

ผลของ *Lactobacillus rhamnosus* GG ร่วมกับสารเคอควินต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและกระตุ้น
การตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A COMBINATION OF *Lactobacillus rhamnosus* GG AND CURCUMIN INHIBITS VIABILITY
AND INDUCES APOPTOSIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELLS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ร่วมกับสารเคอ คิวมินต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและกระตุ้นการตายแบบอะ พอพโตซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิ โนมา
โดย	นายชัชพันธ์ อุดมพัฒนกร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)

ชัชพันธุ์ อุดมพัฒน์นกร : ผลของ *Lactobacillus rhamnosus* GG ร่วมกับสารเคอควินต่อการยับยั้งการมีชีวิตและกระตุ้นการตายแบบอะพอโตซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมา. (A COMBINATION OF *Lactobacillus rhamnosus* GG AND CURCUMIN INHIBITS VIABILITY AND INDUCES APOPTOSIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELLS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปาหนัน รุ่งวงศ์จักรกุล

มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมา (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) จัดเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดของมะเร็งศีรษะและลำคอ เคอควินเป็นสารออกฤทธิ์หลักซึ่งพบได้ในขมิ้นชันและถูกใช้เป็นสมุนไพรสำหรับการรักษาโรคต่างๆหลายชนิด รวมทั้งได้รับการพิสูจน์ในห่องปฏิบัติการณ์แล้วว่ามีความสัมพันธ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายประเภท ในขณะที่โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ได้รับการพิสูจน์ในห่องปฏิบัติการณ์ถึงคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายชนิดเช่นกัน และมีรายงานถึงการนำ LGG ไปใช้ร่วมกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารธรรมชาตินั้นอีกด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาผลของการใช้เคอควินร่วมกับน้ำเลี้ยงส่วนใสของแบคทีเรีย LGG (LGG cell-free supernatant, LGG CFS) ในการยับยั้งการมีชีวิตและกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-9 cells) เกิดการตายแบบอะพอโตซิส ผลการศึกษาพบว่า เคอควินและ LGG CFS มีความสัมพันธ์ในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 cells โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ การใช้เคอควินและ LGG CFS ที่ความเข้มข้นสูง (Curcumin 40 $\mu\text{g/ml}$ และ 25% (volume/volume) LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml หรือความเข้มข้นเริ่มต้น (undiluted condition)) ในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวหรือสารผสมร่วมกัน ส่งผลยับยั้งการมีชีวิตของทั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 cells และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก (human gingival fibroblast, HGF cells) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม ($p < 0.0001$ สำหรับการใส่สารเดี่ยวในเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และการใส่สารเดี่ยวและสารผสมในเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF และ $p = 0.02$ สำหรับการใส่สารผสมในเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9) ในขณะที่การใช้เคอควินและ LGG CFS ในรูปแบบของสารผสมร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (Curcumin 5 $\mu\text{g/ml}$ และ 25% (v/v) LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น) สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการใช้สารเดี่ยวของเคอควินและ LGG CFS ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และสภาวะควบคุม ($p < 0.0001$, $p = 0.002$ และ $p = 0.02$ ตามลำดับ) และไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.14$) ผลการวิเคราะห์ Flow analysis พบว่าสภาวะการใช้เคอควินและ LGG CFS ร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็ง SCC-9 เกิดการตายแบบอะพอโตซิสได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเดี่ยวและสภาวะควบคุม ($p < 0.0001$ ในทุกสภาวะ) นอกจากนั้นสภาวะการใช้เคอควินและ LGG CFS ร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็ง SCC-9 มีระดับการแสดงออกของ Bax/Bcl-2 ratio ที่สูงขึ้น ซึ่งมีผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอโตซิสต่อไป อย่างไรก็ตามสภาวะเคอควินและ LGG CFS ร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ที่สูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p = 0.12$) แต่ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL/Bak และโปรตีน Mcl-1/Bak เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.53$ และ $p = 0.34$ ตามลำดับ) การวิเคราะห์ LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบสารประเภทโปรตีนทั้งหมด 30 ชนิด ได้แก่ metabolic enzyme and protein จำนวน 26 ชนิด และ surface layer protein จำนวน 4 ชนิด การใช้สารเคอควินและ LGG CFS ร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำ น่าจะมีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 แต่ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เหงือก HGF ผลการศึกษาในครั้งนี้ก็นำไปสู่การพัฒนาวิธีป้องกันหรือรักษามะเร็งช่องปากชนิด OSCC รูปแบบใหม่ได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทาง ลายมือชื่อนิสิต

การแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6370020837 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Oral squamous cell carcinoma, *Lactobacillus rhamnosus* GG, Curcumin, Apoptosis

Chatchaphan Udompatanakorn : A COMBINATION OF *Lactobacillus rhamnosus* GG AND CURCUMIN INHIBITS VIABILITY AND INDUCES APOPTOSIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELLS. Advisor: Assoc. Prof. Dr. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common head and neck cancer types globally. Curcumin, a principal constituent of turmeric *Curcuma longa*, has been used as a traditional Thai medicine and exhibits many pharmaceutical properties, including an inhibitory impact on oral cancer. Recently, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) has been proven for anti-cancer effects and shown to enhance the pharmacological impact of several biological products when used in a combination regimen. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of curcumin combined with LGG cell-free supernatant (LGG CSF) to inhibit viability and induce apoptosis of SCC-9 OSCC cells. Curcumin and LGG CSF had an inhibitory effect on SCC-9 viability in a dose-dependent manner. Curcumin (40 µg/ml) and (25% v/v LGG CFS 10⁸ CFU/ml (undiluted condition)), either in a single regimen or in a combination regimen, significantly decreased the viability of SCC-9 cancer cells and human gingival fibroblast (HGF) normal cells ($p < 0.0001$ for the single regimen in SCC-9 cells and for the single and combination regimens in HGF cells, and $p = 0.02$ for the combination regimen in SCC-9 cells). Interestingly, the combination of a low dose of curcumin (5 µg/ml) and LGG CFS (25% v/v LGG CFS 1:100 concentration from undiluted condition) had no impact on the HGF cells ($p = 0.14$) but significantly inhibited the viability of the SCC-9 cells ($p < 0.0001$, $p = 0.002$ and $p = 0.02$ compared to curcumin and LGG CFS low dose single regimen, and control condition, respectively). Flow cytometric analysis revealed that SCC-9 cells treated with the combined low dose of curcumin and LGG CFS had a higher apoptotic rate than cells in the control group and their single treatments ($p < 0.0001$ for all conditions). The combined low dose of curcumin and LGG CFS also significantly increased mRNA expression of Bax/Bcl2 ratio in SCC-9 cells but not in HGF cells, indicating an underlying mechanism of the combination regimen. The combination of low dose regimen could insignificantly increase the caspase-3 protein expression in SCC-9 cells compared to the control group and single regimen ($p = 0.12$). However, there was no statistical difference in Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bak ratios between the treatment and control groups in SCC-9 cells ($p = 0.53$ and $p = 0.34$, respectively). These findings suggested that the co-administration of curcumin and LGG could exhibit anti-cancer effects in SCC-9 cells without cytotoxicity in normal fibroblast cells, providing a potential application of this combination against OSCC in future

Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology	Student's Signature
Academic Year:	2022	Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากการได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ มากมาย ท่านแรกข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทนพญ.ปาหนัน รัฐวงษ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า ที่อาจารย์ได้มอบความรู้และทักษะต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย รวมถึงคอยแก้ไขปัญหาและแนะนำสิ่งต่าง ๆ ให้การทำวิจัยในครั้งนี้ผ่านไปได้อย่างราบรื่น ข้าพเจ้าได้เรียนรู้ทักษะใหม่ ๆ มากมายจากอาจารย์ ทั้งในเรื่องการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงทักษะในการเขียนวิทยานิพนธ์และการเตรียมบทความเพื่อตีพิมพ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทนพญ.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ทนพ.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ กรรมการภายนอกสำหรับการสอบวิทยานิพนธ์ ที่อาจารย์ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อปรับปรุงต่าง ๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์และถูกต้องมากขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อาจารย์ได้ทำการสอนและมอบความรู้ให้ทางจุลชีววิทยากับข้าพเจ้า เพื่อนำไปใช้สอนนิสิตและนักศึกษาในรุ่นหลัง ข้าพเจ้าขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการโรคติดเชื้อชั้น 5 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อนร่วมชั้นปีทุกท่าน (น้องแพรว น้องดาหยิ น้องแรม พี่ขวัญ พี่นัท พี่นัทและน้องมัน) สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่ให้กันมาตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าอยู่ในห้องปฏิบัติการและเรียนในหลักสูตร สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณครอบครัวและคนรักของข้าพเจ้า ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในยามที่ข้าพเจ้าเหนื่อยและท้อ จนสามารถผ่านช่วงเวลาที่ยากลำบากและอุปสรรคต่าง ๆ มาได้ ข้าพเจ้าสัญญาว่าจะนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปสอนและพัฒนาองค์กรที่ข้าพเจ้าทำงานอยู่ให้รุ่งเรืองสืบไป

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ชัชพันธ์ อุคมพัฒนากร

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2. คำถามของการวิจัย.....	4
1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.4. สมมติฐานของการวิจัย.....	5
1.5. กรอบแนวคิดการวิจัย	5
บทที่ 2	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1. มะเร็งช่องปากชนิด OSCC.....	6
2.1.1. บทนิยาม	6
2.1.2. ระบาดวิทยา.....	6
2.1.3. สาเหตุการเกิดโรค	7

2.1.4. ลักษณะทางคลินิก.....	10
2.1.5. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา.....	10
2.1.6. การพยากรณ์โรค.....	11
2.2. กระบวนการตายแบบอะพอพอโตซิส.....	12
2.3 โพรไบโอติก.....	15
2.3.1. บทนิยาม.....	15
2.3.2. Lactobacilli.....	16
2.3.3. กลไกการทำงานของโพรไบโอติก LGG.....	17
2.3.4. การใช้ LGG ในทางคลินิก.....	18
2.3.5. การใช้ LGG ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	20
2.3.6. ความปลอดภัยของการใช้ LGG.....	23
2.4. เคอควิมิน.....	24
2.4.1. ลักษณะทั่วไป.....	24
2.4.2. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอควิมิน.....	25
บทที่ 3.....	32
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	32
3.1 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ เซลล์เพาะเลี้ยงและเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน..	32
3.2. เครื่องมือ.....	33
3.3. วิธีการทดลอง.....	33
3.3.1 การเพาะเลี้ยงและนับจำนวนเซลล์.....	33
3.3.2 การเตรียมสารละลายเคอควิมิน.....	35
3.3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ LGG และการเตรียมน้ำเลี้ยงส่วนใสของเชื้อ LGG (LGG CFS).....	35
3.3.4 การทดสอบเคอควิมินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay.....	36

3.3.5 การทดสอบ LGG CFS ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay.....	37
3.3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ร่วมกับเคอควิมินและ LGG CFS	38
3.3.7 การทดสอบเคอควิมินร่วมกับ LGG CFS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF cells โดยเทคนิค MTT assay.....	40
3.3.8 การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF cells โดยเทคนิค Flow cytometry.....	40
3.3.9 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>Bax</i> และ <i>Bcl-2</i> โดยเทคนิค Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)	41
3.3.10 การศึกษาการแสดงออกของ Apoptotic protein (caspase-3) และ Anti-apoptotic protein (Bcl-xL/Bak และ Mcl-1/Bak).....	43
3.3.11 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LGG CFS ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS).....	44
3.3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	45
บทที่ 4	46
ผลการทดลอง	46
4.1 ผลการทดสอบเคอควิมินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay.....	46
4.2 ผลการทดสอบ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay.....	48
4.3 ผลการทดสอบเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและใช้สารผสมที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF โดยเทคนิค MTT assay	50

4.4 ผลการศึกษาารูปแบบการตายของเซลล์ภายหลังการบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF กับเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและสารผสม โดยเทคนิค Flow cytometry.....	53
4.5 ผลการแสดงผลของยีน <i>Bax</i> และ <i>Bcl-2</i> ภายหลังการบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF กับเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวและสารผสม โดยเทคนิค real-time PCR.....	59
4.6 ผลการแสดงผลของ Apoptotic protein (caspase-3) และ Anti-apoptotic protein (<i>Bcl-xL/Bak</i> และ <i>Mcl-1/Bak</i>) ภายหลังการบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF กับเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวและสารผสม โดยเทคนิค Bio-Plex Pro RBM apoptosis.....	61
4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ LGG CFS โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS.....	66
บทที่ 5	68
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	68
สรุปผลการทดลอง.....	80
ภาคผนวก.....	82
บรรณานุกรม.....	92
ประวัติผู้เขียน.....	106

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 และ HGF ร่วมกับเคอควิมินและ LGG CFS	39
ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primer สำหรับปฏิกิริยา real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษา	43
ตารางที่ 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR.....	43
ตารางที่ 4 ชนิดของโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของ LGG CFS ที่ผ่านการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS.....	67



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1: กลไกของเชื้อแบคทีเรีย <i>Prophyromonas Gingivalis</i> ต่อการเกิดมะเร็งชนิด OSCC	10
ภาพที่ 2: ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ well differentiated OSCC ที่กำลังขยาย 400 เท่า	11
ภาพที่ 3: วิถีอะพอพโตซิส (apoptotic pathway).....	15
ภาพที่ 4: กลไกของเคอควิมินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC.....	29
ภาพที่ 5: ช่อง A, B, C, D และ E บน hemacytometer counting chamber ที่ใช้ทำการนับเซลล์.....	35
ภาพที่ 6: ร้อยละการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 หลังจากบ่มกับเคอควิมินที่ ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 80 µg/ml ที่เวลา 24 (กราฟสีดำ) และ 48 (กราฟสีเทา) ชั่วโมง (*p value < 0.05) กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl ซึ่งมีส่วนผสมของ DMSO ความเข้มข้น 0.08%.....	47
ภาพที่ 7: ร้อยละการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 หลังจากบ่มกับ 25% LGG CFS ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000, 1:100, 1:10 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และ LGG CFS ที่ระดับความเข้มข้น 10 ⁸ CFU/ml (ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น) ตั้งแต่ ที่เวลา 24 (กราฟสีดำ) และ 48 (กราฟสีเทา) ชั่วโมง (*p value < 0.05) กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ 25% v/v MRS broth	49
ภาพที่ 8: ร้อยละการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติ HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารชนิดเดียวได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) เคอควิมินที่ความเข้มข้น 40 µg/ml (curcumin-H) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10 ⁸ (ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น) (LGG CFS-H) และการใช้สารผสมได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10 ⁸ (curcumin-L+LGG CFS-H) เคอควิมินที่ความเข้มข้น 40 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-H+LGG CFS-L) และ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 40 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10 ⁸ (curcumin-H+LGG CFS-	

H) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μ l ^a คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ^b คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ curcumin-L ^c คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ LGG CFS-L 52

ภาพที่ 9 ร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) ที่มีการตายแบบอะพอโทซิส (ทั้ง early และ late stage) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 μ g/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 μ g/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ^a คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ^b คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ curcumin-L ^c คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ LGG CFS-L 55

ภาพที่ 10 ร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) ที่มีการตายแบบเนโครซิส หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 μ g/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 μ g/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS 56

ภาพที่ 11 ภาพตัวแทนของ Scatter plot หลังจากบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-L และหลุมควบคุม จากภาพในแต่ละสภาวะ ประกอบไปด้วยร้อยละของเซลล์ ดังนี้ เซลล์ที่ยังมีชีวิต เซลล์ตายแบบเนโครซิส เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (early stage) และเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (late stage) ของสภาวะ curcumin-L เท่ากับ 83.57%, 3.33%, 8.31% และ 4.80% ตามลำดับ ของสภาวะ LGG CFS-L เท่ากับ 89.67%, 2.99%, 4.51% และ 2.84% ตามลำดับ ของสภาวะ curcumin-L+LGG CFS-L เท่ากับ 46.57%, 3.10%, 28.07% และ 22.26% ตามลำดับ และของสภาวะควบคุม เท่ากับ 85.24%, 1.55%, 9.27% และ 3.93% ตามลำดับ 57

