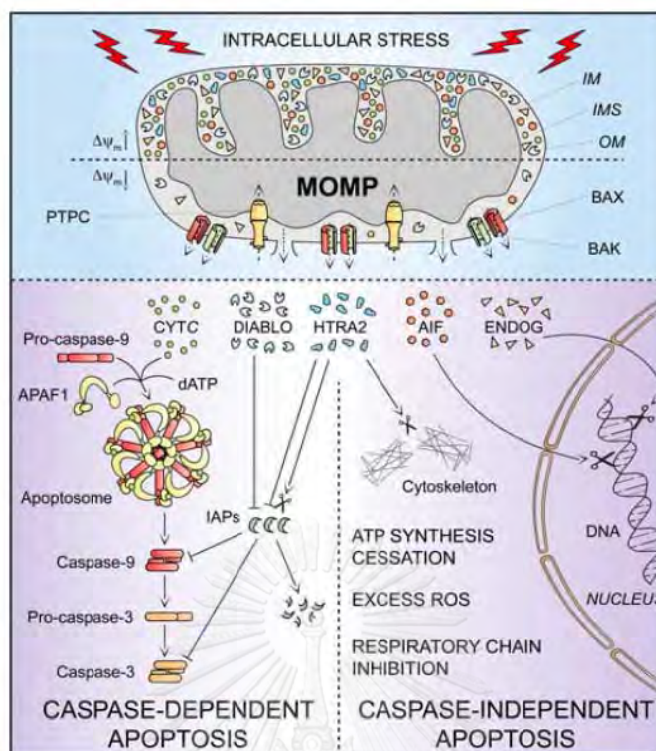
ภาพที่ 1 (ก) แสดงกระบวนการตายแบบ necrosis

(ข) แสดงกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยผ่านโปรตีน caspase

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.





ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการ apoptosis โดยแบ่งเป็นแบบที่ต้องอาศัยโปรตีน caspase และไม่อาศัยโปรตีน caspase

## 2.5 การออกฤทธิ์ของยาต้านมะเร็ง

ยาต้านมะเร็งหรือยาเคมีบำบัดสามารถแบ่งกลุ่มตามกลไกในการออกฤทธิ์ได้ 6 ประเภทดังนี้

### 1. Alkylating agents

ยาในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างส่วนที่เป็น active alkylating moiety หรือ alkyl group ที่จะไปจับ กับ sulfur, nitrogen, oxygen หรือ phosphorus ที่เป็นส่วนประกอบในสาย DNA และส่วนประกอบที่สำคัญอื่นๆ เกิดการจับคู่ผิดของโมเลกุลใน DNA คือ guanine จะจับคู่กับ cytosine แทนที่จะเป็น thymine เป็นผลทำให้รหัสบนยีนผิดปกติ ยาที่ใช้บ่อยในกลุ่มนี้คือ Cyclophosphamide, Ifosfamide และ Busulfan

### 2. Antimetabolites

ยาจะเข้าไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ DNA โดยยาจะเข้าไปขัดขวางการสร้าง folate, purine, pyrimidine ซึ่งจำเป็นในการสร้าง DNA และ RNA ยาชนิดนี้จะไปออกฤทธิ์

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เฉพาะเจาะจงต่อวงจรชีวิตของเซลล์ที่ระยะ S โดยไปยับยั้ง DNA polymerase ทำให้ไม่สามารถสร้าง DNA และ RNA ได้ ทำให้การเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ลดลง ยาส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ระยะ S และระยะอื่นๆ ยกเว้นระยะ G0 แบ่งยาในกลุ่มนี้เป็น 3 ประเภท ได้แก่

- 2.1. Folic acid analogues หรือ Antifolates ออกฤทธิ์ยับยั้งที่ระยะ S ขัดขวางการสร้าง purine และ pyrimidine โดยไปยับยั้งการทำงานของ dihydrofolate reductase (DHFR) ที่ใช้ในการเปลี่ยน folic acid ให้กลายเป็น tetrahydrofolic acid ที่มีความจำเป็นต่อการสร้าง purine และ pyrimidine ทำให้การสร้าง DNA และ RNA หยุดชะงัก การสร้างโปรตีนในระยะ G1 ลดลง เซลล์เข้าสู่ระยะ S ช้าลง ยาในกลุ่มนี้เช่น methotrexate เป็นต้น
- 2.2. Purine analogues ยาในกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ purine เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ได้สารพวก ribonucleotide ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์ในการสังเคราะห์ purine ทำให้การสร้าง purine หยุดชะงักลง ยาในกลุ่มนี้เช่น mercaptopurine เป็นต้น
- 2.3. Pyrimidine analogues สำหรับ fluorouracil (5-FU) มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ uracil ออกฤทธิ์โดยตรงต่อวงจรชีวิตของเซลล์ที่ระยะ S ตัวยาเองไม่มีฤทธิ์เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีฤทธิ์โดยเอนไซม์ pyrimidine phosphoribosyl transferase จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และ DNA ส่วนกลไกของยา cytosine arabinoside (Ara-C) ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ DNA polymerase เกิดการหยุดการสร้าง DNA จากการที่ยาเข้าไปในสายของ RNA ยาในกลุ่มนี้เช่น fluorouracil (5-FU), cytosine arabinoside (Ara-C), fludarabine เป็นต้น

### 3. Platinum

จะจับกับ DNA ได้เป็น platinum-DNA adduct โดยมากจะเป็น intrastrand crosslink ซึ่งจะรบกวนการสร้างสาย DNA มีผลทำให้เซลล์ตายโดยผ่านกระบวนการ Apoptosis ยาในกลุ่มนี้เช่น cisplatin, carboplatin เป็นต้น

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4. Topoisomerase inhibitors

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase ซึ่งมีบทบาทในการตัดต่อสาย DNA ในกระบวนการสังเคราะห์สาย DNA ส่งผลให้วัฏจักรเซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2 และ S เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านกระบวนการ apoptosis ยากลุ่มนี้เช่น doxorubicin, topotecan, etoposide เป็นต้น

#### 5. Antimicrotubule agents

ออกฤทธิ์ต่อ microtubule ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ mitotic spindle ที่มีหน้าที่สำคัญในการแบ่งตัวของเซลล์ การเคลื่อนไหวของเซลล์และการขนส่งสารภายในเซลล์ ทำให้สมดุลการทำงานของ microtubule ผิดปกติไป เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านกระบวนการ apoptosis แบ่งยากลุ่มนี้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

5.1. Taxanes ยาไปจับกับ b-subunit ของ tubulin ใน microtubule เพิ่มการ polymerization ของ tubulin ให้กลายเป็น stable tubulin มากขึ้น และยับยั้งกระบวนการ depolymerization ยากลุ่มนี้เช่น paclitaxel, docetaxel เป็นต้น

5.2. Vinca alkaloids ยาไปจับกับ b-subunit ของ tubulin ใน microtubule ยับยั้งกระบวนการ polymerization ของ tubulin และเร่งกระบวนการ depolymerization ยากลุ่มนี้เช่น vinblastine, vincristine เป็นต้น<sup>69</sup>

#### 6. Antibiotics

ออกฤทธิ์โดยจะเข้าไปจับ polynucleotides โดยแทรกตัวอยู่ในระหว่างคู่เบสของ DNA และป้องกันการสังเคราะห์ polynucleotide ตัวใหม่ นอกจากนี้ยังทำให้สาย DNA มีการเรียงลำดับเบสในสายผิดปกติทำให้ขาดเป็นท่อนๆ เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตาย ยาไปทำให้เกิด free radical ที่เป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ยากลุ่มนี้เช่น actinomycin D, bleomycin, mitomycin D, doxorubicin<sup>70,71,72,73,74</sup>

### 2.6 การศึกษาฤทธิ์ของลูพาลบิจินินที่ผ่านมา

ลูพาลบิจินินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากเถาของเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* Benth) ที่เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae พบได้ทั่วไปในทวีปเอเชียและทางตอนเหนือของทวีป  
 บทความคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

ออสเตรเลีย<sup>75,76</sup> ซึ่งมีการใช้เป็นยาพื้นบ้านกันอย่างแพร่หลายในด้านของการช่วยขับเสมหะ แก้ไอขับปัสสาวะ และรักษาโรคบิด รวมไปถึงรักษาอาการปวดของกล้ามเนื้อ<sup>77,78</sup> การศึกษาที่ผ่านมานั้นพบองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถแยกได้จากเถาวัลย์เปรียงเช่นสารจำพวก คูมาริน ฟีนิลคูมาริน ฟลาโวน ไอโซฟลาโวน และไอโซฟลาโวน โกลโคไซด์<sup>78,79</sup> และยังมีกรายงานฤทธิ์อื่น ๆ ดังนี้ ด้านการอักเสบลดความดันโลหิต ด้านเชื้อเอสไอวีและควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระจากลูพาลบิจินินที่แยกได้จากรากของเถาวัลย์เปรียง รวมไปถึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเพนิซิลลิน (ATCC25923) และสายพันธุ์ที่ต่อต่อยาเมทิซิลลิน (MRSA SK1)<sup>78</sup>

ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของลูพาลบิจินินในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เช่น เซลล์มะเร็งปอด<sup>8</sup> เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>7</sup> เซลล์มะเร็งเต้านม<sup>7</sup> เป็นต้น การศึกษาลูพาลบิจินินในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงพบว่าลูพาลบิจินินมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงชนิด SW-620 ที่สูง แต่มีความจำเพาะกับเซลล์ MCF-7 และ MDA-MB-231 มากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงชนิด SW-620 อย่างมีนัยสำคัญอาจเกิดจากความจำเพาะของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ต่อ breast cancer resistance protein (BCRP)<sup>7</sup> ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในทางเภสัชจลนศาสตร์<sup>80</sup> ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์ยังมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ aromatase และลดการสังเคราะห์ของเอสโตรเจนรวมถึงการหมุนเวียนระดับเอสโตรเจน<sup>81,82,83</sup> ซึ่งกลไกนี้ส่งผลต่อการเจริญของมะเร็งเต้านม และเมื่อนำลูพาลบิจินินไปทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง L-292 เป็นไฟโบรบลาสเซลล์ของหนูเมาส์เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติพบว่าสารมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์นี้น้อยแสดงให้เห็นว่า ลูพาลบิจินินจำเพาะกับการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมมากกว่าเซลล์ปกติ ยังมีการรายงานว่าลูพาลบิจินินกระตุ้นให้เกิดการหยุดชะงักของวัฏจักรของเซลล์โดยไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน p21 ในเซลล์ MDA-MB-231 ส่วนในเซลล์ MCF-7 ระดับของโปรตีน p21 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ลูพาลบิจินินยังไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7, MDA-MB-231 และ MDA-MB-468 และยังมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดชะงักของวัฏจักรของเซลล์ผ่านการควบคุม p21 และทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่าน mitochondrial pathway โดยไปยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 และไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของ Bax และการปลดปล่อยของ cytochrome C ในเซลล์มะเร็งรังไข่ของมนุษย์อีกด้วย<sup>7</sup>

ในการศึกษาฤทธิ์ของลูพาลบิจินินในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัว รวมถึงไปเพิ่มการเกิด anoikis ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกได้ การศึกษายังพบอีกว่าลูพาลบิจินินยังมีผลในการ down-regulation Bcl-2, AKT และ ERK<sup>8</sup>

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของ โครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของ โครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## บทที่ 3

### วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. incubator
2. biosafety cabinet class II
3. auto pipette
4. disposable pipette ขนาด 5, 10 และ 25 ml
5. Corning® cell culture flask 75 cm<sup>2</sup>
6. micropipette ขนาด 2-20, 10-100, 20-200 และ 100-1000 µl
7. microtip
8. microcentrifuge tube
9. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
10. sonicator
11. vortex mixer
12. เครื่อง centrifuge
13. 96-well cell culture plate
14. 24-well cell culture plate
15. microplate reader
16. Guava® EasyCyte flow cytometer
17. spin column
18. เครื่อง PCR
19. เครื่อง real-time PCR
20. Inverted Microscope (IM)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ลูพาลบิจีนิน (lupalbigenin)
2. อาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ McCoy's 5a Medium Modified
4. Fetal Bovine Serum (FBS)
5. Phosphate buffered saline (PBS)
6. trypsin/EDTA 0.025%
7. ethanol 70%
8. MTT
9. DMSO
10. Annexin V reagent
11. FLICA reagent
12. 7-AAD reagent
13. lysis buffer
14. 2-mercaptoethanol
15. wash buffer I
16. wash buffer II
17. Oligo dT 50  $\mu$ M
18. dNTP 10 mM
19. RT buffer
20.  $MgCl_2$  25 mM
21. DTT 0.1 M
22. RNase OUT
23. Reverse transcriptase
24. taq polymerase
25. forward and reverse GAPDH primer
26. forward and reverse caspase 3 primer
27. forward and reverse caspase 8 primer

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



28. forward and reverse caspase 9 primer

### 3.3 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง SKOV-3

เซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA1

### 3.4 วิธีการที่ใช้ในงานวิจัยและขั้นตอนการทำ

#### 3.4.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1 เป็นมะเร็งรังไข่ชนิด teratocarcinoma ภาวะมีน้ำในช่องท้อง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ที่เติม FBS 10% ส่วนเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง SKOV3 ที่เป็นมะเร็งรังไข่ชนิด adenocarcinoma แบบภาวะมีน้ำในช่องท้อง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด McCoy's 5a Medium Modified ที่เติม FBS 10% โดยทั้ง 2 สายพันธุ์เซลล์แยกจากเซลล์ของมนุษย์ ได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC) เลี้ยงในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5%

#### 3.4.2 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assays

แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดลงใน 96-well plate ให้มีจำนวนหลุมละ 1,000 เซลล์ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นๆ 100  $\mu$ l ทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วเติมสารละลายลูพาลบิจินินที่ละลายด้วย DMSO และเจือจางกับอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1 5 25 50 และ 100  $\mu$ M โดยใช้ DMSO 0.3% ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นหลุมควบคุม หลุมละ 100  $\mu$ l ในเซลล์เพาะเลี้ยง PA-1 และความเข้มข้น 5 25 50 100 และ 200  $\mu$ M โดยใช้ DMSO 0.5% ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นหลุมควบคุม หลุมละ 100  $\mu$ l ในเซลล์เพาะเลี้ยง SKOV3 จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้ MTT ที่เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไว้ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลาย MTT ที่เติม DMSO เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

### 3.4.3 การถ่ายภาพเซลล์

แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดลงใน 24-well plate หลุมละ  $8 \times 10^4$  เซลล์ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นๆ หลุมละ 1 ml ทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมสารละลายลูพาลบิจีนิน ที่ความเข้มข้น  $\text{IC}_{50}$  ของแต่ละเซลล์หลุมละ 1 ml นำเซลล์ไปบ่มต่อที่ตู้บ่มในอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละเวลานำเซลล์ ออกมาถ่ายภาพด้วยกล้อง Inverted Microscope (IM)

### 3.4.4 การทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V and Dead Cell จาก Muse™

แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดลงใน 24-well plate หลุมละ  $8 \times 10^4$  เซลล์ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นๆ หลุมละ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและใส่สารละลายลูพาลบิจีนิน ที่ความเข้มข้น  $\text{IC}_{50}$  ของแต่ละเซลล์ปริมาณหลุมละ 1 ml นำเซลล์ไปบ่มต่อที่ตู้บ่มในอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากครบแต่ละเวลา แล้ว นำเซลล์ออกมาและทำการ trypsinization จากนั้นนำไปตกตะกอนให้ได้เซลล์แล้วจึงเติม อาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอย่างละ 100 ml และสารละลาย Annexin V and Dead Cell kit 100  $\mu\text{l}$  บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดรูปแบบการตายของเซลล์ด้วยเครื่อง Guava® EasyCyte flow cytometer วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5

### 3.4.5 การทดสอบ Caspase Enzyme โดยใช้ชุดทดสอบ Multicaspase จาก Muse™

แบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดลงใน 24-well plate หลุมละ  $8 \times 10^4$  เซลล์ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นๆ หลุมละ 1 ml ทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นใช้สารละลายลูพาลบิจีนินที่ความเข้มข้น  $\text{IC}_{50}$  ของแต่ละเซลล์ใส่ แทนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิม หลุมละ 1 ml นำเซลล์ไปบ่มต่อที่ตู้บ่มในอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากครบแต่ละเวลาแล้วนำ เซลล์ออกมาทำการ trypsinization จากนั้นนำไปตกตะกอนให้ได้เซลล์แล้วจึงเติม caspase reagent บ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 7AAD บ่มต่อในที่มืดอีก 10 นาที แล้วนำไป

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



วัดค่าด้วยเครื่อง Guava® EasyCyte flow cytometer วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5