ภาพที่ 12 ภาพตัวแทนของ Scatter plot หลังจากบ่มเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-L และหลุมควบคุม จากภาพในแต่ละสภาวะ ประกอบไปด้วยร้อยละของเซลล์ ดังนี้ เซลล์ที่ยังมีชีวิต เซลล์ตายแบบเนโครซิส เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (early stage) และเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (late stage) ของสภาวะ curcumin-L เท่ากับ

93.80%, 2.17%, 3.80% และ 0.23% ตามลำดับ ของสภาวะ LGG CFS-L เท่ากับ 92.70%, 2.72%, 4.20% และ 0.38% ตามลำดับ ของสภาวะ curcumin-L+LGG CFS-L เท่ากับ 92.85%, 2.40%, 4.36% และ 0.39% ตามลำดับ ของสภาวะควบคุม เท่ากับ 91.39%, 3.80%, 4.34% และ 0.47% ตามลำดับ 58

ภาพที่ 13 ระดับการแสดงออกของยีน Bax/Bcl2 ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารชนิดเดียวได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสมได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl ^a คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ^b คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ curcumin-L ^c คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ LGG CFS-L 60

ภาพที่ 14 ระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl 63

ภาพที่ 15 ระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL/Bak ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl 64

ภาพที่ 16 ระดับการแสดงออกของโปรตีน Mcl-1/Bak ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25%

LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μ l..... 65



บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งศีรษะและลำคอคือ มะเร็งที่เกิดบริเวณทางเดินอาหารและทางเดินหายใจส่วนบน ซึ่งประกอบด้วยมะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งริมฝีปากและช่องปาก มะเร็งกล่องเสียง มะเร็งคอหอยส่วนจมูก มะเร็งคอหอยส่วนปาก มะเร็งคอหอยส่วนกล่องเสียง มะเร็งต่อมน้ำลาย และมะเร็งไทรอยด์ มะเร็งศีรษะและลำคอเป็นมะเร็งที่พบได้มากเป็นอันดับที่ 7 ของมะเร็งทั่วโลก (1) โดยมีมะเร็งช่องปากเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดของมะเร็งศีรษะและลำคอ จากการศึกษาของ Ferley และคณะ พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งช่องปากเพิ่มขึ้นใหม่เฉพาะในปี ค.ศ. 2012 ประมาณสามแสนคนทั่วโลก และได้สรุปว่า มะเร็งช่องปากมีอุบัติการณ์เฉลี่ยของโรคอยู่ที่ 4 คน ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี (2, 3) โดยมะเร็งช่องปากที่พบส่วนใหญ่จะเป็นชนิด oral squamous cell carcinoma (OSCC) ซึ่งพบได้ประมาณ 90% ของมะเร็งช่องปากทั้งหมด (1, 4) ปัจจุบันเชื่อกันว่าสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็ง OSCC ได้แก่ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และการเคี้ยวยาสูบ ยาเส้นและหมาก โดยพบว่าผู้ที่ทั้งสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์ร่วมกันจะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งชนิด OSCC เพิ่มขึ้นถึง 35 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่ได้สูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์ (5, 6) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่นๆที่ทำให้เกิดมะเร็งชนิดดังกล่าว ได้แก่ สุขภาวะช่องปากที่ไม่ดี การบาดเจ็บภายในช่องปาก การติดเชื้อ Human papillomavirus สายพันธุ์ 16 และ 18 รวมถึงสภาวะความไม่สมดุลของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (oral bacterial dysbiosis) เช่น การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* และ *Fusobacterium nucleatum* (4, 7, 8, 9) ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการพัฒนาวิธีการทางศัลยศาสตร์เพื่อรักษาโรคมะเร็งช่องปากไปอย่างมาก แต่อัตราการรอดชีวิตใน 5 ปีของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากยังอยู่ที่ประมาณร้อยละ 50 เท่านั้น (4, 10) ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาารูปแบบการรักษาโรคมะเร็งช่องปากชนิด OSCC ด้วยวิธีอื่นๆ จึงยังมีความจำเป็นและมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง (4, 10)

กระบวนการเกิดมะเร็ง OSCC มีหลากหลายขั้นตอนและมีความซับซ้อน ซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยที่หลากหลาย ทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นและปัจจัยจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งอาจนำไปสู่ความผิดปกติของยีนและโปรตีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น ทำให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนกำเนิดมะเร็ง (oncogene) ทำให้เกิดการยับยั้งยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) และทำให้เกิดการเสียสมดุลของการแบ่งเซลล์และการตายของเซลล์แบบที่มีแผนกำหนด (programmed cell death) ที่เรียกว่าอะพอพโทซิส (apoptosis)

(11) ความผิดปกติของการควบคุมการตายแบบอะพอพโตซิสทำให้เกิดโรคหรือพยาธิสภาพได้หลายชนิด วิธีการตายอะพอพโตซิส (apoptotic pathway) แบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีภายนอกหรือวิธีตัวรับการตาย (extrinsic or death receptor pathway) และวิธีภายในหรือวิธีไมโทคอนเดรีย (intrinsic or mitochondrial pathway) อะพอพโตซิสจะถูกควบคุมโดยยีนหลายตัว เช่น *p53* และ *PTEN* gene และมีโมเลกุลเกี่ยวข้องหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL) และกลุ่ม pro-apoptotic proteins (Apaf-1, Bax, caspases) (12, 13) การศึกษาที่ผ่านมาได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ Bax, Bcl-2, caspase-3, -9 กับการพยากรณ์โรคของ OSCC (11, 14, 15, 16) เช่น ระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อ OSCC จะมีความสัมพันธ์กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปที่หลอดน้ำเหลืองบริเวณลำคอ (14) ระดับการแสดงออกของโปรตีน Bax จะเพิ่มสูงขึ้นใน well differentiated OSCC เมื่อเทียบกับ poorly differentiated OSCC (15) ระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ลดลงในชิ้นเนื้อมะเร็ง OSCC โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกและจุลพยาธิวิทยา (16)

โพรไบโอติก (probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอ จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของผู้เป็นเจ้าของ โดยการได้รับโพรไบโอติกเข้าไปจะช่วยในการเพิ่มสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย (17) ในปัจจุบันโพรไบโอติกได้เข้ามามีบทบาทและนิยมใช้มากขึ้นในทางการแพทย์ เนื่องจากมีความปลอดภัย ทนต่อสภาพความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อน้ำดี (gastric acidity and bile acid resistance) มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพอื่น (antimicrobial substances) และมีความสามารถในการปรับภูมิคุ้มกัน (modulate immune response) (17, 18) *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีการศึกษาและนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกมากที่สุด (19, 20) และยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเชื้อประจำถิ่น (microbiota) ในหลากหลายระบบร่างกายมนุษย์ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีประวัติการบริโภคมายาวนานและมีความปลอดภัย (21, 22) *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากมีคุณสมบัติทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดี สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ (intestinal epithelial cell) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการศึกษาเพื่อนำ LGG มาใช้ประโยชน์ทางคลินิกในหลายการศึกษา (21, 23) ซึ่งมีรายงานถึงประสิทธิภาพของการใช้โพรไบโอติก LGG ที่ยังมีชีวิต (viable LGG) และน้ำเลี้ยงส่วนใสของ LGG (LGG cell-free supernatant, LGG CFS) ซึ่งสามารถต่อต้านการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจาย และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น

เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ทั้งในรูปแบบหลอดทดลอง (*in vitro*) และ สัตว์ทดลอง (*in vivo*) (21, 24) สำหรับการศึกษาการใช้ LGG ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ เซลล์มะเร็งช่องปากยังคงมีอยู่อย่างจำกัด (8) โดยมีเพียงการศึกษาของ Cheng และคณะในปี ค.ศ. 2017 ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้พบว่าการใช้ LGG ร่วมกับสารเจนิโปไซด์ (geniposide) ซึ่งเป็นสารสำคัญ หลักที่พบในดอกและผลของต้นพุดซ้อน *Gardenia jasminoides* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ เซลล์มะเร็ง OSCC ชนิด HSC-3 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้ สารเจนิโปไซด์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การใช้ LGG ร่วมกับสารเจนิโปไซด์ยังสามารถเพิ่มระดับการ แสดงออกของ mRNA และโปรตีน caspase-3, 8, 9 และ Bax ซึ่งมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้ เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส และได้สรุปว่า การใช้ LGG ที่ยังมีชีวิตสามารถเพิ่ม ประสิทธิภาพให้แก่สารเจนิโปไซด์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง OSCC ชนิด HSC-3 (25) ในขณะที่ การศึกษาการใช้ LGG CFS ในการยับยั้งมะเร็งช่องปากชนิด OSCC ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

เคอคิวมิน (curcumin) เป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่ พบได้ในเหง้าของขมิ้นชัน *Curcuma longa* และเป็นสารที่ได้รับความสนใจในวงการแพทย์และเภสัช กรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ชนิดต่างๆ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เคอคิวมิน สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่และการรุกราน และการสร้างหลอดเลือดใหม่ รวมถึง เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้หลากหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร รวมถึงเซลล์มะเร็งช่องปาก (26, 27, 28, 29) สำหรับ มะเร็งชนิด OSCC Liao และคณะในปี ค.ศ. 2011 พบว่า การใช้เคอคิวมินที่ความเข้มข้น 5 μM เป็น เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง OSCC ชนิด CAL-27 สามารถชักนำให้ เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อวัดด้วยเทคนิค flow cytometry และเหนี่ยวนำให้วัฏจักรของเซลล์หยุดที่ระยะ G2M (27) Wang และคณะในปี ค.ศ. 2008 พบว่า การใช้เคอคิวมินที่ ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/L}$ สามารถยับยั้งการเพิ่ม จำนวนของเซลล์มะเร็ง OSCC ชนิด CAL-27 และลดการแสดงออกของโปรตีนที่ต่อต้านการตาย แบบอะพอพโทซิส Bcl-2, Bcl-xL และ Mcl-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (29) ปัจจุบันเคอคิวมินถูก นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในแง่ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ รวมถึงการศึกษา

การนำเคอควิมินมาผสมกับยารักษาเคมีบำบัดและสารธรรมชาติชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการรักษามะเร็งเพิ่มเติม (26)

การศึกษาการใช้โพรไบโอติกร่วมกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจเป็นแนวทางใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (30) การศึกษาการใช้โพรไบโอติก LGG ร่วมกับเคอควิมินในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ผ่านมาพบว่ามีเพียงการศึกษาเดียวซึ่งเป็นการศึกษาของ Yazdi และคณะ ในปี ค.ศ.2019 (31) โดยคณะผู้วิจัยได้รายงานการใช้ LGG ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ร่วมกับการใช้เคอควิมินความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ สามารถลดระดับการแสดงออกของสารตั้งต้นการอักเสบชนิด Interleukin-8 (IL-8) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29-19A ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้ LGG เพียงอย่างเดียว ซึ่ง IL-8 มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตและการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (31) และยังไม่มีการศึกษาถึงการใช้ LGG CFS ร่วมกับเคอควิมินในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด OSCC มาก่อน ดังนั้นจึงเป็นที่มาสำหรับงานวิจัย “ผลของ *Lactobacillus rhamnosus* GG ร่วมกับสารเคอควิมินต่อการต้านเซลล์มะเร็งชนิด oral squamous cell carcinoma (SCC-9 cells)” ในครั้งนี้ โดยงานวิจัยนี้ต้องการทดสอบฤทธิ์ของเคอควิมินและ LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและใช้สารผสมในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการมีชีวิต (cell viability) และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งชนิด OSCC ข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาหรือยาในรูปแบบใหม่ๆ และอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการรักษาทางคลินิกได้ในอนาคต

1.2. คำถามของการวิจัย

การใช้เคอควิมินร่วมกับ LGG CFS ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการมีชีวิต และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-9 cells) เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เคอควิมินหรือ LGG CFS เพียงอย่างเดียวหรือไม่

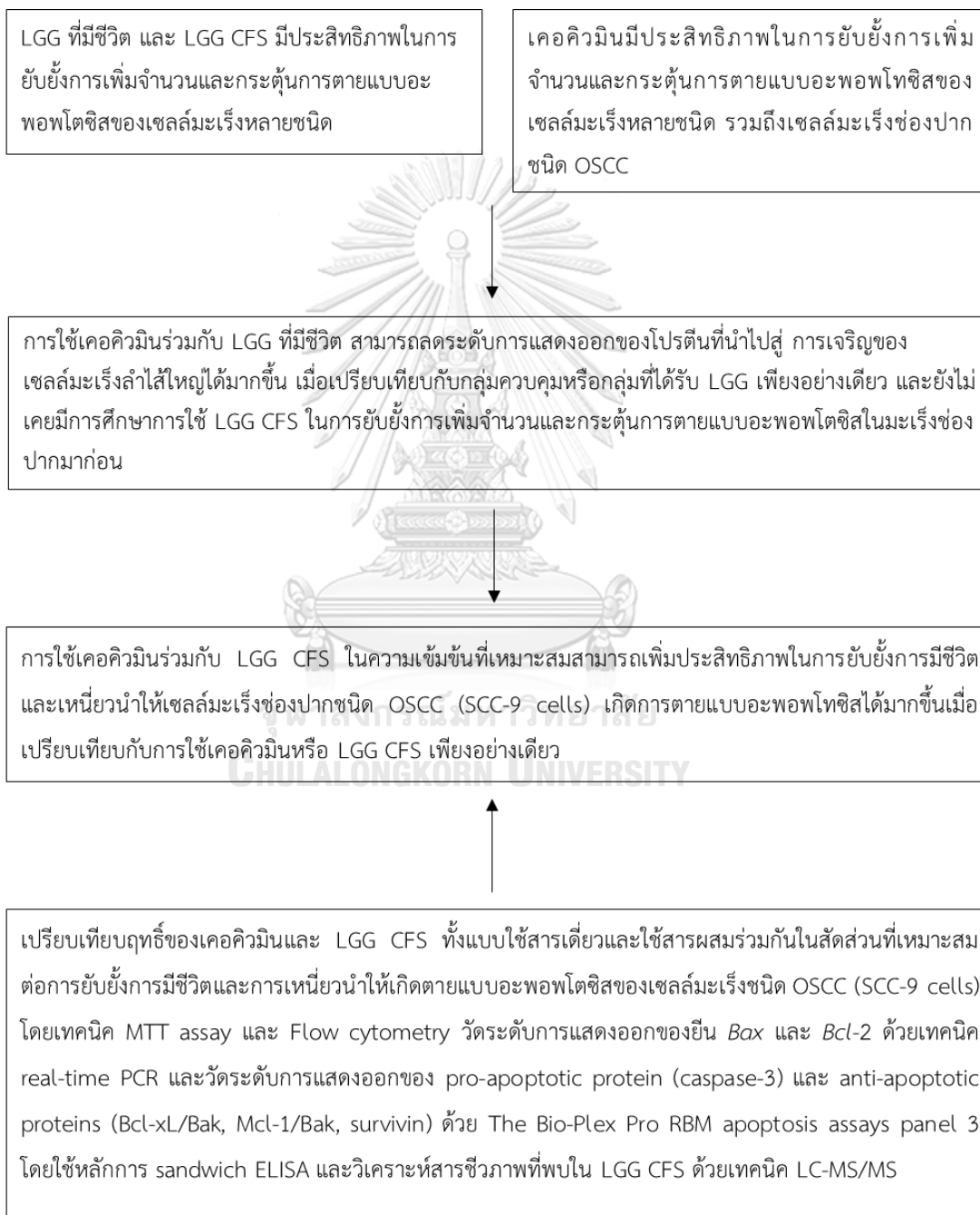
1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของเคอควิมินและ LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและใช้สารผสมในสัดส่วนที่เหมาะสม ต่อการยับยั้งการเพิ่มการมีชีวิต และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งชนิด OSCC (SCC-9 cells)

1.4. สมมติฐานของการวิจัย

การใช้เคอควินร่วมกับ LGG CFS ในความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการมีชีวิตและเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-9 cells) เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เคอควินหรือ LGG CFS เพียงอย่างเดียว

1.5. กรอบแนวคิดการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. มะเร็งช่องปากชนิด OSCC

2.1.1. บทนิยาม

มะเร็งช่องปากเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดของมะเร็งศีรษะและลำคอจากสถิติประเทศไทยและสถิติทั่วโลก โดย OSCC เป็นชนิดของมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุด มะเร็งชนิดนี้เกิดจากการเจริญที่ผิดปกติของเยื่อบุผิวช่องปาก (2, 3, 4) สาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งชนิดนี้ คือ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และการเคี้ยวหมาก (2, 4, 5, 6) โดยแม้ว่าความผิดปกติที่เกิดขึ้นในช่องปากจะสามารถรู้สึกและสังเกตได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่าผู้ป่วยมาพบแพทย์หรือทันตแพทย์ในระยะท้ายของมะเร็ง (stage III-IV) ได้บ่อย (4) วิธีการรักษามะเร็งชนิดนี้ คือ ใช้วิธีการทางศัลยกรรมหรือการผ่าตัดในระยะแรก สำหรับมะเร็งในระยะท้ายอาจต้องใช้วิธีการผ่าตัดร่วมกับการใช้การรักษาด้วยเคมีบำบัดและรังสีรักษา (32) การรักษาที่ประสบผลสำเร็จนอกจากมีเป้าหมายให้ผู้ป่วยหายจากโรคแล้ว ยังต้องคำนึงถึงการทำงานของอวัยวะในช่องปาก รูปลักษณ์ และคุณภาพชีวิตโดยรวมของผู้ป่วยหลังจากรักษาอีกด้วย (4, 33)

2.1.2. ระบาดวิทยา

มะเร็งช่องปากพบประมาณ 30% ของมะเร็งศีรษะและลำคอ และมากกว่า 90% ของมะเร็งช่องปาก คือ OSCC สถิติประเทศไทยพบผู้ป่วยมะเร็งช่องปากรายใหม่ต่อปีประมาณ 3,000 ราย ขณะที่ทั่วโลกพบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 300,000 – 400,000 คนต่อปี โดย OSCC มีอัตราการอุบัติการณ์เฉลี่ยของโรคต่อปีต่อประชากร 100,000 คนอยู่ที่ 4 คน และมีอัตราการเสียชีวิตจากโรสดังกล่าวอยู่ที่ 1.9 คน ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี (2, 3, 4) โดยอุบัติการณ์ของโรคจะพบสูงมากในทวีปเอเชียใต้ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา) อาจพบอัตราการอุบัติการณ์เฉลี่ยของโรคต่อปีต่อประชากร 100,000 คนอยู่ที่ 10 คน (2, 4) OSCC พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ 1.5 – 2 ต่อ 1 และมักพบในผู้ป่วยช่วงอายุ 50 – 70 ปี (34)

2.1.3. สาเหตุการเกิดโรค

บุหรี่ยาสูบ และแอลกอฮอล์เป็นสาเหตุหลักของการเกิด OSCC ทั่วโลก ซึ่งเกิดจากสารก่อมะเร็งในบุหรี่ยาสูบหลายชนิด เช่น polycyclic hydrocarbons, nitrosamines นอกจากนี้การดื่มแอลกอฮอล์ยังเป็นสาเหตุของ OSCC และมีผลเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) เมื่อเสพร่วมกับบุหรี่ยาสูบ (5, 6) ในประเทศแถบเอเชียรวมทั้งในประเทศไทยพบว่าการเคี้ยวหมากเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรคเช่นกัน ปัจจัยอื่น ๆ ที่พบว่าเป็นสาเหตุของมะเร็งชนิดดังกล่าวได้แก่ สุขภาวะช่องปากที่ไม่ดี การขาดสารอาหาร การบริโภคเนื้อแดงและอาหารหมักดอง การติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 และสภาวะความไม่สมดุลของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (4, 7, 8, 9)

2.1.3.1. บุหรี่และยาสูบ

ยาสูบและบุหรี่ยาสูบเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดของการเกิด OSCC โดยมีสารก่อมะเร็งที่สำคัญ ได้แก่ polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosamines, tar และ benzo[a]pyrene ซึ่งพบว่ามีปริมาณการสูบมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง และมักมีปัจจัยร่วมคือการสูบบุหรี่ร่วมกับการดื่มแอลกอฮอล์ (5, 6) ขั้นตอนการเกิดมะเร็งจากสารประกอบในบุหรี่ยาสูบนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา แต่ที่ยอมรับกันโดยทั่วไปประกอบด้วย 2 ระยะ ได้แก่ ระยะแรก ซึ่งเป็นระยะที่สารก่อมะเร็งในบุหรี่ยาสูบจะเข้าจับกับดีเอ็นเอ (DNA) แบบพันธะโควาเลนต์ แล้วทำให้เกิดการทำลายของสายดีเอ็นเอ ซึ่งนำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์ที่ไม่สามารถฟื้นคืนได้ (irreversible injury) ต่อมาจึงเข้าสู่ระยะสืบเนื่อง ซึ่งพบหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงของสายดีเอ็นเอเกิดขึ้นแล้ว (35) ในระยะต่อมาจึงมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นกลายเป็นรอยโรคก่อนมะเร็งช่องปาก (oral precancerous lesion) ที่สำคัญได้แก่ ลิวโคเพลเคีย (leukoplakia) และอีริโทรเพลเคีย (erythroplakia) ซึ่งเป็นรอยโรคสีขาว และสีแดงที่พบในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนในช่องปาก ก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น OSCC ในที่สุด (4, 35) การสูบบุหรี่และการใช้ยาสูบยังเชื่อว่าการกระตุ้นการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนต้านมะเร็ง *p53* และทำให้การแสดงออกของโปรตีน *p53* มีความผิดปกติตามไปด้วย โดยพบว่าในภาวะปกติเซลล์เนื้อเยื่อช่องปากจะมีระดับของโปรตีน *p53* ต่ำ เนื่องจากโปรตีน *p53* จะถูกทำลายผ่านกลไก proteasomal degradation อยู่ตลอดเวลา แต่เมื่อยีนดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ จะทำให้ระดับของโปรตีน *p53* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นยีนต้านมะเร็ง โดยไม่สามารถซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ และหยุดวงจรเซลล์ได้อีกต่อไป (36) การสูบบุหรี่ยังกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อช่องปากมีความผิดปกติ โดยเหนี่ยวนำให้ยีนกำเนิดมะเร็ง *glucose transporter protein*

type 1 (GLUT-1) ทำงาน และทำให้มีระดับการแสดงออกของ GLUT-1 เพิ่มขึ้น นำไปสู่การนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากกว่าปกติ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเจริญและแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์ และพยากรณ์ของโรคที่ไม่ดี (37) Ravi และคณะในปี ค.ศ.1996 ได้รายงานถึงการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน Bcl-2 ในรอยโรคก่อนมะเร็งช่องปากและมะเร็งช่องปากชนิด OSCC ในชิ้นเนื้อตัวอย่างคนไข้ที่มีประวัติสูบบุหรี่หรือเคี้ยวหมาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ Bcl-2 ในการเป็นโปรตีนชนิดยับยั้งการตายและเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งช่องปากชนิด OSCC (38)

2.1.3.2. แอลกอฮอล์

แบคทีเรียในช่องปากหลายชนิด เช่น *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* และ *Streptococcus intermedius* สามารถเปลี่ยน (metabolize) แอลกอฮอล์ให้กลายเป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetyldehyde) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่สำคัญชนิดหนึ่ง (39, 40) ตัวแอลกอฮอล์เองยังทำให้ผนังเยื่อเซลล์ช่องปากแห้งจากการขาดน้ำ (dehydration) ส่งผลให้สารก่อมะเร็งเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอลกอฮอล์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อผิวช่องปากได้ รวมถึงผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์มักมีภาวะขาดสารอาหารและมีภูมิคุ้มกันไม่ดี ทำให้มีโอกาสเป็นมะเร็งช่องปากได้ง่ายขึ้น (41) ดังนั้นการใชยาสูบร่วมกับแอลกอฮอล์จึงมีผลเป็นการเสริมฤทธิ์ของการเกิดมะเร็ง OSCC (5, 6)

2.1.3.3. การเคี้ยวหมาก (betel quid chewing)

ในผลของหมากมีสารก่อมะเร็งมากมาย การเคี้ยวหมากมีความสัมพันธ์กับการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็งช่องปากชนิดหนึ่งคือ oral submucous fibrosis ซึ่งมีอาการแสดงทางคลินิกคือ มีอาการแสบร้อนเมื่อทานอาหารรสจัด ร่วมกับเยื่อเมือกบริเวณดังกล่าวมีสีขาวซีด เมื่อเวลาผ่านไปเนื้อเยื่อบริเวณนั้นจะเกิดพังผืดข้างใต้ มีลักษณะคล้ายแข็ง เมื่อรอยโรคมีการขยายขอบเขตมากขึ้น ผู้ป่วยอาจรู้สึกอ้าปากได้น้อยลง นอกจากนี้การเคี้ยวหมากยังทำให้เกิดการฝ่อลีบของชั้นเยื่อผิวช่องปาก ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวมีความไวต่อสารก่อมะเร็งมากขึ้น มีรายงานว่าซัชมิวคัสไฟโบรซิสช่องปากมีโอกาสการเปลี่ยนไปเป็น OSCC อยู่ที่ 1.9 – 7.6% (4, 42, 43)

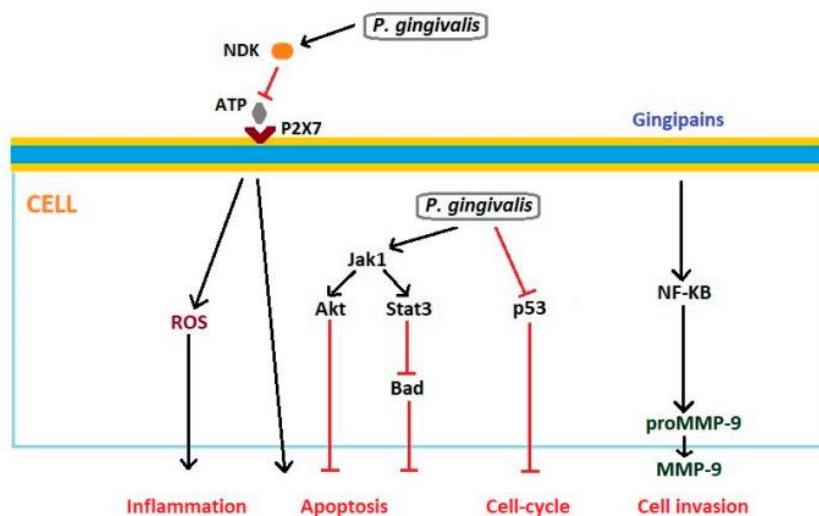
2.1.3.4. ปัจจัยจากฟัน

สุขภาพช่องปากที่ไม่ดี การบาดเจ็บภายในช่องปากจากอุปกรณ์ทางทันตกรรมชนิดต่างๆ การระคายเคืองจากฟันแหลมคม และฟันปลอมที่มีสภาพไม่ดีอาจกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในช่องปาก และเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งชนิด OSCC ได้ (4)

2.1.3.5. สภาวะความไม่สมดุลของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

โดยปกตินิเวศวิทยาภายในช่องปากจะทำหน้าที่ควบคุมชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ภายในช่องปาก นิเวศวิทยาแต่ละแห่งภายในช่องปาก จะเลือกเอาเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในแต่ละแห่งเท่านั้นให้เจริญเติบโตดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมดังกล่าว เชื้อจุลินทรีย์ที่พบปกติภายในช่องปากประกอบด้วยทั้งไวรัส ยีสต์ แบคทีเรีย และโปรโตซัว สำหรับกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ประกอบไปด้วยกลุ่มของแบคทีเรียที่ฝังอยู่ภายในพื้นผิว กลุ่มที่เกาะที่พื้นผิว และกลุ่มที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นของแบคทีเรียซึ่งจะประกอบกันเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) หรือแผ่นคราบจุลินทรีย์ในช่องปาก ปัจจุบันมีงานศึกษาวิจัยมากมายที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียบางชนิดกับโรคในช่องปาก เช่น โรคฟันผุ โรคปริทันต์อักเสบ รวมถึงโรคมะเร็งช่องปากชนิด OSCC (8, 9, 44)

เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal bacterial flora) ภายในช่องปากประกอบด้วยหลากหลายยีนส์และสปีชีส์ เช่น *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Gemella sanguinis*, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella elegans*, *Granulicatella adiacens*, *Neisseria* spp. (8, 45) หลายการศึกษาได้รายงานถึงสภาวะความไม่สมดุลของเชื้อแบคทีเรียในช่องปากกับการเกิดมะเร็งช่องปากชนิด OSCC ซึ่งการเพิ่มขึ้นของยีนส์และสปีชีส์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Capnocytophaga gingivalis*, *Streptococcus anginosus*, *Prevotella melaninogenica*, *Veillonella* spp, *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Actinomyces* spp., *Clostridium* spp., *Haemophilus* spp. และ *Enterobacteriales* มีความสัมพันธ์กับรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิด OSCC โดยสามารถพบได้ทั้งในน้ำลายและชิ้นเนื้อตัวอย่างของผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ในภาวะไม่มีอากาศ ได้แก่ *Porphyromonas gingivalis* และ *Fusobacterium nucleatum* ซึ่งมีบทบาทในการก่อโรคปริทันต์อักเสบในมนุษย์ ถือเป็นสปีชีส์ของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์อย่างมากกับรอยโรคมะเร็งชนิด OSCC (8, 9) บทบาทของ *P. gingivalis* ต่อพยาธิกำเนิดของมะเร็งชนิด OSCC ที่สำคัญได้แก่ การกระตุ้นการอักเสบแบบเรื้อรัง กระตุ้นโปรตีนหรือสัญญาณที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส เพิ่มความสามารถในการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง และสร้างสารก่อมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น สาร gingipain (ภาพที่ 1) (9)



ภาพที่ 1: กลไกของเชื้อแบคทีเรีย *Prophyromonas Gingivalis* ต่อการเกิดมะเร็งชนิด OSCC (9)

2.1.4. ลักษณะทางคลินิก

ผู้ป่วยมักจะมาด้วยแผลที่เป็นแฉ่ง มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน เป็นก้อนยื่น หรือมีก้อนแข็งใต้เยื่อช่องปาก ในบางครั้งอาจตรวจพบต่อมน้ำเหลืองโตที่บริเวณคอได้ สามารถเป็นได้หลายตำแหน่งในช่องปาก ได้แก่ บริเวณลิ้น พื้นช่องปาก กระพุ้งแก้ม เหงือก เพดานแข็ง และสามเหลี่ยมด้านหลังฟันกราม ระยะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งชนิด OSCC แบ่งออกเป็น 4 ระยะ โดยอาศัยลักษณะทางคลินิก 3 อย่าง ได้แก่ ขนาดของรอยโรคมะเร็ง (T) การแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ (N) และการแพร่กระจายไปไกล (M) ซึ่งเรียกว่าการจัดระยะทางคลินิก TNM clinical staging โดยผู้ป่วยที่อยู่ในระยะสูงกว่าจะมีการพยากรณ์ของโรคแย่กว่า เช่น ผู้ป่วยในระยะที่ 4 จะมีการพยากรณ์ของโรคแย่กว่าผู้ป่วยในระยะที่ 2 (4, 46)

2.1.5. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

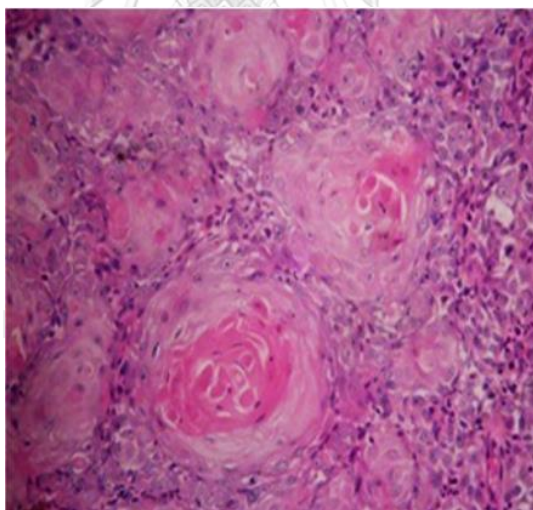
การจัดลำดับขั้นทางจุลพยาธิวิทยาแก่มะเร็งชนิด OSCC จะใช้เกณฑ์ร่วมกัน 3 อย่าง ได้แก่ ระดับการสร้างเคอราติน (keratinization) ภาวะหลากหลายของเซลล์และนิวเคลียส (cellular and nuclear pleomorphism) และกิจกรรมไมโทซิสของเซลล์ (mitotic activity) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถบอกได้ถึงเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (cellular differentiation) ลำดับขั้นทางจุลพยาธิวิทยาแบ่งออกเป็น 3 ลำดับขั้น คือ ลำดับขั้นที่ 1 ถึงลำดับขั้นที่ 3 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมทาง

ชีววิทยาของเซลล์มะเร็ง กล่าวคือ มะเร็งลำดับขั้นที่ 1 จะโตและแพร่กระจายได้ช้ากว่ามะเร็งในลำดับขั้นที่สูงขึ้นไป (4, 47)

ลำดับขั้นที่ 1 ลำดับขั้นต่ำ เปลี่ยนสภาพดี (grade 1, low grade, well differentiated) เซลล์มะเร็งจะมีการสร้างเคอราทินมาก ไม่ค่อยพบภาวะหลากหลายรูปของเซลล์และนิวเคลียส เซลล์มะเร็งมีลักษณะคล้ายกันมากกับเซลล์เยื่อบุผิวปกติ รูปไมโทซิสและไมโทซิสนอกแบบ (atypical mitosis) พบบาก (ภาพที่ 2) (47)

ลำดับขั้นที่ 2 ลำดับขั้นปานกลาง เปลี่ยนสภาพปานกลาง (grade 2, intermediate grade, moderately differentiated) เซลล์มะเร็งมีการสร้างเคอราทินน้อยกว่า ภาวะหลากหลายรูปของเซลล์และนิวเคลียสมีมากกว่า รูปไมโทซิสและไมโทซิสผิดปกติเห็นได้บ่อยกว่า (47)

ลำดับขั้นที่ 3 ลำดับขั้นสูง เปลี่ยนสภาพไม่ดี (grade 3, high grade, poorly differentiated) เซลล์มะเร็งแทบจะไม่มีการสร้างหรือไม่สร้างเคอราทิน ภาวะหลากหลายรูปของเซลล์และนิวเคลียสเห็นได้อย่างชัดเจน รูปไมโทซิสและไมโทซิสผิดปกติเห็นได้ง่าย (47)



ภาพที่ 2: ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ well differentiated OSCC ที่กำลังขยาย 400 เท่า(47)

2.1.6. การพยากรณ์โรค

ปัจจัยที่มีผลต่อพยากรณ์ของโรคมะเร็งช่องปากชนิด OSCC มีหลายปัจจัย เช่น ระยะของโรคมะเร็ง (TNM staging) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (cellular differentiation) การ

ลูกกลมของโรคมะเร็งไปยังหลอดเลือดและเยื่อหุ้มเส้นประสาทเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา รูปแบบการแพร่กระจายของรอยโรคมะเร็งเมื่อพิจารณาจากขอบหน้าสุดของมะเร็ง (worst pattern of invasion) อย่างไรก็ตามโดยรวมแล้วจะมีการพัฒนาวิธีการรักษาทางศัลยศาสตร์ การฉายรังสีรักษา และการให้เคมีบำบัดตลอดช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา อัตราการรอดชีวิต 5 ปี สำหรับโรคมะเร็งชนิดนี้ยังอยู่ที่ประมาณร้อยละ 50 (4, 10)

2.2. กระบวนการตายแบบอะพอพโตซิส

อะพอพโตซิส (apoptosis) เป็นแบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ที่ถูกควบคุมโดยยีน มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาของการพัฒนาระบบร่างกาย เช่น ระบบประสาทและระบบภูมิคุ้มกัน การกำจัดเซลล์ที่เสื่อมเนื่องจากความชราภาพหรือหมดอายุขัย และการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส รวมถึงเป็นกลไกที่ควบคุมและหยุดการเจริญของเซลล์ที่เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น ความผิดปกติที่ DNA ถูกทำลายและไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์หดตัวลง (cell membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และ DNA เกิดการแตกหัก โดยในขั้นสุดท้ายเซลล์จะมีการแยกออกเป็นถุงเล็กๆ (apoptotic bodies) ซึ่งเก็บองค์ประกอบของเซลล์ไว้ภายใน และถูกจับกินโดย macrophage โดยจะไม่เกิดการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จะเกิดภายหลังกระบวนการที่อาศัยเอนไซม์ caspase ที่เป็นตัวกลางของการเกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโตซิส โดยการควบคุมของโปรตีนที่ทำให้เกิดการตาย (pro-apoptotic protein) และโปรตีนที่ยับยั้งไม่ให้เกิดการตาย (anti-apoptotic protein) การควบคุมการอะพอพโตซิสที่ไม่เหมาะสมมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ มากมาย ความบกพร่องในการชักนำการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์อาจทำให้เกิดโรคมะเร็ง โรคภูมิคุ้มกันต่อตัวเอง เป็นต้น ส่วนการชักนำการตายแบบอะพอพโตซิสที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดโรคเนื่องจากการเสื่อมของระบบประสาท โรคเนื่องจากการขาดเลือดไปเลี้ยง เป็นต้น (48, 49)

วิธีการตายแบบอะพอพโตซิส (apoptotic pathways) (ภาพที่ 4) แบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีภายนอก หรือวิธีตัวรับการตาย (extrinsic pathways หรือ death receptor pathway) เกิดจากการจับของ death ligands จากภายนอกเซลล์ เช่น TNF-alpha, FasL, TRAIL กับตัวรับ (death receptor) ที่ผิวเซลล์ เช่น TNF receptor-1, FasR, DR5 ตามลำดับ ซึ่งการจับกับตัวรับนี้ทำให้เกิด

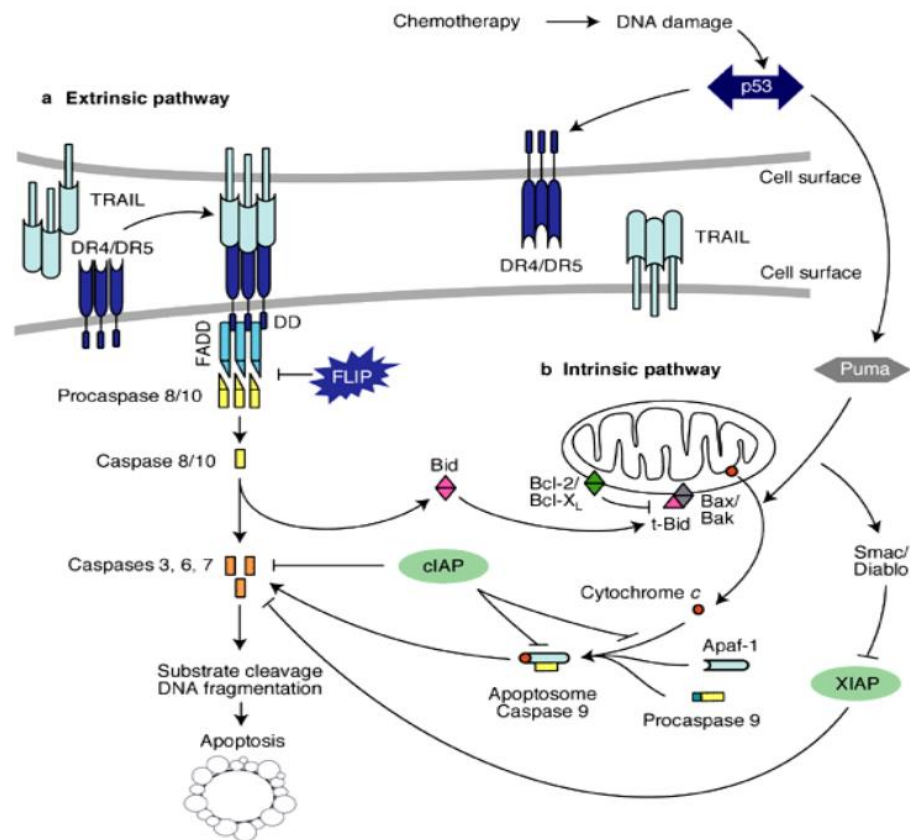
การรวมกลุ่มของ death domains ของตัวรับกับ adaptor molecules เช่น FADD, TRADD ซึ่งจะ
ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 และ caspase-8 ที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปกระตุ้นการ
ทำงานของเอนไซม์ caspase-3, -6, และ -7 และส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส ส่วนอีก
วิธีหนึ่งคือ วิธีภายในหรือวิธีไมโทคอนเดรีย (intrinsic pathway หรือ mitochondrial pathway)
โดยเริ่มจากไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหายจากปัจจัยต่างๆ เช่น รังสี สารเคมีที่เป็นพิษจากภายนอก
การขาดออกซิเจน การติดเชื้อไวรัส ความเสียหายจากอนุมูลอิสระ ทำให้มีการปลดปล่อยของโปรตีน
cytochrome c ออกมาสู่ cytoplasm cytochrome c จะจับและกระตุ้นโปรตีน apoptotic
protease activating factor-1 (apaf-1) เกิดเป็นกลุ่มโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า apoptosome ซึ่ง
จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 และ caspase-9 ที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปกระตุ้นการ
ทำงานของเอนไซม์ caspase-3, -6, -7 ซึ่งก็จะส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสเช่นกัน
(49, 50, 51)

การควบคุมการเกิดอะพอพโตซิสวิธีไมโทคอนเดรียจะเกิดผ่านโปรตีนที่เป็นสมาชิกของกลุ่ม
โปรตีน Bcl-2 (Bcl-2 family) โปรตีนกลุ่มนี้จะถูกควบคุมโดยโปรตีน p53 โปรตีนจากกลุ่มโปรตีน
Bcl-2 จะทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย โปรตีนจากกลุ่มโปรตีน
Bcl-2 แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ส่งเสริมการเกิดอะพอพโตซิส (pro-apoptotic protein)
และโปรตีนที่ต้านการเกิดอะพอพโตซิส (anti-apoptotic protein) pro-apoptotic protein ได้แก่
Bcl-10, Bax, Bak, BID, Bad, Bim, Bik, Blk, Puma, Noxa ส่วน anti-apoptotic protein ได้แก่
Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, Mcl-1, survivin โดยในวิธีไมโทคอนเดรีย กรณีที่
ความเสียหายของเซลล์มีมากจนไม่สามารถแก้ไขได้ด้วยวิธีอื่น โปรตีน p53 จะกระตุ้นการสังเคราะห์
โปรตีน Bax ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bcl-2 ทำให้ไมโทคอนเดรียสามารถปล่อย
cytochrome c ออกมาได้ (49, 50, 51) ดังแสดงในภาพที่ 3 (50)

สำหรับเอนไซม์ caspase นั้นสามารถแบ่งชนิดย่อยได้เป็น 2 กลุ่มตามหน้าที่การทำงาน
ได้แก่ initiator caspases ประกอบด้วย caspase-2, -8, -9, -10 และ effector caspases
ประกอบด้วย caspase-3, -6, -7 สมาชิกที่สำคัญที่สุดของ effector caspases คือ caspase-3 ซึ่ง
จะสามารถไปกระตุ้นเอนไซม์ CAD โดยไปปลดปล่อยเอนไซม์ CAD ออกมาจากตัวยับยั้ง เอนไซม์ CAD
จะทำให้เกิดการแตกสลายของ DNA โปรตีนในนิวเคลียส และโปรตีนที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง

เซลล์ นำไปสู่การเกิด apoptotic bodies และการแสดงออกของโมเลกุลบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้ macrophage เข้ามาจับกิน (50, 52)

กระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ กระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสในระยะเริ่มต้น (early apoptosis) และ กระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสในระยะท้าย (late apoptosis) สำหรับกระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสในระยะเริ่มต้น เกิดขึ้นภายหลังจากที่เซลล์ที่ได้รับสัญญาณการตายแบบอะพอพโตซิสซึ่งกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 จนนำไปสู่กระบวนการแตกสลายของ DNA และทำให้เซลล์เริ่มหดตัวเล็กลง ในระหว่างนี้เยื่อหุ้มเซลล์จะเริ่มแสดงลักษณะเปลี่ยนแปลงไป โดยโปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชนิด phosphatidylserin (PS) จะเคลื่อนที่จากด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มเกิดการเสียสภาพ ในระยะนี้สาร Annexin V จะสามารถจับกับโปรตีน PS บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผิดปกติได้ ในขณะที่สาร Propidium Iodide (PI) ยังไม่สามารถเข้าจับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จึงเป็นที่มาของรูปแบบในการย้อมติดสี Annexin V positive – PI negative ที่แสดงระยะ early apoptosis ของเซลล์ หลังจากนั้น DNA โปรตีนในไซโตพลาสซึม (cytosolic protein) และเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายและเสียสภาพมากขึ้น ทำให้สาร PI เข้าจับกับส่วนของเซลล์ที่หลงเหลืออยู่ได้ จึงเป็นที่มาของรูปแบบในการย้อมติดสี Annexin V positive – PI positive ที่แสดงระยะ late apoptosis ของเซลล์ หลังจากนั้นเซลล์และโครงสร้างของเซลล์จะแตกสลายเป็นชิ้นเล็กๆอย่างสมบูรณ์ และถูกจับกินโดย macrophage ต่อไป (48, 49, 52)



ภาพที่ 3: วิถีอะพอพโตซิส (apoptotic pathway)(50)

2.3 โพรไบโอติก

2.3.1. บทนิยาม

โพรไบโอติก คือ รูปแบบของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตชนิดหนึ่ง ซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอ จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของผู้เป็นเจ้าของ รวมถึงอาจให้ผลในการช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆได้ จุดเริ่มต้นของโพรไบโอติกมีมาตั้งแต่ช่วงต้นของศตวรรษที่ 20 โดย Elie Metchnikoff นักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซีย ได้ตั้งข้อสังเกต และทำการศึกษาค้นคว้า จนได้ข้อเสนอนี้ว่าประชากรชาวบัลแกเรียที่บริโภคนมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ต (yogurt) จะมีสุขภาพดี แข็งแรง และอายุยืนยาว ซึ่งสันนิษฐานว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวน่าจะประกอบไปด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ก่อประโยชน์ต่างๆแก่ร่างกาย เช่น ช่วยลดสารที่เป็นพิษจากอาหารและเชื้อก่อโรคบางชนิด ซึ่งจากการศึกษาภายหลังพบว่า จุลินทรีย์นั้นเป็นแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus bulgaricus* หลังจากนั้นต่อมาจึงมีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายคนได้ทำการศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ทั้งในด้านสายพันธุ์และคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก (18)

ในปัจจุบันโพรไบโอติกได้เข้ามามีบทบาทและนิยมแพร่หลายในทางการแพทย์ ซึ่งมีหลักฐานทางวิชาการมากมายสนับสนุนว่าโพรไบโอติกจะเข้าไปช่วยในการเพิ่มสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย และก่อให้เกิดประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย ดังนั้นการคัดเลือกและประเมินคุณสมบัติของจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกจึงมีความสำคัญ (53) คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกประกอบด้วย แบคทีเรียชนิดนั้นๆควรเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์อยู่แล้ว เพื่อจะได้สามารถปรับตัวและมีการแสดงออกถึงคุณสมบัติต่างๆได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่คุ้นเคย แบคทีเรียชนิดนั้นๆควรให้ประโยชน์และไม่ก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย มีความปลอดภัยตามหลักของ Generally recognized as safe status (GRAS) แบคทีเรียชนิดนั้นๆสามารถมีชีวิตรอดและมีคุณสมบัติทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดี (กรณีที่จะใช้ในระบบทางเดินอาหาร) แบคทีเรียชนิดนั้นๆสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ และเนื้อเยื่อต่างๆได้ดี แบคทีเรียชนิดนั้นๆมีฤทธิ์ยับยั้งหรือกำจัดเชื้อก่อโรค หรืออาจมีความสามารถในการปรับภูมิคุ้มกัน แบคทีเรียชนิดนั้นๆจะต้องสามารถถูกเพาะเลี้ยงหรือผลิตในระดับอุตสาหกรรม และสามารถมีชีวิตรอดในขั้นตอนกระบวนการผลิตและการวางจำหน่าย (17, 18, 54)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งรูปร่างกลมและรูปร่างแท่ง ชนิดที่สำคัญที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ ได้แก่ จีโนส *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่ง *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ถือเป็นจีโนสของแบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกมากที่สุดในระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการป้องกันโรคฟันผุ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Streptococcus* (19, 20, 55, 56)