### 3.4.6 การทดสอบการแสดงออกของยีน caspase โดย real-time PCR

แบ่งสายพันธุ์เซลล์ลงใน 24-well plate หลุมละ  $8 \times 10^4$  เซลล์ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ชนิดนั้นๆ หลุมละ 1 ml ทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้น ใช้สารละลายลูพาลบิจินินที่ความเข้มข้น  $\text{IC}_{50}$  ของแต่ละเซลล์ใส่แทนอาหารเลี้ยงเซลล์ เดิม หลุมละ 1 ml นำเซลล์ไปบ่มต่อที่ตู้บ่มในอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละเวลาแล้วจึงนำเซลล์มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด Purelink® RNA mini purification kit จากบริษัท Thermo fisher scientific โดยทำให้เซลล์ แตกและหลุดออกมาโดยใช้ lysis buffer จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้ spin column ที่สามารถกัก RNA ไว้ด้านบนได้ นำไปปั่นล้างด้วย wash buffer เมื่อได้เป็น RNA แล้วจึงใช้ชุด Superscript III 1<sup>st</sup> strand synthesis system จากบริษัท Thermo fisher scientific ในการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยการเติม Oligo dT 50  $\mu\text{M}$ , dNTP 10 mM, RT buffer,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, DTT 0.1 M, RNase OUT และ Reverse transcriptase ก่อนที่จะนำไป PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA หลังจากนั้นนำ cDNA มาเติม taq Polymerase และ primer ที่จำเพาะต่อ *GAPDH* ที่เป็น house keeping gene เพื่อใช้เป็นตัวมาตรฐาน และมีโปรตีนชนิดอื่นๆ คือ *Caspase-3*, *Caspase-8* และ *Caspase-9* เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ใช้ primer ดังนี้

*Caspase-3*:

(forward) 5'-GTGGAATTGATGCGTGATGTTTC-3';

(reverse) 5'-GTCCAGTTCTGTACCACGGC-3';

*Caspase-8*:

(forward) 5'-GGATGGCCACTGTGAATAACTG-3';

(reverse) 5'-TCGAGGACATCGCTCTCTCA-3';

*Caspase-9*:

(forward) 5'-CACCCAGACCAGTGGACATT-3';

(reverse) 5'-TGCTCAGGATGTAAGCCAAATCT-3';

*GAPDH*:

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

(forward) 5'-ACTTTGGTATCGTGGAAGGACT-3',

(reverse) 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการวิจัย

##### 4.1.1 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assays

ผล MTT assays ของลูพาลบิจีนินที่เวลา 24 ชั่วโมง

ต่อเซลล์ PA-1 มีค่า  $IC_{50}$  เป็น  $29.37 \pm 1.61 \mu M$

ส่วนเซลล์ SKOV3 มีค่า  $IC_{50}$  เป็น  $52.12 \pm 5.49 \mu M$

	PA-1	SKOV3
Lupalbigenin	$29.37 \pm 1.61$	$52.12 \pm 5.49$

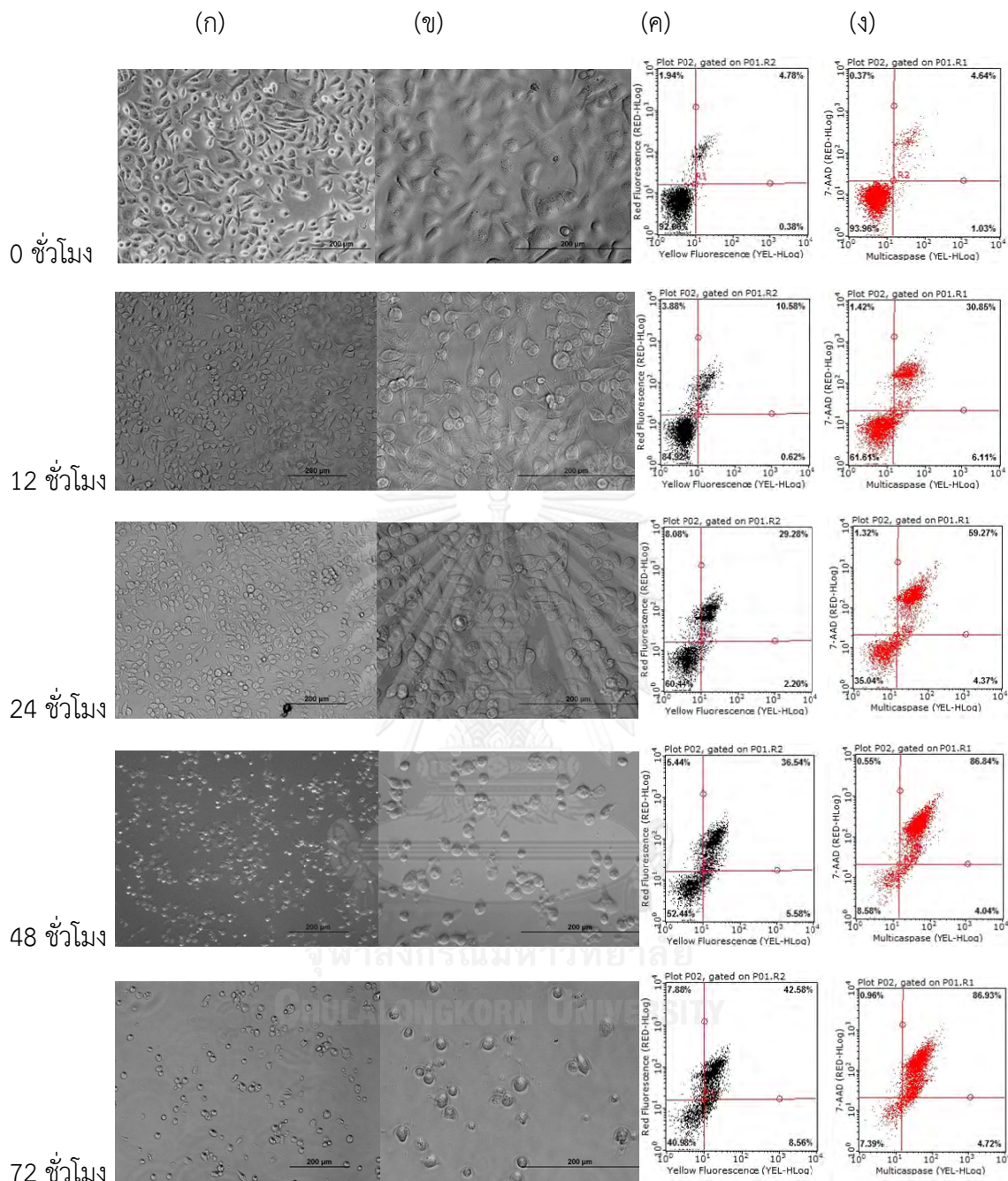
ตารางที่ 1 แสดงผลความเข้มข้น ของลูพาลบิจีนินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4.1.2 ผลการทดลองในเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง SKOV3



ภาพที่ 3 (ก) แสดงภาพถ่ายเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจีนินที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยกำลังขยาย 10 และ (ข) 20 เท่า (ค) กราฟแสดงผลการเกิด apoptosis ในเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจีนินที่ระยะเวลาต่างๆ โดยย้อมเซลล์ด้วยสี Annexin V/7-AAD โดยส่วนล่างซ้ายแสดง live cells ล่างขวาแสดง early apoptotic cells บนขวาแสดง apoptotic cells และบนซ้ายแสดง necrotic cells (ง) กราฟแสดงผลเอนไซม์ caspase หลายชนิดในเซลล์ SKOV3 หลังได้รับลูพาลบิจีนินที่ระยะเวลาต่างๆ โดยย้อมเซลล์ด้วยสี FLICA/7-AAD โดยส่วนล่างซ้ายแสดง live cells ล่างขวาแสดง apoptotic live cells บนขวาแสดง apoptotic dead cells และบนซ้ายแสดง necrotic cells

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4.1.2.1 ภาพถ่ายเซลล์หลังการให้ลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆ

จากภาพที่ 3(ก) และ (ข) พบว่า ที่เวลา 0 ชั่วโมง เซลล์มี spindle leg ที่เห็นได้ชัด การยึดเกาะ plate แน่น รวมถึงรูปร่างลักษณะของเซลล์เป็นเหมือนปกติและมีสภาพที่สมบูรณ์ เมื่อให้ลูพาลบิจินินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์บางส่วนเริ่มมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เห็นส่วนของนิวเคลียสชัดขึ้น แต่ยังคงสังเกตเห็น spindle leg ในบางเซลล์ เมื่อระยะเวลาผ่านไปนานยิ่งขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์มีรูปร่างลักษณะเปลี่ยนแปลงไป สังเกตเห็นส่วนของนิวเคลียสชัดจน spindle leg ลดลงจนแทบไม่พบในที่สุด อีกทั้งปริมาณของเซลล์ที่ติดอยู่กับ plate ก็มีจำนวนลดน้อยลง จนถึงเวลา 72 ชั่วโมงเซลล์ที่เกาะ plate มีจำนวนลดน้อยลงอย่างมาก และลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปคล้ายกับเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis

#### 4.1.2.2 ผลการทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์โดยใช้ชุดทดสอบ

##### Annexin V and Dead Cell

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 3(ค)) ภาพแสดงจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดสี หลังการนำไปย้อมสี Annexin V และ 7-AAD เมื่อให้ลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแกน X แสดงความเข้ม (intensity) ของสี Annexin V และแกน Y แสดงความเข้ม (intensity) ของสี 7-AAD