2.3.2. Lactobacilli

แลคโตบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนเดี่ยว หรือท่อนต่อกันเป็นสายสั้น เป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายของมนุษย์ที่พบได้ในหลายบริเวณ เช่น ช่องปาก ช่องคลอด และลำไส้ เชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่หมักเฉพาะน้ำตาลแลคโตสและกลูโคส ซึ่งจะให้ผลเป็นกรดแลคติกเท่านั้น และกลุ่มที่หมักน้ำตาลได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส จะให้ผลผลิตได้หลายอย่าง เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก (acetic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) เอทานอล (ethanol) และโปรตีนจากแบคทีเรียหรือแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ผลผลิตเหล่านี้จะสามารถรบกวนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อยู่รอบข้างได้ (21, 57)

สำหรับแลคโตบาซิลไลสายพันธุ์ที่มีการนำมาศึกษาและนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii* โดยแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นิยมใช้ในปัจจุบัน แบคทีเรียชนิดนี้ถูกแยกออกมาจากตัวอย่างอุจจาระในผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีโดยนักวิทยาศาสตร์ 2 ท่าน คือ Sherwood Gorbach และ Barry Goldwin ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1985 (21, 54, 58)

2.3.3. กลไกการทำงานของโพรไบโอติก LGG

2.3.3.1. สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพชนิดอื่น

LGG สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคอื่นได้ เช่น เชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Salmonella* Typhimurium และ *Shigella sonnei* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสียและมีไข้ โดยโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี สามารถสร้างกรดแลคติกขึ้นมา และส่งผลให้สภาพแวดล้อมเป็นกรด จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้ (59, 60) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า LGG สามารถสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ (peptide) ขนาดเล็ก 2 ชนิด ได้แก่ NPSRQERR และ PDENK ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* EAEC 042, *Salmonella* Typhi และ *Staphylococcus aureus* (61)

2.3.3.2. ยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบางชนิด

LGG สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* บนเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric adenocarcinoma cell) ชนิด CRL-1739 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal adenocarcinoma) ชนิด Caco-2 ได้ถึง 60% และ 66% ตามลำดับ และยับยั้งการหลั่งสารสื่อการอักเสบชนิด IL-8 และ Prostaglandin E₂ (PGE₂) จากเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของแผลในกระเพาะอาหารและการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยในปัจจุบันเชื่อว่าความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวต่างๆของ LGG โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีโครงสร้างที่เรียกว่า SpaCBA pili ที่ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและใช้สำหรับยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวชนิดต่างๆ (54, 62) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่า LGG สามารถยับยั้งการยึดเกาะ การรุกรานเข้าสู่เนื้อเยื่อ และการสร้างสายไฮพี

(hyphae) ของเชื้อราชนิด *Candida albicans* บนเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากชนิด TR146 ได้อีกด้วย (63)

2.3.3.3. กระตุ้นและช่วยปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน

Rautava และคณะในปี ค.ศ. 2002 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของการจ่าย LGG ให้แก่ มารดาที่กำลังจะให้กำเนิดบุตร ในปริมาณ 2×10^{10} CFU/ml ต่อวัน ในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนคลอดจนถึง ช่วงระยะเวลาให้นมบุตร จากการศึกษาพบว่าในน้ำนมของมารดาที่ได้รับ LGG จะมีสารยับยั้งการ อักเสบชนิด Transforming growth factor-beta 2 (TGF- β 2) สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมี นัยสำคัญ และยังพบว่าทารกที่ได้ดื่มนมแม่ในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก LGG มีอัตราการเกิดโรคผื่น ภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic eczema) ลดลงในช่วงอายุ 2 ปีแรกอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับทารก ที่ได้ดื่มนมแม่ในกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (64) ในการศึกษาของ Ou และคณะในปี ค.ศ. 2012 ได้ศึกษาถึง ประสิทธิภาพของการจ่าย LGG ให้แก่หญิงตั้งครรภ์ที่เป็นโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (เมื่อตรวจสอบว่ามี ระดับของ IgE ต่อรอยโรคในเลือดมากกว่า 100 kU/L) โดยคณะผู้วิจัยได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับ LGG ในช่วงไตรมาสที่ 2 ของการตั้งครรภ์ และกลุ่มที่ได้รับยาหลอก ผล การศึกษาพบว่า มารดาในกลุ่มที่ได้รับ LGG มีสถานะความรุนแรงของโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนังลดลง เมื่อ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับของ IL-12p70 ที่เพิ่มขึ้นในเลือดของ กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก ซึ่ง IL-12p70 นั้นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพชนิด หนึ่ง (65, 66)

2.3.4. การใช้ LGG ในทางคลินิก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ช่วยปรับสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ซึ่งมีทั้ง จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และมีโทษอาศัยอยู่ ถ้าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มีมากเพียงพอจะช่วย ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ก่อโรคขึ้นได้เอง รวมถึงทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคมียุ่รอดใน ร่างกายน้อยลง เนื่องจากการที่โพรไบโอติกบางชนิดสามารถสร้างสารต้านจุลชีพมายับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ ดังกลไกที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติก LGG ที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 2.3.1 จึงมีการศึกษาเพื่อนำโพรไบโอติก ชนิดดังกล่าวมาใช้ในการ ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร และโรคติดเชื้อในช่องปาก (21, 54)

2.3.4.1. บทบาทของ LGG ในการต่อต้านการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

— ป้องกันและลดอาการท้องเสียจากการใช้ยาต้านจุลชีพ (Antibiotics-associated diarrhea)

Szajewska และคณะในปี ค.ศ. 2015 ได้ทำการศึกษาด้วยวิธีวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) ในการเปรียบเทียบผู้ป่วยเด็กจำนวน 445 คน ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งได้แบ่งกลุ่มคนไข้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับ LGG และกลุ่มที่ได้รับยาหลอก จากผลการวิเคราะห์พบว่า การได้รับ LGG ในปริมาณ 5×10^9 ถึง 40×10^9 CFU/ml ต่อวัน จะสามารถลดอุบัติการณ์การเกิดอาการท้องเสียจากการใช้ยาต้านจุลชีพจากร้อยละ 23 เหลือร้อยละ 9.6 (67) เช่นเดียวกับ Blaabjerg และคณะในปี ค.ศ. 2017 ได้ทำการศึกษาด้วยวิธีวิเคราะห์ห่อภิมาณในผู้ป่วยจำนวน 3,631 ราย ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่ากลุ่มที่ได้รับ LGG ในปริมาณมากกว่า 5×10^9 CFU/ml ต่อวัน จะมีอุบัติการณ์การเกิดอาการท้องเสียจากการใช้ยาต้านจุลชีพน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกชนิดดังกล่าวในปริมาณที่น้อยกว่า 5×10^9 CFU/ml ต่อวัน (68)

— ป้องกันและลดอาการลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome)

Francavilla และคณะในปี ค.ศ. 2010 ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัครที่มีอาการลำไส้แปรปรวนโดยให้กลุ่มตัวอย่างได้รับ LGG ในปริมาณเชื้อ 6×10^9 CFU/ml ต่อวัน เป็นเวลา 3 เดือน เทียบกับอาสาสมัครที่ได้รับยาหลอก พบว่าความรุนแรงและความถี่ของอาการ ได้แก่ อาการปวดท้อง ท้องอืด และแน่นท้องในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (69) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kajander และคณะในปี 2008 พบว่าอาสาสมัครที่มีอาการลำไส้แปรปรวนที่ได้รับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^7 CFU/ml ต่อวัน เป็นเวลา 5 เดือน มีความรุนแรงของอาการปวดท้องจากภาวะลำไส้แปรปรวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (70)

— บทบาทของ LGG ในการป้องกันโรคฟันผุและโรคเหงือกอักเสบ

Nase และคณะในปี ค.ศ. 2001 ได้ทำการศึกษาในกลุ่มคนไข้เด็กจำนวน 594 คนที่มีอายุตั้งแต่ 1 – 6 ปี โดยแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับนมที่ผสมแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี ในปริมาณ 5×10^9 ถึง 10×10^9 CFU/ml ต่อวัน เป็นเวลา 7 เดือน และกลุ่มที่ได้รับนมเพียงอย่างเดียว ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับนมที่ผสมโพรไบโอติกชนิดดังกล่าวมีอุบัติการณ์การเกิดฟันผุ

ที่ลดลง และมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุในน้ำลาย ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (71) Toiviainen และคณะในปี ค.ศ. 2015 ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี ซึ่งมีค่าอายุเฉลี่ย 24.6 ปี จำนวน 77 คน โดยแบ่งกลุ่มศึกษา ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับยาอมที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลเทียมที่ผสม LGG และ *Bifidobacterium animalis* ในปริมาณเชื้อ 4.4×10^8 และ 4.8×10^8 CFU/ml ต่อวัน ตามลำดับ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับยาอมที่ไม่ผสมโพรไบโอติก ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับยาอมผสม โพรไบโอติกมีอุบัติการณ์ของการเกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์บนเหงือก (plaque index) ที่ลดลง และ ลักษณะของเหงือกอักเสบ (gingival index) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (72) โดยทุกการศึกษาได้สรุปตรงกันว่าเชื้อ LGG เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (non-cariogenic bacteria) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล ซูโครสได้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* สปีชีส์อื่นๆ (54, 72)

2.3.5. การใช้ LGG ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

2.3.5.1. การใช้ LGG ที่มีชีวิตในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

— เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal carcinoma cells)

Orlando และคณะในปี ค.ศ. 2016 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของ LGG โดยใช้แบคทีเรียชนิดดังกล่าวที่มีชีวิตที่มีปริมาณของเชื้อ 1×10^8 CFU/ml มาทดสอบในเซลล์มะเร็ง ลำไส้ใหญ่ Caco-2, HT-29, SW480 และศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ LGG สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุม โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการใช้โพรไบโอติกร่วมกับ วิตามินเค 1 ความเข้มข้น 100 – 200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้สรุปว่าวิตามินเคน่าจะมี บทบาทในการเจริญเติบโตของ LGG นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสรุปว่าการใช้ LGG เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับวิตามินเคสามารถเพิ่มระดับ mRNA ของ Bax ต่อ Bcl-2 ในเซลล์มะเร็งได้อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า LGG มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้ เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (73)

Gamallat และคณะในปี ค.ศ. 2016 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของ LGG โดยได้แบ่งกลุ่มหนูทดลอง Sprague Dawley rat ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนูสุขภาพดี (กลุ่ม ควบคุม) กลุ่มหนูที่ได้รับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^9 CFU/ml ทางช่องปาก กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้ เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการฉีดสารเคมี Dimethyl hydrazine (DMH) ซึ่งหนูจะได้รับสารเคมีดังกล่าว โดยวิธีการฉีด อาทิตย์ละ 1 ครั้ง ในปริมาณสารเคมี 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และ

กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการฉีดสารเคมี DMH ร่วมกับการได้รับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^9 CFU/ml ทางช่องปาก ซึ่งใช้ระยะเวลาในการทำการทดลองเป็นเวลา 25 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการฉีดสารเคมี DMH ร่วมกับการได้รับ LGG มีอุบัติการณ์ จำนวนตำแหน่งที่เกิด และปริมาณของก้อนมะเร็งลำไส้ใหญ่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการฉีดสารเคมี DMH เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่ากลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการฉีดสารเคมี DMH ร่วมกับการได้รับ LGG มีระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน β -catenin, Bcl-2, COX-2, TNF-alpha ที่ลดลง และสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน Bax, caspase-3, p53 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการฉีดสารเคมี DMH เพียงอย่างเดียว ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า LGG มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และลดภาวะการอักเสบซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองได้ (74)

— เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

Seow และคณะในปี ค.ศ. 2010 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะของ LGG โดยได้แบ่งกลุ่มหนูทดลองเพศเมีย C57BL/6 ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและไม่ได้รับการรักษา (ได้รับการฉีดเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ MB49 เข้าที่ผนังกระเพาะปัสสาวะภายใต้การวางยาสลบ) กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและได้รับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^8 CFU/ml ทางช่องปาก กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและได้รับ LGG ที่ผ่านกระบวนการการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ในปริมาณเชื้อเท่ากัน และ กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและได้รับ LGG ทั้ง 2 วิธีที่ได้กล่าวมาแล้วรวมกัน โดยการให้ LGG กับหนูจะให้สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ LGG ทั้ง 3 รูปแบบ มีอัตราการหายจากโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่สูงกว่ากลุ่มหนูทดลองที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (พิจารณาจากตำแหน่งในการเกิดมะเร็ง และผลผลิต prostate-specific antigen ของเซลล์มะเร็งที่ลดลง) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่ากลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ LGG ทั้ง 3 รูปแบบนั้น มีการเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils และ macrophage เข้ามาในรอยโรคมะเร็งมากขึ้นกว่ากลุ่มหนูทดลองที่ไม่ได้รับการรักษา เมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อบริเวณรอยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของหนูออกมาดู ทางคณะผู้วิจัยจึงสรุปว่านอกจาก LGG จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะแล้ว ยังมีบทบาทในการช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองเพื่อต้านเซลล์มะเร็งอีกด้วย (75)

— เซลล์มะเร็งตับ

Behzadi และคณะในปี ค.ศ. 2017 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ ของ LGG โดยนำ extracellular vesicles ของของโพรไบโอติกชนิดดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาทดสอบในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่า การใช้ extracellular vesicles ของ LGG ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีประสิทธิภาพในการลดการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่า การใช้ extracellular vesicles ของ LGG ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ Bax ต่อ Bcl-2 mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทางคณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า extracellular vesicles ของ LGG มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ ซึ่งควรมีการศึกษาในรูปแบบสัตว์ทดลอง และการศึกษาทางคลินิกต่อไป (76)

— เซลล์มะเร็งช่องปาก

Cheng และคณะในปี ค.ศ. 2017 พบว่า การใช้ LGG ที่มีชีวิตในปริมาณเชื้อ 1×10^3 CFU/ml ร่วมกับสารเจนิโพลไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 25 หรือ 50 µg/ml ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่พบในดอกและผลของต้นพุดซ้อน *Gardenia jasminoides* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง OSCC ชนิด HSC-3 cells ได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้สารเจนิโพลไซด์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การใช้ LGG ร่วมกับสารเจนิโพลไซด์ยังสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน caspase -3, -8, -9, Bax, p53, p21 และลดระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ Bcl-2, Bcl-XL, NF- κ B, COX-2 และ iNOS เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้สารเจนิโพลไซด์เพียงอย่างเดียว คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า การใช้ LGG สามารถเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่สารเจนิโพลไซด์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง OSCC ชนิด HSC-3 cells ได้ โดยการเปลี่ยนให้สารเจนิโพลไซด์กลายเป็นสารเจนิพิน (genipin) ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งชนิดดังกล่าว (25)

2.3.5.2. การใช้ LGG CFS ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

— เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric adenocarcinoma cells)

Linsalata และคณะในปี ค.ศ. 2010 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารของ LGG โดยนำน้ำเลี้ยงส่วนใสของโพรไบโอติกชนิดดังกล่าวที่มีปริมาณของเชื้อ 1×10^8 CFU/ml มาทดสอบในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด HGC-27 และศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่า น้ำเลี้ยงส่วนใสของเชื้อ LGG สามารถลดระดับการแสดงออกของ ornithine

decarboxylase mRNA ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด HGC-27 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ ornithine decarboxylase จัดเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์พอลิเอมีน (polyamine) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติและการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงส่วนใสของเชื้อโพรไบโอติกในปริมาณที่เท่ากันนั้นยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด HGC-27 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (77)

— เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

Escamilla และคณะในปี ค.ศ. 2012 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของ LGG โดยนำน้ำเลี้ยงส่วนใสของโพรไบโอติกชนิดดังกล่าวที่มีปริมาณของเชื้อ 1×10^9 CFU/ml มาเจือจางจนได้ความเข้มข้น 25% โดยปริมาตร มาทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT-116 และศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าน้ำเลี้ยงส่วนใสของเชื้อ LGG สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การใช้น้ำเลี้ยงส่วนใสของเชื้อ LGG สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-9 และเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน zona occludens-1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (78)

2.3.6. ความปลอดภัยของการใช้ LGG

Scalabrini และคณะในปี ค.ศ. 2017 ได้ทำการศึกษาถึงความปลอดภัยของการใช้ LGG ในเด็กอายุ 1 ปี และติดตามผลการศึกษาไปจนถึงเด็กมีอายุ 5 ปี โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้อาสาสมัครเด็กจำนวน 289 คน ซึ่งคณะผู้วิจัยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเด็กที่ได้รับ Extensively hydrolyzed casein formula เพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) กลุ่มเด็กที่ได้รับ Extensively hydrolyzed casein formula ร่วมกับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^6 CFU/g และกลุ่มเด็กที่ได้รับ Partially hydrolyzed casein formula ร่วมกับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^6 CFU/g โดยคณะผู้วิจัยจะติดตามผลที่จะเกิดขึ้นกับอาสาสมัครในแง่ของการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก ความสูง และพฤติกรรมแสดงออกทางร่างกาย ทางภาษา และทางสังคม ผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มอาสาสมัครเด็กที่ได้รับ LGG มีการเจริญเติบโตทางร่างกาย พัฒนาการ และพฤติกรรมต่างๆที่ปกติ ไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของการใช้ LGG ในช่วงวัย 5 ปีแรกของเด็ก (79)

Hibberd และคณะในปี ค.ศ. 2014 ได้ทำการศึกษาถึงผลข้างเคียงของการใช้ LGG ในผู้สูงอายุที่มีช่วงอายุตั้งแต่ 66 – 80 ปี โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้อาสาสมัครผู้สูงอายุจำนวน 15 คน (ซึ่งได้ใช้เกณฑ์ในการคัดออกสำหรับบุคคลที่เป็นโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหอบหืด มีการติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus หรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น) โดยกลุ่มอาสาสมัครจะได้รับ LGG ในปริมาณเชื้อ 1×10^{10} CFU/g ในรูปแบบแคปซูล วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 28 วัน และทำการติดตามผลข้างเคียงไปจนถึงวันที่ 56 ของการทดลอง ผลการศึกษาพบว่า การได้รับ LGG อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารในระดับต่ำได้บ้าง เช่น การเกิดสภาวะท้องอืด การมีลมหรือก๊าซในทางเดินอาหาร การคลื่นไส้ เป็นต้น ซึ่งคณะผู้วิจัยได้สรุปผลการศึกษาว่า สามารถใช้ LGG ได้อย่างปลอดภัยในผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ภายใต้การพิจารณาโรคประจำตัวของผู้ป่วยร่วมกับแพทย์ (80)

2.4. เคอควมิน

2.4.1. ลักษณะทั่วไป

เคอควมิน หรือชื่อทางเคมีคือ 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenol)-1,6-heptadiene-3,5-dione เป็นสารในกลุ่มเคอควมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenolic compound) และเป็นสารสำคัญหลักที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* โดยทั่วไปเคอควมินอยด์ประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ เคอควมิน พบประมาณ 80% ขององค์ประกอบ ดีเมท็อกซีเคอควมิน (demethoxycurcumin) พบประมาณ 17% และบิสดีเมท็อกซีเคอควมิน (bis-demethoxycurcumin) พบประมาณ 3% ขององค์ประกอบ เคอควมินมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองส้ม ไม่ละลายในน้ำและอีเทอร์ (ether) แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซีโตน (acetone) เป็นต้น เคอควมินมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183 องศาเซลเซียส มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_6$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.37 g/mol เคอควมินสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลได้ 2 รูปแบบโดยขึ้นอยู่กับสถานะของตัวทำละลาย กล่าวคือโครงสร้างโมเลกุลสามารถเปลี่ยนจากรูปคีโต (keto form) ไปเป็นรูปเอนอล (enol form) และเกิดการผันกลับได้ โดยพบว่าในสารละลายที่มีสถานะเป็นกรดและเป็นกลาง เคอควมินจะอยู่ในรูปคีโต ในขณะที่เมื่อสารละลายเป็นเบส เคอควมินจะอยู่ในรูปของเอนอล (81, 82, 83)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของเคอควิมิน โดยพบว่าเคอควิมินมีฤทธิ์ที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง เป็นต้น และสำหรับการทดสอบในแง่ของความปลอดภัยของการใช้เคอควิมินในมนุษย์ พบว่าการบริโภคเคอควิมินในปริมาณสูง (12 กรัมต่อวัน) ยังมีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (30, 81, 82)

2.4.2. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอควิมิน

2.4.2.1. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

— ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Niamsa และคณะในปี ค.ศ. 2009 พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเคอควิมินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration หรือค่า MIC และ MBC) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางคลินิก *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, และ *Escherichia coli* อยู่ที่ 4 – 16 g/l และ 16 – 32 g/l ตามลำดับ ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* มักจะทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีการสอดใส่อุปกรณ์ทางการแพทย์ เชื้อ *S. aureus* มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดฝีและหนองตามผิวหนังของร่างกาย เป็นต้น (84)

หลากหลายการศึกษาพบว่าค่า MIC ของเคอควิมินต่อเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร รวมถึงอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร อยู่ที่ 5 – 50 µg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการสร้าง NF-**KB**, IL-8, MMP-3 และ MMP-9 ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งล้วนเป็นสารสื่อการอักเสบสำคัญที่ทำให้สภาวะของแผลในกระเพาะอาหารมีการอักเสบที่รุนแรงขึ้น (85, 86, 87)

— ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส

Chen และคณะในปี ค.ศ. 2010 พบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) ได้หลากหลายสายพันธุ์ เช่น PR8, H1N1 และ H6N1 โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 90% (MIC₉₀) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อยู่ที่ 30 µM ซึ่งเคอควิมินมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งแอนติเจน haemagglutinin บนเปลือกผิวของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งจะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์มนุษย์เพื่อเข้าสู่ร่างกายและก่อโรคต่อไป (88)

นอกจากนี้ยังพบว่าเคอควิมินยังสามารถยับยั้งการสร้าง mRNA และโปรตีนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงหลากหลายชนิด เช่น ยับยั้งการสร้าง HbsAg mRNA และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p53 ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus) ยังยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีนของเชื้อ Coxsackievirus ซึ่งก่อโรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ เป็นต้น (89, 90)

— ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

เคอควิมินที่ความเข้มข้น 500 – 1000 mg/L มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด เช่น *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe graminis* เป็นต้น (91)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษารายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Candida* spp. ทั้งในกลุ่มทั่วไปและกลุ่มที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อรา ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มักก่อโรคในบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกที่มีความชื้นสูงๆ เช่น ช่องปาก ช่องคลอด ขาหนีบ เป็นต้น โดย Khan และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 พบว่าเคอควิมินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Candida* spp. ได้ถึง 38 สายพันธุ์ เช่น *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* เป็นต้น รวมถึงกลุ่มเชื้อรา *Candida* ที่ดื้อต่อยา fluconazole โดยพบว่าค่า MIC₉₀ ต่อเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวอยู่ที่ความเข้มข้น 250 – 600 µg/ml โดยพบว่าเคอควิมินทำให้ proton pump เชื้อราในกลุ่ม *Candida* ทำงานผิดปกติไป ทำให้เชื้อ *Candida* ไม่สามารถขับกรดออกจากเซลล์ได้ นำไปสู่การหยุดการเจริญเติบโตหรือการตายของเชื้อราในกลุ่ม *Candida* (92)

2.4.2.2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุลสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยามาก เช่น สามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อทำให้เกิดความเสถียรของโมเลกุล ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ อนุพันธ์ของ oxygen radical เช่น superoxide radical, hydroxyl radical เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้เข้าทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกายมนุษย์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ (โดยทำให้เกิดการเสื่อมสลายของชั้นไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเรียกว่ากระบวนการ lipid

peroxidation) โปรตีน เอนไซม์ และดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการบาดเจ็บหรือการกลายพันธุ์ของเซลล์ หรืออาจนำไปสู่การก่อโรคบางอย่าง เช่น โรคชรา (aging) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) เป็นต้น นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดจากสาเหตุอื่นๆได้อีก เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย การได้รับรังสีเอ็กซ์ การได้รับมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ และแก๊สไนโตรซอกไซด์จากท่อไอเสีย การได้รับยาบางชนิด (93)

โดยปกติแล้วร่างกายมีกลไกในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระอยู่ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนแรกคือการที่ร่างกายสามารถสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) และควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้สมดุล เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione เป็นต้น ส่วนที่สองคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากอาหาร ซึ่งได้แก่ สารเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ซึ่งพบผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง อาหารที่มีวิตามินซีสูง ซึ่งพบในผักใบเขียวและผลไม้รสเปรี้ยว อาหารที่มีวิตามินอีสูง ซึ่งพบในธัญพืชหลากหลายชนิด รวมถึงสารกลุ่มพอลิฟีนอล เช่น เคอควิมิน ที่สามารถพบได้ในเหง้าของขมิ้นชัน (93)

มีการศึกษาจำนวนมากได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งกระบวนการอักเสบของเซลล์ เช่น เคอควิมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบหลายชนิด เช่น phospholipase A2, cyclooxygenase-2 (COX-2), 5-lipoxygenase (5-LOX), inducible nitric oxide synthase (iNOS) และยับยั้งการสร้างสารสื่ออักเสบได้หลายชนิด เช่น prostaglandins, tumor necrosis factor alpha เป็นต้น นอกจากนี้ Karimian และคณะ ในปี ค.ศ. 2019 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยการลดการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, P-selectin ซึ่งทำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocyte) ออกนอกหลอดเลือดลดลง และทำให้กระบวนการอักเสบเกิดลดลง และเคอควิมินยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของสารยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด heme oxygenase-1 อีกด้วย (93, 94)

2.4.2.3. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

— เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

เคอควิมินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเพาะเลี้ยง โดยยับยั้งกระบวนการ mitogen-activated protein kinase (MAPK), epidermal growth factor receptor (EGFR) และ NF- κ B ซึ่งกระบวนการเหล่านี้

มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก Sundram และคณะในปี ค.ศ. 2011 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการกระตุ้นโปรตีน protein kinase D1 (PKD1) ซึ่งเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีน β -catenin และนำไปสู่การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (95, 96, 97, 98)

— เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

Mudduluru และคณะในปี ค.ศ. 2011 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอควิมินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Rko และ HCT-116 โดยพบว่าเคอควิมินสามารถลดระดับการแสดงออกของ activator protein-1 (AP-1) และ microRNA-21 และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ programmed cell death protein 4 (Pcdcd4) ซึ่งทำให้วัฏจักรของเซลล์มะเร็งหยุดอยู่ที่ระยะ G2/M และทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หยุดการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโต (99)

Su และคณะในปี ค.ศ. 2006 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอควิมินต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ colo 205 โดยพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้นเมื่อใช้เวลาและความเข้มข้นของเคอควิมินที่เพิ่มมากขึ้น โดยคณะผู้วิจัยได้เสนอว่าเคอควิมินเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน และการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนในเซลล์มะเร็ง และนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ caspase-3 และการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสในที่สุด นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าเคอควิมินเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน Bax, cytochrome C, p53, p21 ที่เพิ่มมากขึ้น และลดระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อีกด้วย (100)

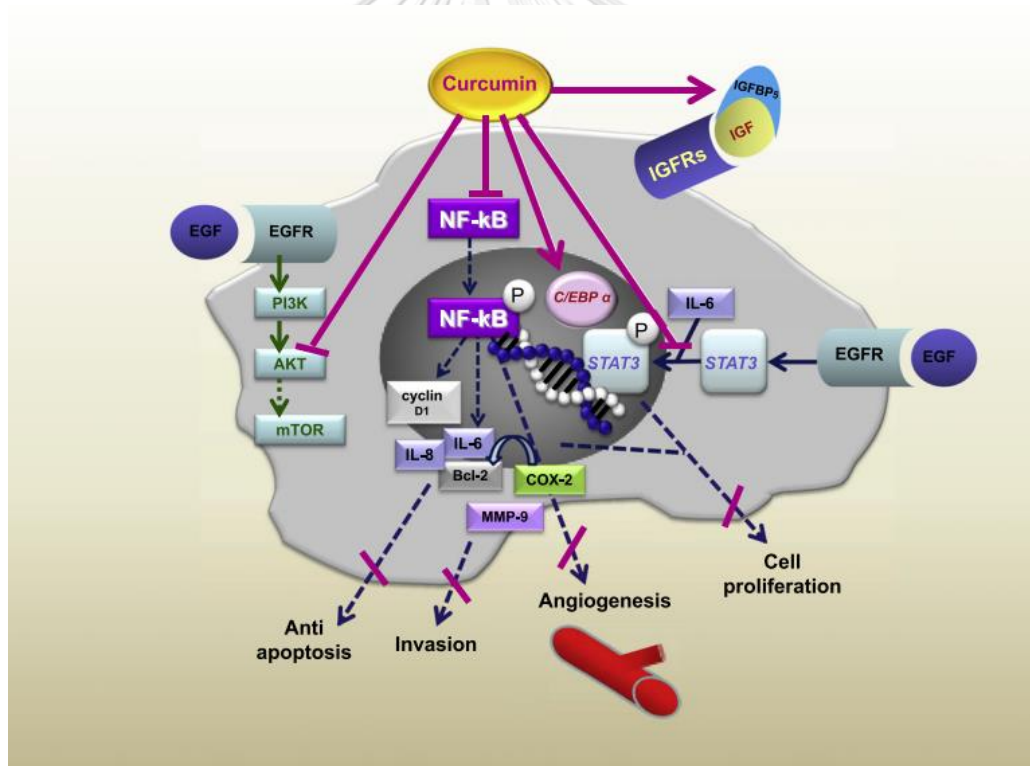
— เซลล์มะเร็งเต้านม

Hu และคณะในปี ค.ศ. 2018 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมหลายชนิด ได้แก่ T47D, MCF7, MDA-MB-231 และ MDA-MB-468 โดยมีผลของค่า MIC_{50} ของเคอควิมินที่แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยทางคณะผู้วิจัยได้รายงานว่าเคอควิมินสามารถเหนี่ยวนำให้วัฏจักรของเซลล์มะเร็งหยุดอยู่ที่ระยะ G2/M เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p21, Bax และ caspase-3 และลดระดับการแสดงออกของโปรตีน phosphorylation of protein kinase B (p-AKT), phosphorylation of mammalian target of

rapamycin (p-mTOR) และ Bcl-2 ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านม (101)

— เซลล์มะเร็งช่องปาก

Zlotogorski และคณะในปี ค.ศ. 2013 ได้รายงานถึงผลของเคอควินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ผ่านกลไกหลัก 2 กลไก ได้แก่ กลไกที่ 1 เคอควินสามารถยับยั้งกระบวนการ NF- κ B และโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ cyclin D1, Bcl-2, IL-6, IL-8, MMP-9 และ COX-2 กลไกที่ 2 เคอควินสามารถยับยั้งกระบวนการ Epithelial growth factor receptors (EGFRs) ผ่านการยับยั้งโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง STAT3 และ AKT ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีการเพิ่มจำนวนลดลง และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งชนิด OSCC ดังสรุปที่ภาพที่ 4 (102)



ภาพที่ 4: กลไกของเคอควินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (102)

กลไกเคอควินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ผ่านการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