ในเซลล์ SKOV3 แสดงให้เห็นว่า หลังให้ลูพาลบิจินินที่เวลา 0 ชั่วโมง เซลล์ SKOV3 ส่วนใหญ่จะยังไม่ติดสีใดๆ มีเซลล์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ย้อมติดทั้งสี Annexin V และ 7-AAD เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดทั้งสี Annexin V และ 7-AAD มีจำนวนเพิ่มขึ้น และมีเซลล์จำนวนเล็กน้อยที่ติดเฉพาะสี Annexin V ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่ติดทั้งสี Annexin V และ 7-AAD มีจำนวนเพิ่มขึ้น และเพิ่มมากยิ่งขึ้นที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่วนจำนวนเซลล์ที่ติดเฉพาะสีใดสีหนึ่งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

#### 4.1.2.3 ผลการทดสอบ caspase enzyme ด้วยชุดทดสอบ Multicaspase

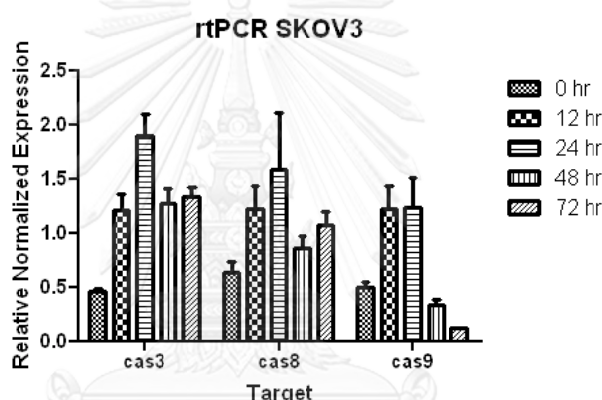
จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4(ง)) แสดงจำนวนเซลล์ที่ติดสี FLICA และสี 7-AAD

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เมื่อให้ลูพาลบิจีนิที่ระยะเวลาต่างๆ โดยแกน X แสดงความเข้ม (intensity) ของสี FLICA และแกน Y แสดง (intensity) ของสี 7-AAD

ในเซลล์ SKOV3 จากภาพแสดงให้เห็นว่า หลังให้ลูพาลบิจีนิที่เวลา 0 ชั่วโมง มีเซลล์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ย้อมติดทั้งสี 7-AAD และ FLICA เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดทั้งสี 7-AAD และ FLICA เพิ่มมากขึ้น และมีเซลล์บางส่วนที่ติดเฉพาะสี FLICA เพียงสีเดียว ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่ติดทั้งสี 7-AAD และ FLICA มีจำนวนเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามเวลาที่ผ่านไปส่วนจำนวนเซลล์ที่ติดเฉพาะสี FLICA มีจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากนัก



ภาพที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณการแสดงออกของยีน *caspase* ของเซลล์ SKOV3 ที่เวลาต่างๆ

#### 4.1.2.4 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *caspase* โดย real-time PCR

สำหรับการแสดงออกของยีน *caspase-3* ที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังจากให้ลูพาลบิจีนิแก่เซลล์ SKOV3 เริ่มมีการแสดง และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป จนถึง ชั่วโมงที่ 24 มีการแสดงออกของยีน *caspase-3* สูงที่สุด หลังจากนั้นที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ปริมาณยีนลดลง สำหรับการแสดงออกของยีน *caspase-8* ที่เวลา 0 ชั่วโมงมีการแสดงออกของในปริมาณที่มากกว่ายีน *caspase-3* ที่ 0 ชั่วโมง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีปริมาณสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน *caspase-8* ก็ลดน้อยลงในชั่วโมงที่ 48 และ 72 สำหรับการแสดงออกของยีน *caspase-9* เริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังได้รับสาร และมีปริมาณสูงสุดที่ 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน *caspase-9* ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ลดน้อยลง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

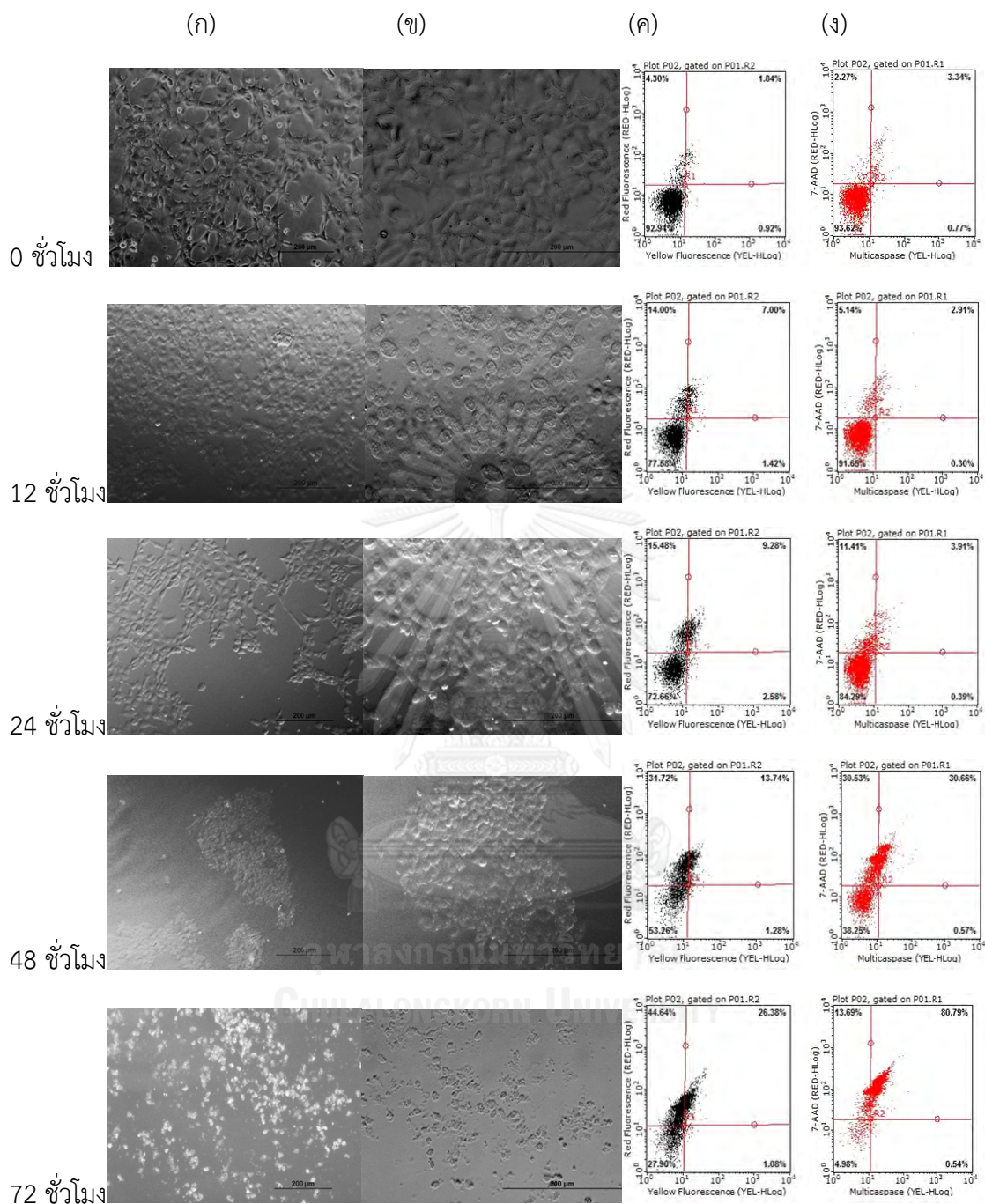
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



### 4.1.3 ผลการทดลองในเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยง PA-1



ภาพที่ 5 (ก) แสดงภาพถ่ายเซลล์ PA-1 หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยกำลังขยาย 10 และ (ข) 20 เท่า (ค) กราฟแสดงผลการเกิด apoptosis ในเซลล์ PA-1 หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆ โดยย้อมเซลล์ด้วยสี Annexin V/7-AAD โดยส่วนล่างซ้ายแสดง live cells ล่างขวาแสดง early apoptotic cells บนขวาแสดง apoptotic cells และบนซ้ายแสดง necrotic cells (ง) กราฟแสดงผลเอนไซม์ caspase หลายชนิดในเซลล์ PA-1 หลังได้รับลูพาลบิจินินที่ระยะเวลาต่างๆ โดยย้อมเซลล์ด้วยสี FLICA/7-AAD โดยส่วนล่างซ้ายแสดง live cells ล่างขวาแสดง apoptotic live cells บนขวาแสดง apoptotic dead cells และบนซ้ายแสดง necrotic cells

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4.1.3.1 ภาพถ่ายเซลล์หลังการให้ลูพาลบิจีนินที่ระยะเวลาต่างๆ

จากภาพที่ 5(ก) และ (ข) หลังจากให้ลูพาลบิจีนินกับเซลล์ PA-1 ที่เวลา 0 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีรูปร่างลักษณะเป็นตามปกติทั่วไปและมีสภาพที่สมบูรณ์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนรูปร่างไปจากเดิม เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม ขอบเขตเริ่มไม่ชัดเจน และพบปริมาณเซลล์ที่ติดอยู่กับ plate มีจำนวนลดน้อยลงเรื่อยๆ จนเมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ PA-1 มีรูปร่างไม่แน่นอนแตกต่างจากที่เวลา 0 ชั่วโมง ขอบเขตและรูปร่างลักษณะของเซลล์ไม่ชัดเจน ลักษณะของเซลล์คล้ายเซลล์ที่มีการตายแบบ necrosis และมีปริมาณเซลล์ในจำนวนที่น้อยลง

#### 4.1.3.2 ผลการทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V and Dead Cell

จากภาพที่ 5(ค) แสดงจำนวนเซลล์ที่ติดสี หลังการนำไปย้อมสี Annexin V และ 7-AAD เมื่อให้ลูพาลบิจีนินเป็นระยะเวลาต่างๆ โดยแกน X แสดงความเข้ม (intensity) ของสี Annexin V และแกน Y แสดงความเข้ม (intensity) ของสี 7-AAD

ที่เวลา 0 ชั่วโมงมีเซลล์ที่ติดเฉพาะสี 7-AAD อยู่จำนวนเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง พบว่าเริ่มมีเซลล์ที่ย้อมติดทั้ง 2 สีคือทั้ง Annexin V และ 7-AAD รวมถึงมีเซลล์ที่ติดเพียงสี 7-AAD เพิ่มขึ้น ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดเฉพาะสี 7-AAD มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และเซลล์ที่ติดทั้ง 2 สีเพิ่มขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย ที่เวลา 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ติดเฉพาะสี 7-AAD มีจำนวนเพิ่มมากยิ่งขึ้น และที่เวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ติดเฉพาะสี 7-AAD ยังคงมีจำนวนเพิ่มมากยิ่งขึ้น รวมทั้งจำนวนเซลล์ที่ติดสี Annexin V และ 7-AAD ก็มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นด้วย

#### 4.1.3.3 ผลการทดสอบ caspase enzyme ด้วยชุดทดสอบ Multicaspase

จากภาพที่ 5(ง) แสดงจำนวนเซลล์ที่ติดสี FLICA และสี 7-AAD เมื่อให้ลูพาลบิจีนินเป็นระยะเวลาต่างๆกัน โดยแกน X แสดงความเข้ม (intensity) ของสี FLICA ส่วนแกน Y แสดงความเข้ม (intensity) ของสี 7-AAD ในเซลล์

PA-1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังให้ลูพาลบิจีนินที่เวลา 0 ชั่วโมง มีเซลล์ที่ติด  
 บทความย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
 เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



เฉพาะสี 7-AAD และเซลล์ที่ย้อมติดทั้ง 2 สีคือ 7-AAD และสี FLICA เป็นจำนวนเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 24 ชั่วโมง เริ่มมีจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี 7-AAD เพิ่มมากขึ้น และที่เวลา 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดเฉพาะสี 7-AAD กับเซลล์ที่ย้อมติดทั้งสี 7-AAD และ FLICA เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก และมีจำนวนไม่แตกต่างกัน เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ย้อมติดทั้งสี FLICA และสี 7-AAD มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นมากที่สุด จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดเฉพาะสี 7-AAD มีปริมาณลดน้อยลง และแทบจะไม่มีเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีใดๆเหลืออยู่

## 4.2 อภิปรายผล

### 4.2.1. อภิปรายผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assays

จากค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ที่ได้พบว่าลูพาลบิจีนินมีความเป็นพิษต่อทั้งเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงชนิด PA-1 และ SKOV3 โดยที่เซลล์ PA-1 มีค่า  $IC_{50}$  ที่น้อยกว่าของเซลล์ SKOV3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ PA-1 อาจมีความไวต่อลูพาลบิจีนินมากกว่าเซลล์ SKOV3

### 4.2.2. อภิปรายผลจากภาพถ่ายเซลล์หลังการให้ลูพาลบิจีนินที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการสังเกตรูปร่างของเซลล์ รวมไปถึงที่ระยะเวลาตั้งแต่ 48 ชั่วโมง เริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์เป็นลักษณะที่ไม่ชัดเจน อีกทั้งยังมีจำนวนเซลล์ลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์ PA-1 อาจเกิดการตายในรูปแบบ necrosis เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ลูพาลบิจีนินได้สัมผัสกับเซลล์<sup>61,62</sup>

รูปร่างของเซลล์ SKOV3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์อาจเกิดการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จากการสังเกตว่า spindle leg ของเซลล์ค่อยๆลดลง และเซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไป มีขนาดเล็กลง ยังคงเห็นขอบเขตของเซลล์ได้ชัดเจน จึงสันนิษฐานได้ว่าวงกลมขนาดเล็กนั้นคือส่วน blebbing ของเซลล์ที่เกิดการตายในรูปแบบนี้<sup>61,62</sup>

### 4.2.3. อภิปรายผลการทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์

สี Annexin V จะย้อมติด phosphatidylserine (PS) ที่ปกติจะอยู่ด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ แต่เมื่อมีสัญญาณการตาย PS จะเคลื่อนที่กลับออกมาด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>84,85</sup> ทำให้ **บทความและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

Annexin V ไปจับได้ ส่วนสี 7-AAD จะสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้เฉพาะเมื่อเซลล์เกิดการสูญเสียคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>86</sup> ดังนั้น เซลล์ที่ย้อมติดเฉพาะสี Annexin V คือเซลล์ที่เริ่มมีสัญญาณการตายแต่เซลล์ยังไม่เสียสภาพ หรือเรียกว่าอยู่ในสภาวะ early apoptosis เซลล์ที่ย้อมติดเฉพาะสี 7-AAD คือ เซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ แสดงถึงเซลล์ที่เกิดการตายแบบ necrosis ส่วนเซลล์ที่ย้อมติดทั้งสี Annexin V และ 7-AAD แสดงว่าเซลล์มีการแสดงออกของสัญญาณการตายและเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพไปแล้ว กล่าวคือ เซลล์อยู่ในระยะ late apoptosis ที่เซลล์เริ่มมีการตาย<sup>87,88,89</sup>

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ PA-1 เกิดการตายแบบ necrosis เมื่อได้รับลูพาลบิจินินตั้งแต่ที่เวลา 12 ถึง 48 ชั่วโมง และเกิดการตายแบบ apoptosis ในช่วงเวลาที่ 72 อย่างไม่กี่ดี จำนวนเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ยังคงมีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis แสดงให้เห็นว่าลูพาลบิจินินส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของ PA-1 เสียสภาพได้มากกว่าการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ผลการทดลองลักษณะนี้อาจเกิดได้จากการกลไกการออกฤทธิ์ของลูพาลบิจินินเอง หรือการที่เซลล์ PA-1 ไวต่อสารนี้มาก

สำหรับเซลล์ SKOV3 เริ่มเกิดการตายแบบ apoptosis ตั้งแต่ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตายระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และมีจำนวนสูงที่สุดที่ 72 ชั่วโมง โดยแทบจะไม่พบการตายแบบ necrosis ลูพาลบิจินินทำให้เซลล์ SKOV3 เกิดสัญญาณการตายแบบ apoptosis และเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพในเวลาเดียวกัน สันนิษฐานได้ว่าลูพาลบิจินินมีกลไกที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเสียสภาพอีกทั้งทำให้เกิดสัญญาณ apoptosis ไปพร้อมๆกัน

จากการศึกษาข้อมูลของลูพาลบิจินินในงานวิจัยที่มีการรายงานไว้ พบว่าสารมีฤทธิ์ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้<sup>7,8</sup> นอกจากนี้เมื่อศึกษาข้อมูลของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์มะเร็งตับ HepG2 พบว่าสารในกลุ่ม flavonoids ทำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ และพบการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยการกระตุ้นการหลั่ง Cytochrome C (CytC) จาก mitochondria<sup>90,91,92</sup> จึงสันนิษฐานได้ว่าลูพาลบิจินินที่จัดเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์อาจทำให้เกิด ROS เหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพพร้อมกับการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการ

เกิด ROS เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของลูพาลบิจินินที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ในเซลล์ PA-1 เกิดการตายแบบ necrosis ได้มากกว่าการตายแบบ apoptosis ต่างจากเซลล์ SKOV3 ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์ PA-1 มีความไวต่อลูพาลบิจีนิน มากกว่า ส่วนการที่ลูพาลบิจีนินสามารถกระตุ้นทั้ง 2 กลไกได้พร้อมกันในเซลล์เดียวกัน อาจเกิดจาก เมื่อเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มมีการเสียสภาพจะทำให้ลูพาลบิจีนินเข้าไปจับกับ death domain หรือตัวรับสัญญาณการตายที่เยื่อหุ้ม mitochondria ได้ง่ายยิ่งขึ้นและเมื่อลูพาลบิจีนินเข้าไปจับกับตัวรับเหล่านี้ จะทำให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณการตายต่อไปเรื่อยๆจนเซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด

#### 4.2.4. อภิปรายผลการทดสอบ caspase enzyme

การทดสอบ multicaspase<sup>93</sup> ตัวอย่างจะถูกยับยั้งด้วย VAD peptide ซึ่งเป็น caspase inhibitor ที่กักตึงสีเรืองแสงหรือที่เรียกว่า Fluorescent-Labeled Inhibitor of Caspases (FLICA) ที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์แล้วยับยั้ง activated caspase ได้ ซึ่ง activated caspase ในชุดนี้คือ caspase-1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่เป็นสัญญาณที่ทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ส่วนสี 7-AAD จะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้เฉพาะเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว หรือเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเสื่อมสภาพ ดังนั้นจะสามารถใช้ตรวจสอบเซลล์ที่ตายได้ โดยเซลล์ที่ยับยั้งเฉพาะสี 7-AAD คือเซลล์ที่มีการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์หรือเกิดการตาย แต่ไม่มีการกระตุ้น caspase enzyme เทียบได้กับการตายแบบ necrosis เซลล์ที่ติดเฉพาะสี FLICA คือเซลล์ที่พบ activated caspase แต่ยังไม่พบการตาย หรือเทียบได้กับเซลล์ในสภาวะ early apoptosis ส่วนเซลล์ที่ยับยั้งติดทั้งสี 7-AAD และสี FLICA จะแสดงถึงเซลล์ที่พบ activated caspase พร้อมทั้งพบการตายของเซลล์ เช่นเดียวกับเซลล์ที่สภาวะ late apoptosis<sup>94,95</sup>

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าลูพาลบิจีนินทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง PA-1 เกิดการตายโดย ไม่มีการแสดงออกของ caspase หรือการตายแบบ necrosis เริ่มตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 12 ไปจนถึง ชั่วโมงที่ 48 จากนั้นในชั่วโมงที่ 72 กลับพบเซลล์ที่แสดงลักษณะการตายแบบ apoptosis แทน

ส่วนในเซลล์ SKOV3 พบว่าลูพาลบิจีนินทำให้เกิดการแสดงออกของ caspase พร้อมทั้ง ทำให้เซลล์ตายได้ตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 12 และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ผลการทดสอบ caspase enzyme นี้ มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบรูปแบบการตายโดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V and Dead Cell ทั้งในเซลล์ PA-1 และเซลล์ SKOV3 กล่าวคือ ในเซลล์ PA-1 มีการแสดงออกของ caspase enzyme น้อย แล้วจึงเริ่มมีการแสดงออกที่มากขึ้นใน

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งผลการทดสอบรูปแบบการตายได้ผลเป็นการตายในแบบ necrosis แล้วจึงเริ่มมีเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis มากขึ้นในช่วงหลัง ส่วนในเซลล์ SKOV3 พบการแสดงออกของ caspase enzyme มากตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆสอดคล้องกับที่เซลล์พบการตายแบบ apoptosis ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ในชุดทดสอบประกอบด้วยทดสอบ caspase enzyme หลายชนิด ดังนั้นจึงจะใช้พิจารณาประกอบกันกับผลการทดสอบอื่น caspase ในการทดลอง real-time PCR ถัดไป

#### 4.2.5. อภิปรายผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *caspase*

หลังจากเซลล์ SKOV3 ได้รับลูพาลบิจีนินพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนทั้ง *caspase-3*, *caspase-8* และ *caspase-9* ค่อนข้างคล้ายคลึงกัน เพียงแต่ในยีน *caspase-9* หลังจากชั่วโมงที่ 24 แล้วมีปริมาณลดลงจนต่ำกว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง ในขณะที่อีก 2 ยีนหลังจากเวลา 24 ชั่วโมงก็ยังคงมีปริมาณสูงกว่ายีนที่เวลา 0 ชั่วโมง

จากผลการทดลองสันนิษฐานว่าอาจเกิดจาก ระยะเวลาการออกฤทธิ์ของลูพาลบิจีนินที่ออกฤทธิ์ได้เต็มที่ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลูพาลบิจีนินอาจไม่ส่งผลกระทบต่อให้เกิดการแสดงออกของยีน *caspase-3*, *caspase-8* และ *caspase-9* ยีนเหล่านี้จึงมีปริมาณลดลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

จากการนำลูพาลบิจีนินมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่เพาะเลี้ยงชนิด SKOV3 (adenocarcinoma) และ PA-1 (teratocarcinoma)

ผลการศึกษาในเซลล์ SKOV3 พบว่าค่าความเข้มข้นของลูพาลบิจีนินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ  $52.12 \pm 5.49$  ไมโครโมลาร์และในเซลล์ PA-1 มีค่าเท่ากับ  $29.37 \pm 1.61$  ไมโครโมลาร์ ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษของสารต่อเซลล์

เมื่อศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์ SKOV3 พบว่าลูพาลบิจีนินมีผลทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis โดยสังเกตจากรูปร่างลักษณะเซลล์หลังจากได้รับสาร ผลการทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์ด้วยสีย้อม Annexin V ร่วมกับผลการทดสอบหาเอนไซม์ caspase หลายชนิดด้วยชุดทดสอบ multicaspase พบว่าเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 6(ก) พร้อมทั้งพบการทำงานของเอนไซม์ caspase ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ดังภาพที่ 6(ค) ส่วนการแสดงผลของยีน caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 ก็มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 แล้วจึงลดลง อย่างไรก็ตามยังคงตรวจพบเอนไซม์ caspase เพิ่มขึ้นจากการทดสอบเอนไซม์ multicaspase คาดว่าอาจมีผลมาจากการถอดรหัสยีนเพื่อสร้างเอนไซม์ยังคงเกิดขึ้นแม้จะมีการแสดงผลของยีนที่ลดลงแล้ว เป็นผลให้เกิดการตายแบบ apoptosis อย่างต่อเนื่อง

สรุปได้ว่า ลูพาลบิจีนินอาจมีระยะเวลาออกฤทธิ์ได้เต็มที่ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลูพาลบิจีนินอาจไม่ส่งผลกระทบต่อให้เกิดการแสดงผลของยีน caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 จึงทำให้การแสดงผลของยีนเหล่านี้จึงมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด

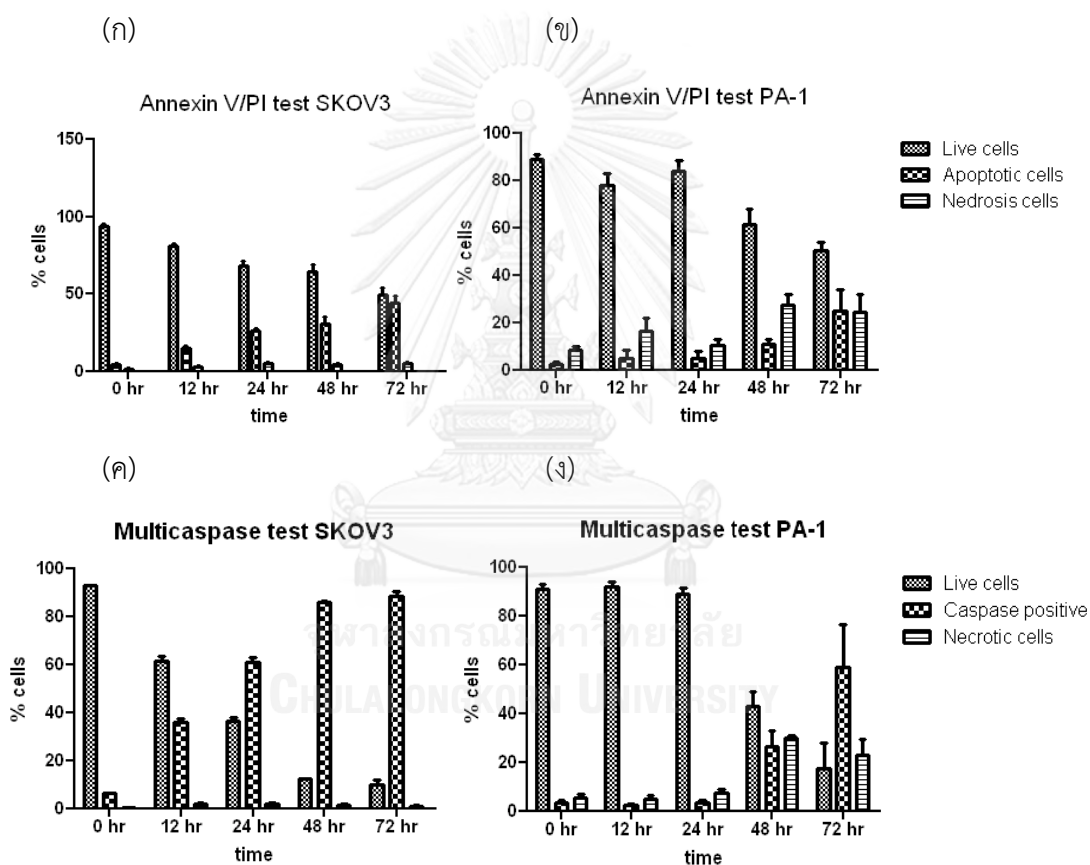
อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการแสดงผลของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ apoptosis เพิ่มเติมโดยละเอียด อีกทั้งศึกษาการเกิด ROS เมื่อให้ลูพาลบิจีนินแก่เซลล์ เพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

สำหรับเซลล์ PA-1 หลังจากได้รับลูพาลบิจีนินพบว่าสารกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการตายในรูปแบบ necrosis ที่สามารถสังเกตได้จากทั้งรูปร่างของเซลล์ที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับสารเป็นระยะเวลานาน และเมื่อนำมาทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์โดยใช้สีย้อม Annexin V หลังจากได้รับลูพาลบิจีนิน ดังภาพที่ 6(ข) พบการตายแบบ necrosis ในช่วงแรก จากนั้นพบการตายแบบ apoptosis ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบเอนไซม์

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

caspase หลายชนิดที่ไม่พบในช่วงต้น แต่เริ่มพบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase ในชั่วโมงที่ 48 ดังภาพที่ 6(ง)

สรุปได้ว่าเซลล์ PA-1 อาจมีความไวต่อความเป็นพิษของลูพาลบิจีนินจึงทำให้เกิดการตายแบบ necrosis ของเซลล์บางส่วนในช่วงแรก ส่วนเซลล์ที่ยังรอดชีวิตเกิดการตายแบบ apoptosis ในภายหลัง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเซลล์ที่เหลือรอดถูกกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ทั้งนี้ลูพาลบิจีนินอาจไม่เหมาะสำหรับการใช้ในเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด teratocarcinoma เนื่องจากทำให้เกิดการตายแบบ necrosis เป็นหลัก



ภาพที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณเซลล์แต่ละชนิดตามเวลาที่ให้ลูพาลบิจีนิน(ก) แผนภูมิแท่งแสดงรูปแบบการตายของเซลล์ PA-1 (ข) แสดงรูปแบบการตายของเซลล์ SKOV3(ค) แสดงปริมาณ caspase enzyme ของเซลล์ PA-1 (ง) แสดงปริมาณ caspase enzyme ของเซลล์ SKOV3

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



## รายการอ้างอิง

1. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์การเกิดโรคมะเร็ง. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ (พ.ศ. 2556 – 2560). 2556:9-12
2. ชัยเลิศ พงษ์นริศร. Ovarian Tumor [cited 2016 Feb 2]. Available from: [http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com\\_content&view=article&id=416:ovarian-tumor&catid=42&Itemid=479](http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=416:ovarian-tumor&catid=42&Itemid=479).
3. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์การเกิดโรคมะเร็ง. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ (พ.ศ. 2556 – 2560). 2556:45
4. Nobili, Stefania, *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*. 2009; Vol. 59: 365-378.
5. Bemis, Debra L., *et al.*  $\beta$ -Carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree *pao pereira* suppresses prostate cancer cells. *Journal of the society for integrative oncology*. 2009; Vol. 7: 59.
6. Zheljzkov, Valtcho D., *et al.* Lignan and nutrient concentrations in American Mayapple (*Podophyllum peltatum* L.) in the Eastern United States. *HortScience*. 2009; Vol. 44(2): 349-353.
7. Tedasen, Aman, *et al.* 5, 7, 4'-Trihydroxy-6, 8-diprenylisoflavone and lupalbigenin, active components of *Derris scandens*, induce cell death on breast cancer cell lines. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2016; 81:235-241.
8. Ausawasamrit A., Itthiwarapornkul N., *et al.* Lupalbigenin from *Derris scandens* sensitizes detachment-induced cell death in human lung cancer cells. *Anticancer research*. 2015; 35.5:2827-2834.
9. Biesalski HK, Bueno de Mesquita B, Chesson A, Chytil F, Grimble R, Hermus RJ, Köhrle J, Lotan R, Norpoth K, Pastorino U, Thurnham D. European consensus statement on lung cancer: risk factors and prevention. *Lung cancer panel*. *CA cancer J clin*. 1998; vol. 48(3): 167–76.

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

10. Kuper H, Adami HO, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *Journal of internal medicine*. 2002; Vol. 251(6): 455–66.
11. Schütze, Madlen, *et al.* Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *Bmj*. 2011; Vol. 342: 1584.
12. Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB (September 2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* 2008; Vol. 25(9): 2097–116.
13. Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ. American cancer society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA cancer J clin.* 2006; Vol. 56(5): 254–81
14. Park S, Bae J, Nam BH, Yoo KY (2008). Aetiology of cancer in Asia. *Asian Pac. J. Cancer prev.* 2008; Vol. 9(3): 371–80.
15. Samaras V, Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Peppas G, Falagas ME. Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. *J infect dev ctries.* 2010; Vol. 4(5): 267–81.
16. Little JB. Chapter 14: Ionizing radiation. In Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC Jr, Gansler TS, Holland JF, Frei E III. *Cancer medicine*. Hamilton, Ont: B.C. Decker; 2000.
17. Cleaver JE, Mitchell DL. Ultraviolet radiation carcinogenesis. In Bast RC, Kufe DW, Pollock RE. *Holland-Frei cancer medicine*. Hamilton, Ontario: B.C. Decker; 2000.
18. Maltoni CFM, Holland JF. Chapter 16: physical carcinogens. In Bast RC, Kufe DW, Pollock RE. *Holland-Frei cancer medicine*. Hamilton, Ontario: B.C. Decker; 2000.
19. Gaeta, John F. Chapter 17: trauma and inflammation. In Bast RC, Kufe DW, Pollock RE. *Holland-Frei cancer medicine*. Hamilton, Ontario: B.C. Decker; 2000.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



20. Dick, J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008; Vol. 112: 4793–4807.
21. Murphy, George F., *et al.* Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Molecular aspects of medicine*. 2014; Vol. 39: 33-49.
22. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*. 2001; Vol. 414: 105–111.
23. Wang, B., Liu, J., Ma, L.N., Xiao, H.L., Wang, Y.Z., Li, Y., *et al.*, Chimeric 5/35 adenovirus-mediated Dickkopf-1 overexpression suppressed tumorigenicity of CD44(+) gastric cancer cells via attenuating Wnt signaling. *J. Gastroenterol.* 2013; Vol. 48: 798–808.
24. Nowell, P.C., The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; Vol. 194: 23–28.
25. Baccelli, Irène, *et al.* Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature biotechnology*. 2013; Vol. 31(6): 539-544.
26. Hodgkinson, Cassandra L., *et al.* Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nature medicine*. 2014; Vol. 20(8): 897-903.
27. Zoni, Eugenio, *et al.* miR-25 modulates invasiveness and dissemination of human prostate cancer cells via regulation of  $\alpha$ v-and  $\alpha$ 6-integrin expression. *Cancer research*. 2015; Vol. 75(11): 2326-2336.
28. Larue, Lionel, and Alfonso Bellacosa. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005; Vol. 24(50): 7443-7454.
29. Mu, Y., Gudey, S.K., Landstrom, M. Non-smad signaling pathways. *Cell tissue res*. 2012; Vol. 347: 11–20.
30. Shih, Jin-Yuan, and Pan-Chyr Yang. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2011; Vol. 32(9): 1299-1304.

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

31. Clement, Virginie, *et al.* HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Current biology*. 2007; Vol. 17(2): 165-172.
32. Han Ding-pei, Zhu Qian-lin, Cui Jiang-tao, Wang Pu-xiongzhi, Qu S, Cao Qi-feng, *et al.* Polo-like kinase 1 is overexpressed in colorectal cancer and participates in the migration and invasion of colorectal cancer cells. *Medical science monitor*. 2012; 18: 237–246.
33. Munoz J, Stange DE, Schepers AG, *et al.* The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent ‘+4’ cell markers. *EMBO J*. 2012; Vol. 31(14): 3079– 3091
34. Beerling, Evelyne, *et al.* Plasticity between epithelial and mesenchymal states unlinks EMT from metastasis-enhancing stem cell capacity. *Cell reports*. 2016; Vol. 14(10): 2281-2288.
35. Kastan, M.B. and Batek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004; Vol. 432(7015): 316-323.
36. Lim, S. and Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. 2013; Vol. 140(15): 3079-3093.
37. Morris, L., Allen, K.E., La Thangue N.B. Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nature cell biology*. 2000; Vol. 2(4): 232-9.
38. Ohtani, K., DeGregori, J., Nevins, J.R. Regulation of cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceeding of national academy of sciences of the United States of America*. 1995; Vol. 92(26): 12146-12150.
39. Kastan, M.B. and Bart, J. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast cancer research*. 2013; Vol. 15(1): R5.
40. Albert, *et al.* *Molecular biology of the cell*. Garland science. 2008.
41. Weinberg, R.A. *The biology of cancer*. New York: Garland science. 2008.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

42. Cancer treatment centers of America. Ovarian cancer types [cited 2017 April 8]. Available from: <http://www.cancercenter.com/ovarian-cancer/types/>.
43. National ovarian cancer coalition. Types and stages of ovarian cancer [cited 2017 April 8]. Available from: <http://ovarian.org/about-ovarian-cancer/what-is-ovarian-cancer/types-a-stages>.
44. Reynolds K. Benign and malignant ovarian masses. In: Luesley DM, Baker PN, editors. Obstetrics and gynecology. An evidence-based text for MRCOG. 2<sup>nd</sup> ed. London: Arnold. 2004: 735-48.
45. Scully RE, Sobin LN. Histological typing of ovarian tumors. In: World health organization international classification of tumors. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer verlag. 1999: 28-36.
46. Berek JS. Berek & Novak's gynecology: Lippincott Williams & Wilkins. 2012: 1250-303, 350-427, 458-478.
47. วิไลลักษณ์ ส. มะเร็งรังไข่: ปียอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์ จำกัด. 2548: 1-79.
48. Robert J. Kurman LHE, Brigitte M. Ronnett. Blaustein's pathology of the female genital tract. 6<sup>th</sup> ed: Springer. 2011: 399-425, 701-69, 848-91, 1090-107.
49. Ablin A, Isaacs H. Germ cell tumors. In: Pizzo A, Poppack, DG: Principles and practice of pediatric oncology. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott. 1993: 867-87.
50. พงษ์จันทร์ หัตถ์รัตน์. มะเร็งของอวัยวะในเด็ก, มะเร็งของรังไข่ในเด็ก ใน: พงษ์จันทร์ หัตถ์รัตน์ , อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์, ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา, บรรณาธิการ. ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ. 2538: 546-60.
51. Lanzkowsky P. Germ cell tumors. In: Manual of pediatric hematology and oncology. 2<sup>nd</sup> ed. London: Churchill Livingstone. 1995: 529-47.
52. Robboy SJ, Miller T, Donahue PK, *et al*. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis. Hum Pathol. 1982; Vol. 13: 700-16.
53. Zeuthen, Jesper. Human teratocarcinoma cell lines. International journal of andrology. 1981; Vol. 4(4): 61-77.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

54. American type culture collection. Gynecological cancer and normal cell lines [cited 2017 April 8]. Available from:  
<https://www.atcc.org/~media/PDFs/Cancer%20and%20Normal%20cell%20lines%20tables/Gynecological%20cancer%20and%20normal%20cell%20lines.ashx>.
55. Anne P. Wilson, Chris M. Garner. Ovarian cancer. In: John R.W. masters, bernhard plason, eds. Human cell culture. cancer cell lines part 2. New York: Kluwer academic publishers. 2002; Vol. 2: 1-53.
56. American type culture collection. PA-1 [PA1] (ATCC CRL-1572<sup>TM</sup>). 2017 [cited 2017 April 8]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/CRL-1572.ashx>.
57. American type culture collection. SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] (ATCC HTB-77<sup>TM</sup>). 2017 [cited 2017 April 8]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/HTB-77.ashx>.
58. Galluzzi, Lorenzo, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death. Cell death & differentiation. 2012; Vol. 19(1): 107-120.
59. Brodie, Bernard B., *et al.* Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds. Proceedings of the national academy of sciences. 1971; Vol. 68(1): 160-164.
60. Lemasters, John J., *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 1998; Vol. 1366(1): 177-196.
61. Schweichel, JU., and HJ. Merker. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. Teratology. 1973; Vol. 7(3): 253-266.
62. Galluzzi, Lorenzo, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell death & differentiation. 2009; Vol. 16(8): 1093-1107.
63. Krysko, Dmitri V., *et al.* Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Methods. 2008; Vol. 44(3): 205-221.

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

64. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death differ.* 2012; Vol. 19(1): 42–50.
65. Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; Vol. 67(10): 1589–97.
66. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011; Vol. 147(4): 742–58.
67. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell.* 2009; Vol. 138(5): 838–54.
68. Elmore, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology.* 2007; Vol. 35(4): 495-516.
69. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res.* 1963; Vol. 23(8): 1390-427.
70. Doerge, Robert F. Wilson and Gisvold's textbook of organic. Medicinal and pharmaceutical chemistry. 1982; Vol. 615(3).
71. Foye, William O. Foye's principles of medicinal chemistry. Eds. Thomas L. Lemke, David A. Williams. Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
72. Fischer, David S, Knobf, M Tish, Durivage, Henry J, Beaulieu, Nancy J. The cancer chemotherapy handbook. Mosby. 2003.
73. Tripathi, K. D. Essentials of medical pharmacology. JP medical Ltd, 2013.
74. Brunton, Laurence L., John S. Lazo, and Keith L. Parker. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 2006.
75. P. Muanwongyathi, P. Supatwanich. Pharmacognostic study of *Derris scandens* Benth. *J. pharm.* 1981; Vol. 8: 57–64.
76. K.R. Kirtikar, B.D. Basu. Indian medicinal plants. International book distributors. Dehradun, India. 1987: 825.

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

77. W. Tiangburanatham. Dictionary of Thai medicinal plants. Prachumtong printing, Bangkok. 1996: 349–350.
78. W. Mahabusarakam, S. Deachathai, S. Phongpaichit, C. Jansakul, W.C. Taylor, Abenzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens* Benth, Phytochemistry. 2004; Vol. 65: 1185–1191.
79. T. Sreelatha, A. Hymavathi, V.R.S. Rao, P. Devanand, P.U. Rani, J.M. Rao, K.S. Babu. A new benzil derivative from *Derris scandens*: structure-insecticidal activity study. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010; Vol. 20: 549–553.
80. S. Zhang, Y. Yang, M.E. Morris. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-Mediated transport. Molecular pharmacology. 2004; Vol. 65: 1208–1216.
81. W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang. Flavonoids: promising anticancer agents. Med. Res. Rev. 2003; Vol. 23: 519–534.
82. J.C. Le Bail, T. Laroche, F. Marre-Fournier, G. Habrioux. Aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. Cancer Lett. 1998; Vol. 133: 101–106.
83. Y.C. Kao, C. Zhou, M. Sherman, C.A. Laughton, S. Chen. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. Environment health perspect. 1998; Vol. 106: 85–92.
84. Kerr JFR, *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; Vol. 26: 239-257.
85. Wyllie AH, *et al.* Cell death: the significance of apoptosis. Int rev cytol. 1980; Vol. 68: 251-306.
86. JF, *et al.* Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. J biol chem. 1989; Vol. 264: 7944-7949.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

87. Andree HAM, *et al.* Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J biol chem.* 1990; Vol. 265: 4923-4928.
88. van Heerde WL, *et al.* The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thrombosis and haemostasis.* 1995; Vol. 73: 172-179.
89. Vermes I, *et al.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J immunol meth.* 1995; Vol. 184: 39-51.
90. Li, Huimin, *et al.* Apoptosis induction by the total flavonoids from *arachniodes exilis* in HepG2 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction involving MAPK activation. *Evidence-based complementary and alternative medicine.* 2014.
91. M. Xu, N. Lu, Z. Sun, *et al.* Activation of the unfolded protein response contributed to the selective cytotoxicity of oroxylin a in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Toxicology letters.* 2012; Vol. 212(2): 113–125.
92. Y.-F. Chang, Y.-C. Hsu, H.-F. Hung, *et al.* Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2- methoxyestradiol in human hepatoma cells. *Nutrition and cancer.* 2009; vol. 61: 735–745.
93. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat rev mol cell biol.* 2004; Vol. 5: 897-907.
94. Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000; Vol. 259: 308-313.
95. Grabarek J, Darzynkiewicz Z. In situ activation of caspases and serine proteases during apoptosis detected by affinity labeling their enzyme active centers with fluorochrome-tagged inhibitors. *Exp hematol.* 2002; Vol. 30: 982- 989.

**บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**