Abdolahinia ED และคณะในปี ค.ศ. 2022 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HN5 นอกจากนี้คณะผู้เขียนได้รายงานว่าเคอควิน

สามารถลดระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Bcl-2, Stat 3 เพิ่มระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน caspase-9 และอัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (103)

Ma และคณะในปี ค.ศ. 2020 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด Cal-27 นอกจากนี้คณะผู้เขียนได้รายงานว่าเคอควิมินสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน Bax และ caspase-3 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (104)

Lin และคณะในปี ค.ศ. 2017 ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ของเคอควิมินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (CAL-27 cells) และพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเคอควิมิน และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยา cisplatin และยังพบว่าเคอควิมินสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase 3 และ caspase 9 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็ง และลดระดับการแสดงออกของโปรตีน p-MEK และ p-ERK ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง(105)

กลไกอื่นๆของเคอควิมินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC

Lee และคณะในปี ค.ศ. 2015 ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-25 cells) โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อได้ปริมาณความเข้มข้นของเคอควิมินที่มากขึ้น โดยทางคณะผู้วิจัยได้รายงานว่าเคอควิมินสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2, MMP-9, snail, twist ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการเคลื่อนที่และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และเคอควิมินสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน p53 และ E-cadherin ซึ่งมีความสำคัญในการยับยั้งกระบวนการ EMT ของเซลล์มะเร็ง (106)

Zhen และคณะในปี ค.ศ. 2014 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอควิมินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-25 cells) และพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งช่องปากและกระตุ้นให้วัฏจักรของเซลล์มะเร็งหยุดอยู่

ที่ระยะ G2/M โดยคณะผู้วิจัยได้พบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยการลดระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน MMP-2, MMP-9 และลดระดับการแสดงออกของโปรตีน phosphorylated epidermal growth factor receptor (p-EGFR), p-AKT, p-ERK1/2 และ p-STAT3 ในเซลล์มะเร็ง (107)

Shin และคณะในปี ค.ศ. 2010 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอควิมินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (YD-10B cells) และพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเคอควิมิน (ค่า MIC_{50} ของเซลล์มะเร็งอยู่ที่ $8.37 \mu M$) โดยคณะผู้วิจัยพบว่าเคอควิมินสามารถลดระดับการแสดงออกของ mRNA และเอนไซม์ MMP-2, MMP-9, p-ERK และ NF- κ B ซึ่งมีความสำคัญต่อกลไกการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (108)

de Campos และคณะในปี ค.ศ. 2017 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอควิมินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-25 cells) และพบว่าเคอควิมินที่ความเข้มข้น $2 \mu M$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าความเข้มข้นของเคอควิมินที่ 2 และ $5 \mu M$ สามารถลดความเร็วในการเคลื่อนที่ (migration speed) ของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าการฉีดเคอควิมินที่ความเข้มข้น $70 mg/kg$ ให้กับหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งช่องปากชนิด OSCC มีประสิทธิภาพในการลดขนาดของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดเคอควิมิน (109)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ เซลล์เพาะเลี้ยงและเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

- เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-9 cells) เซลล์เนื้อเยื่อเหงือก Human gingival fibroblasts (HGF, PCS-201-018 cells) และเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 53103 สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา
- อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) ผสมกับ Ham's F12 medium (1:1, DMF12) อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) Fetal bovine serum (FBS) ยาปฏิชีวนะ penicillin 100 units/ml และ streptomycin 100 µl/ml 1X Phosphate-buffered saline (PBS) 0.5% trypsin EDTA และสี trypan blue สั่งซื้อจากบริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เคอควิมิน สาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารย้อมโปรตีน Coomassie Plus (Bradford) assay kit สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี
- อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar สั่งซื้อจากบริษัท Becton ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ชุดน้ำยา 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) สั่งซื้อจากบริษัท Elabscience Biotechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ชุดน้ำยา Annexin V-FITC apoptosis staining assay สั่งซื้อจากบริษัท BioLegend ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ชุดน้ำยาสำหรับสกัด RNA RNeasy Plus Mini Kit สั่งซื้อจากบริษัท Qiagen ประเทศเยอรมนี
- ชุดน้ำยาสำหรับการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA Maxime RT Premix Kit สั่งซื้อจากบริษัท Biotech จำกัด ประเทศเกาหลี

— ชุดน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย iTaq universal SYBR green supermix และชุดน้ำยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ apoptotic and anti-apoptotic protein Bio-Plex Pro RBM apoptosis assays panel 3 สั่งซื้อจากบริษัท BioRad Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2. เครื่องมือ

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก และเครื่องเขย่าผสมสาร ยี่ห้อ Labnet จากบริษัท Labnet international จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง ยี่ห้อ Eppendorf จากบริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศเยอรมนี
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) ยี่ห้อ Synergy H1 จากบริษัท BioTek Instruments จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Flow Cytometer สำหรับปฏิกิริยา Flow cytometry ยี่ห้อ CytoFLEX S จากบริษัท Beckman Coulter จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Thermo cycler สำหรับปฏิกิริยา PCR ยี่ห้อ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System จากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Bio-Plex Pro Wash Station และเครื่อง Bio-Plex 200 Array Reader จากบริษัท BioRad Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) ยี่ห้อ TripleTOF 6600+ จากบริษัท Sciex จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3. วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงและนับจำนวนเซลล์

— วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

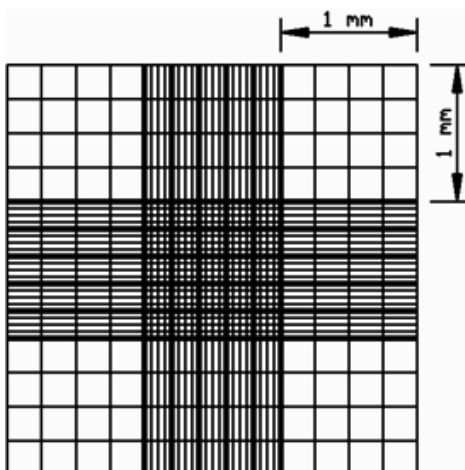
เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบไปด้วย เซลล์ HGF ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติ และเซลล์ SCC-9 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด OSCC เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดนี้แยกกันในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm³ สำหรับเซลล์ HGF ถูกเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin sulfate สำหรับเซลล์ SCC-9 ถูก

เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMF12 ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin sulfate เซลล์ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นประมาณ 80 – 90% ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และล้างด้วย 1X PBS ปริมาณ 4 ml จำนวน 1 ครั้ง เท PBS ออก เติม 0.5% trypsin EDTA ปริมาณ 1.5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% นาน 3 นาที เมื่อครบเวลานำขวดมาเคาะเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ml และปิเปตชะล้างขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ทั่ว เพื่อให้เซลล์หลุดจากขวดทั้งหมด ย้ายเซลล์ลงในหลอดขนาด 15 ml นำเซลล์ไปปั่นด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี trypsin ผสมอยู่ออกจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปจำนวน 2 – 4 ml ปิเปตขึ้นลงประมาณ 30 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นนำเซลล์ไปนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

– การนับจำนวนเซลล์

ดูดเซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาผสมกับสี trypan blue ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้นาน 1 นาที ใช้ปิเปตดูดเซลล์ที่ผสมกับสีแล้วมาเติมลงบน hemocytometer counting chamber ทั้ง 2 ข้างจนเต็ม ทำการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินซึ่งเป็นเซลล์ที่มีชีวิตจากตารางรวมทั้งหมด 5 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 4 ทำการคำนวณปริมาณเซลล์ตามสูตรด้านล่าง

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} \times \text{ค่าเจือจางในสี trypan blue} \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับ}}$$



ภาพที่ 5: ช่อง A, B, C, D และ E บน hemacytometer counting chamber ที่ใช้ทำการนับเซลล์ (รูปอ้างอิงจาก <https://www.microbehunter.com/the-hemacytometer-counting-chamber/>) (110)

3.3.2 การเตรียมสารละลายเคอควิมิน

ละลายเคอควิมินใน DMSO โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml ทำให้สารละลายเคอควิมินปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านฟิลเตอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 μm เก็บสารละลายเคอควิมินที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ LGG และการเตรียมน้ำเลี้ยงส่วนใสของเชื้อ LGG (LGG CFS)

นำเชื้อแบคทีเรีย LGG สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 53103 เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacilli MRS Agar และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำโคลนิจของเชื้อแบคทีเรียละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacilli MRS broth และป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงทำการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสง (optical density, OD) เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ปรับค่า OD ให้มีค่าเท่ากับ 2.0 โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 600 nm ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย 10^8 CFU/ml เมื่อใช้การนับด้วยวิธี plate count (เรียกว่าความเข้มข้นเริ่มต้น หรือ undiluted condition) จากนั้นจึงทำการเจือจางสารละลายเชื้อด้วย Lactobacilli MRS broth ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่าเป็นความเข้มข้น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 เท่า จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น นำสารละลายเชื้อทั้งหมด

(ความเข้มข้นเริ่มต้น, ความเข้มข้น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 เท่า จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น) มาปั่นตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 1,100 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และดูเอาแต่ส่วนน้ำใส ซึ่งคือ LGG CFS ทำการวัดปริมาณโปรตีนใน LGG CFS ด้วย Bradford assay kit เพื่อควบคุมคุณภาพของ LGG CFS ในแต่ละรอบของการเตรียม ซึ่งปริมาณของโปรตีนที่วัดได้ใน LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000 1:100 1:10 เท่า จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และความเข้มข้นเริ่มต้น ได้แก่ 166.5±2.4, 167.4±3.6, 167.5±2.8, 154.5±3.6, and 151.5±2.4 µg/ml ตามลำดับ จากนั้นจึงเตรียม LGG CFS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร (25% v/v LGG CFS) โดยอ้างอิงตามการศึกษาของ Escamilla และคณะในปี ค.ศ. 2012⁷⁸ นำ LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000 1:100 1:10 เท่า จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และความเข้มข้นเริ่มต้น มาเจือจางกับอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่เติม FBS ให้ได้ความเข้มข้น 25% (volume/volume) ทำการปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.3 โดยใช้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1N และทำให้ 25% (v/v) LGG CFS ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านฟิลเตอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 µm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.3.4 การทดสอบเคอควินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 ใส่ใน 96 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม เติม DMEM ที่ผสม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin/streptomycin sulfate ลงในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง ดูเคอควินที่เตรียมจากขั้นตอนข้อ 3.2 ใส่ในแต่ละหลุม ปรับความเข้มข้นสุดท้ายให้เป็น 0, 5, 10, 20, 40, และ 80 µg/ml ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยให้ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 µl เตรียมหลุมควบคุม ได้แก่ เซลล์ SCC-9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl ซึ่งมีส่วนผสมของ DMSO ความเข้มข้น 0.08% ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมน้ำยา MTT dye ที่ละลายใน DMEM

ปริมาตร 150 μL ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีदनาน 4 ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 150 μL แล้วจึงนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องอ่าน microplate ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในหลุมทดลอง คำนวณเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมควบคุมตามสูตรด้านล่าง โดยปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่แปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละการทดสอบ และทำ 3 การทดสอบในระยะเวลาที่แตกต่างกัน นำมาหาค่าเฉลี่ย เลือกความเข้มข้นของเคอควินที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 5% (หรือเรียกในที่นี้ว่า curcumin-low (curcumin-L)) และ 50% (หรือเรียกในที่นี้ว่า curcumin-high (curcumin-H)) มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (\% cell viability)} = \frac{\text{OD ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละหลุมทดลอง} \times 100}{\text{OD ของเซลล์ทั้งหมดในหลุมควบคุม}}$$

3.3.5 การทดสอบ LGG CFS ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 ใส่ใน 96 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม เติม DMEM ที่ผสม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin/streptomycin sulfate ลงในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง ดูด 25% (v/v) LGG CFS ความเข้มข้น $10^5 - 10^8$ CFU/ml ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 μL เตรียมหลุมควบคุม ได้แก่ เซลล์ SCC-9 ที่เพาะเลี้ยงใน 25% v/v MRS broth ปริมาตร 100 μL ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมน้ำยา MTT dye ที่ละลายใน DMEM ปริมาตร 150 μL ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีदनาน 4 ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 150 μL แล้วจึงนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องอ่าน microplate ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในหลุมทดลอง คำนวณเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมควบคุมตามสูตรด้านล่าง โดยปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่แปรผันตรง

กับค่าการดูดกลืนแสง ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละการทดสอบ และทำ 3 การทดสอบในระยะเวลาที่ต่างกั น นำมาหาค่าเฉลี่ย เลือกความเข้มข้นของ LGG CFS ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 5% (หรือเรียกในที่นี่ว่า LGG CFS-low (LGG CFS-L)) และ 50% (หรือเรียกในที่นี่ว่า LGG CFS-high (LGG CFS-H)) ไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (\% cell viability)} = \frac{\text{OD ของเซลล์ที่ยังชีวิตอยู่ในแต่ละหลุมทดลอง} \times 100}{\text{OD ของเซลล์ทั้งหมดในหลุมควบคุม}}$$

3.3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ร่วมกับเคอคิวมินและ LGG CFS

เพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 ใส่ใน 96 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม เติม DMEM ที่ผสม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin/streptomycin sulfate ลงในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมเคอคิวมินหรือ LGG CFS หรือสารผสมในสัดส่วนต่างๆ ลงในแต่ละหลุม ดังแสดงในตารางที่ 1 ปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ให้เป็น 100 μl เตรียมหลุมควบคุมในการทดสอบกับเซลล์ SCC-9 ได้แก่ เซลล์ SCC-9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μl เพียงอย่างเดียว

ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ได้แก่ เซลล์ HGF โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ HGF ใส่ใน 96 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม เติม DMEM ที่ผสม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin/streptomycin sulfate ลงในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมเคอคิวมินหรือ LGG CFS หรือสารผสมในสัดส่วนต่างๆ เช่นเดียวกับที่ทดลองในเซลล์ SCC-9 ลงในแต่ละหลุม ดังแสดงในตารางที่ 1 ปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ให้เป็น 100 μl เตรียมหลุมควบคุมในการทดสอบกับ

เซลล์ HGF ได้แก่ เซลล์ HGF ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μ l เพียง
 อย่างเดียว

รายละเอียดของหลุมทดสอบต่าง ๆ ถูกสรุปในตารางที่ 1 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา
 เซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น
 ทำการล้างเซลล์ด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำเซลล์ไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 และ HGF ร่วมกับเคอควินินและ LGG CFS

หลุมที่	การทดลอง
1	SCC-9 + curcumin-L
2	SCC-9 + curcumin-H
3	SCC-9 + LGG CFS-L
4	SCC-9 + LGG CFS-H
5	SCC-9 + curcumin-L + LGG CFS-L
6	SCC-9 + curcumin-L + LGG CFS-H
7	SCC-9 + curcumin-H + LGG CFS-L
8	SCC-9 + curcumin-H + LGG CFS-H
9 (หลุมควบคุม)	SCC-9 + DMEM/FBS
10	HGF + curcumin-L
11	HGF + curcumin-H
12	HGF + LGG CFS-L
13	HGF + LGG CFS-H
14	HGF + curcumin-L + LGG CFS-L
15	HGF + curcumin-L + LGG CFS-H
16	HGF + curcumin-H + LGG CFS-L
17	HGF + curcumin-H + LGG CFS-H
18 (หลุมควบคุม)	HGF + DMEM/FBS

SCC-9: เซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสควมเซลล์ คาร์ซิโนมา SCC-9, HGF: เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เหงือกของมนุษย์, curcumin-L: curcumin low dose, curcumin-H: curcumin high dose, LGG CFS-L: *Lactobacillus rhamnosus* GG cell free supernatant low dose, LGG CFS-H: *Lactobacillus rhamnosus* GG cell free supernatant high dose, DMEM: อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS: Fetal bovine serum

3.3.7 การทดสอบเคอควินร่วมกับ LGG CFS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของ

เซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF cells โดยเทคนิค MTT assay

นำเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในขั้นตอนข้อที่ 3.3.6 ที่ผ่านการล้างเซลล์ด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง มาเติมน้ำยา MTT dye ที่ละลายใน DMEM ปริมาตร 150 μ L ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีดนาน 4 ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 150 μ L แล้วจึงนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องอ่าน microplate ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในหลุมทดลอง คำนวณเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมควบคุมตามสูตรด้านล่าง โดยปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่แปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละการทดสอบ และทำ 3 การทดสอบในระยะเวลาที่แตกต่างกัน นำมาหาค่าเฉลี่ย

ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) = $\frac{\text{OD ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละหลุมทดลอง}}{\text{OD ของเซลล์ทั้งหมดในหลุมควบคุม}} \times 100$

OD ของเซลล์ทั้งหมดในหลุมควบคุม

เลือกสภาวะการใช้สารเดี่ยว (เคอควิน หรือ LGG CFS) และสภาวะการใช้สารผสมที่เหมาะสมซึ่งสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SCC-9 ได้ 50% และคงสภาพการมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกได้มากกว่า 50% มาทำการทดสอบต่อในขั้นถัดไป

3.3.8 การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF cells โดยเทคนิค Flow cytometry

เพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF แยกกันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมใน 6 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา

24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมเคอควิมินหรือ LGG CFS โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมมาจากการทดลองในข้อ 3.3.7 โดยมีหลุมควบคุมได้แก่ เซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/FBS ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าที่ใส่ร่วมกับสารทดสอบชนิดต่างๆออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง ทำให้เซลล์หลุดออกจาก 6 well-microtiter plate โดยการเติม Trypsin/EDTA เมื่อเซลล์หลุดจึงทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม DMEM นำสารละลายเซลล์ที่ได้ใส่ใน flow cytometry tube จากนั้นจึงนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 500 x g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เท DMEM และ Trypsin/EDTA ทิ้ง ล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นเติม Annexin V binding buffer ปริมาตร 100 μ l และเติมสีย้อม FITC Annexin V และ Propidium Iodide ที่ปริมาตร 3 และ 6 μ l ตามลำดับ บ่มสีย้อมร่วมกับเซลล์ไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม Annexin V binding buffer ปริมาตร 400 μ l นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง CytoFLEX S Flow Cytometer โดยทำการทดสอบผล 3 ครั้งในเวลาแตกต่างกัน

3.3.9 การศึกษาการแสดงออกของยีน *Bax* และ *Bcl-2* โดยเทคนิค Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

เพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF แยกกันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมใน 6 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมเคอควิมินหรือ LGG CFS โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมมาจากการทดลองในข้อ 3.3.7 โดยมีหลุมควบคุมได้แก่ เซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/FBS ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าที่ใส่ร่วมกับสารทดสอบชนิดต่างๆออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง ทำการสกัด Total RNA ด้วยชุดน้ำยา RNeasy Plus Mini Kit ตามขั้นตอนดังนี้ ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมบัฟเฟอร์ RLT จากนั้นจึงกำจัด gDNA ออก โดยการนำมาปั่นเหวี่ยงผ่าน gDNA eliminator spin column เติมเอทานอลลงในสารละลายเซลล์ และนำไปใส่ใน

Rneasy spin column ทำการล้าง column โดยการเติมบัฟเฟอร์ RW1 และ บัฟเฟอร์ RPE ตามลำดับ ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge จน column แห้ง ทำการชะ Total RNA ออกจาก column โดยการเติม RNase-free water ปริมาตร 30 μ L และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge จะได้ Total RNA ออกมา นำ RNA ที่ได้ (ปริมาณ 1 μ g) ไปทำการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) โดยใช้ Maxime RT Premix kit ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต วัดปริมาณ cDNA ด้วยเครื่อง Nanodrop™ 100 spectrophotometer เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

นำ cDNA ที่สกัดได้ไปทำ real-time PCR โดยใช้ primer จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *bax* และ *bcl-2* ดังแสดงในตารางที่ 2 และใช้ β -actin เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง แต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตร 10 μ L ซึ่งประกอบไปด้วย น้ำยา 2x iTaq Universal SYBR-Green SuperMix (5 units/ μ L) ปริมาตร 5 μ L forward และ reverse primer ความเข้มข้น 500 nM ปริมาตรอย่างละ 0.5 μ L cDNA ปริมาณ 0.1 μ g และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2 μ L โดยมีหลอดควบคุมลบคือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา real-time PCR ภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาตามที่แสดงในตารางที่ 3 การแสดงออกของยีน *bax* และ *bcl-2* ถูกประเมินผลด้วย QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System Software โดยปรับค่า (normalization) กับค่าการแสดงออกของยีน β -actin (relative mRNA amount normalized to β -actin gene expression) แต่ละตัวอย่างทำ 3 การทดสอบ แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยจะแสดงผลการทดลองในรูปแบบของอัตราส่วนของ Bax ต่อ Bcl-2 (Bax/Bcl-2 ratio)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primer สำหรับปฏิกิริยา real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษา (111)

Primer	Primer sequence (5' to 3')
Bax	F: CCA GCT CTG AGC AGA TCA TG
	R: TGC TGG CAA AGT AGA AAA GG
Bcl-2	F: GAC TTC GCC GAG ATG TCC AG
	R: CAG GTG CCG GTT CAG GTA CT
β-actin	F: GAC TAC CTC ATG AAG ATC CT
	R: GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC

ตารางที่ 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และเวลา	จำนวนรอบ
Pre-heat	95°C, 3 min	1
Denature	95°C, 30 second	40
Annealing	55°C, 30 second	
Extension	72°C, 30 second	

3.3.10 การศึกษาการแสดงออกของ Apoptotic protein (caspase-3) และ Anti-apoptotic protein (Bcl-xL/Bak และ Mcl-1/Bak)

ใช้ชุดทดสอบ Apoptotic and Anti-apoptotic protein Bio-Plex Pro RBM apoptosis assays panel 3 โดยดำเนินขั้นตอนตามคำแนะนำของผู้ผลิต เพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF แยกกันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมใน 6 well-microtiter plate (ชนิดกันแบน) โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมเคอควิมินหรือ LGG CFS โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมมาจากการทดลองในข้อ 3.3.7 โดยมีหลุมควบคุมได้แก่ เซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/FBS ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าที่

ใส่ร่วมกับสารทดสอบชนิดต่างๆออกและล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย Lysate dilution buffer ที่ผสมกับ Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) protease inhibitor นำสารละลายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 30 μ l มาผสมกับ blocking buffer ปริมาตร 10 μ l และ capture beads ปริมาตร 10 μ l ใน 96 well-microtiter plate เขย่าสารต่างๆให้ผสมเข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 850 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำ 96 well-microtiter plate มาล้างด้วย 1x assay buffer โดยใช้ Bio-Plex Pro Wash Station และเติม detection antibodies ลงไปในแต่ละหลุม หลุมละ 40 μ l เขย่าสารต่างๆให้ผสมเข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 850 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม streptavidin-phycoerythrin ลงไปหลุมละ 20 μ l เขย่าสารต่างๆให้ผสมเข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 850 rpm เป็นเวลา 30 นาที จะได้ bead-conjugated samples จากนั้นนำ 96 well-microtiter plate มาล้างด้วย 1x assay buffer โดยใช้ Bio-Plex Pro Wash Station อีกครั้ง การแสดงออกของโปรตีน caspase-3, Bcl-xL/Bak และ Mcl-1/Bak ถูกประเมินผลด้วย Bio-Plex Manager Software Version 6.0 แต่ละตัวอย่างทำการทดสอบซ้ำเป็น 3 หลุม ก่อนนำมาหาค่าเฉลี่ย ผลที่แสดงคือค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนที่พบ (observed concentration) มีหน่วยเป็น ng/ml

3.3.11 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LGG CFS ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)

LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร 10 ml และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด MRS ปริมาตร 10 ml ถูกส่งไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวภาพที่สถาบันชีววิทยาโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS, TripleTOF 6600+ (บริษัท Sciex, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ใช้การวิเคราะห์ด้วย nano-LC โดยใช้คอลัมน์ (Column) ชนิด C18 ขนาด 2.1x50 mm เปปไทด์ (peptide) จะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 ml/min และใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด ชนิดที่ 1 คือ กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 0.1% (v/v) ในน้ำ ชนิดที่ 2 คือ กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 0.05% (v/v) ในอะซิโตนไตรีล โดยปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการฉีดคือ 5 μ l ในส่วนของ MS ทำการวิเคราะห์ใน positive mode และตั้งโหมด MS/MS แบบอัตโนมัติ โดยวิเคราะห์ที่ค่ามวลต่อประจุ ตั้งแต่ 100 ถึง 1,250 ผลที่ได้จาก LC-MS/MS ถูกนำไปประมวลผลต่อโดยใช้โปรแกรม SWATH Acquisition and

OneOmics™ system และนำผลที่ได้ไปทำการสืบค้นกับฐานข้อมูลผ่าน MASCOT (Matrix Science, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อระบุชนิดของสารชีวภาพที่พบใน LGG CSF

3.3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดสอบที่ได้จากการทดสอบ หากข้อมูลที่ได้มีการกระจายของข้อมูลแบบปกติจะใช้สถิติ one-way analysis of variance, one-way ANOVA หากข้อมูลที่ได้มีการกระจายของข้อมูลแบบไม่ปกติจะใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ในการทดสอบ และทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยการจับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Dunn's multiple comparison test โปรแกรมสถิติที่ใช้สำหรับการทดสอบได้แก่ GraphPad Prism version 9.0 for windows โดยค่า $p \leq 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

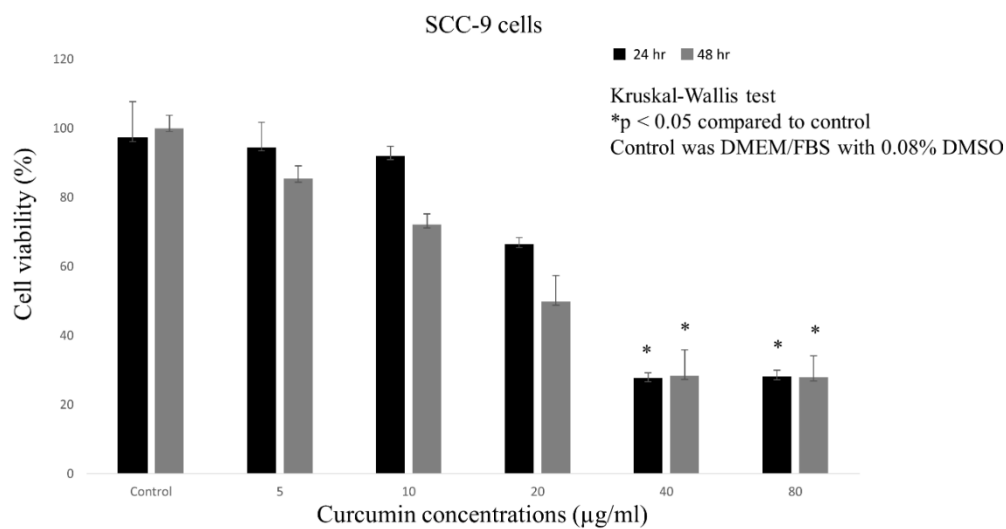


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบเคอควมินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay

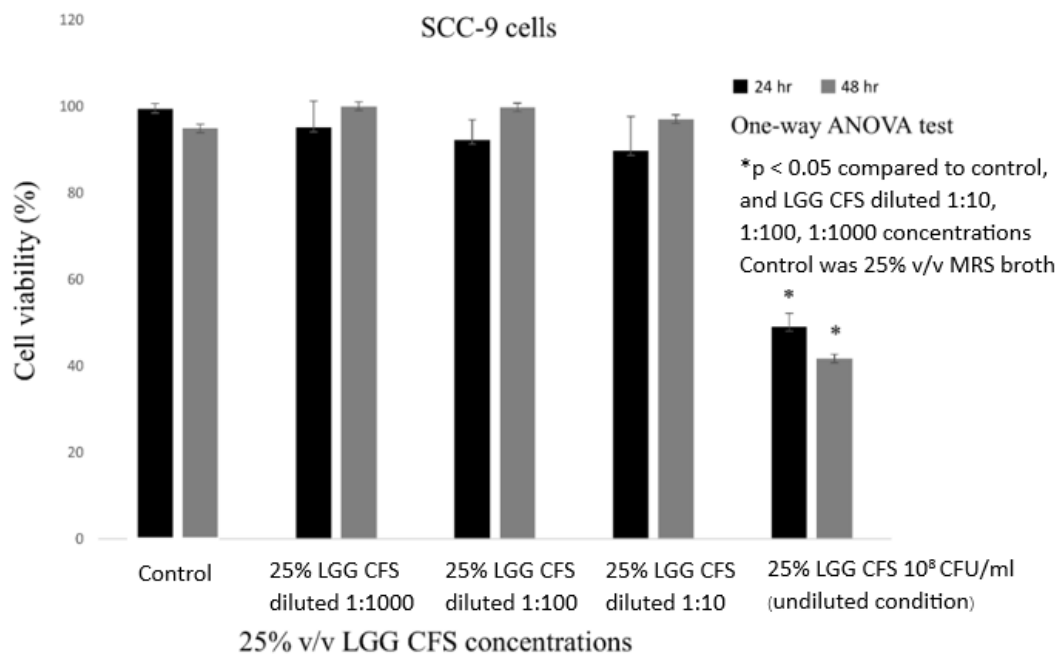
เพื่อศึกษาผลกระทบของเคอควมินต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยบ่มสารเคอควมินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 $\mu\text{g/ml}$ กับเซลล์ SCC-9 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลแสดงในภาพที่ 6 พบว่าเคอควมินมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ตามเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยที่เวลาในการบ่มทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเคอควมินเข้มข้น 40 และ 80 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.008$ และ $p=0.02$ สำหรับการใส่เคอควมินเข้มข้น 40 และ 80 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และ $p=0.008$ สำหรับการใส่เคอควมินเข้มข้น 40 และ 80 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 48 ชั่วโมง) โดยลดลงไป 69.5% และ 68.9% สำหรับการบ่มกับเคอควมินเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และลดลงไป 71.7% และ 72.2% สำหรับการบ่มกับเคอควมินเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง เคอควมินความเข้มข้น 0 – 80 $\mu\text{g/ml}$ ลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 เหลือ $97.1\pm 10.5\%$, $94.4\pm 7.3\%$, $91.8\pm 2.8\%$, $66.4\pm 1.8\%$, $27.6\pm 1.5\%$ และ $28.2\pm 1.7\%$ ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง เคอควมินความเข้มข้น 0 – 80 $\mu\text{g/ml}$ ลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 เหลือ $100.0\pm 3.7\%$, $85.3\pm 3.7\%$, $72.1\pm 3.1\%$, $49.8\pm 7.6\%$, $28.3\pm 7.6\%$ และ $27.8\pm 6.3\%$ ตามลำดับ ทั้งนี้ตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ละลายเคอควมิน ได้แก่ 0.08% ไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ในทุกเวลาที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกใช้เคอควมินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ได้ประมาณ 5% และเคอควมินที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ได้มากกว่า 50% และเลือกระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง เนื่องจากให้ผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.83$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการบ่มที่ 48 ชั่วโมง สำหรับการทดลองในขั้นถัดไป เคอควมินที่ความเข้มข้น 5 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ ถูกเรียกว่า curcumin low dose (curcumin-L) และ curcumin high dose (curcumin-H) ตามลำดับ



ภาพที่ 6 ร้อยละการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 หลังจากบ่มกับเคอคิวมินที่ ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 80 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 24 (กราฟสีดำ) และ 48 (กราฟสีเทา) ชั่วโมง (* $p \text{ value} < 0.05$) กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μl ซึ่งมีส่วนผสมของ DMSO ความเข้มข้น 0.08%

4.2 ผลการทดสอบ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยเทคนิค MTT assay

เพื่อศึกษาผลกระทบของ 25% LGG CFS ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 โดยบ่ม 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000 เท่า, 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่า, 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:10 เท่า จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และ 25% LGG ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น กับเซลล์ SCC-9 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลแสดงในภาพที่ 7 พบว่า ที่เวลาในการบ่มทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.0001$ สำหรับทั้งเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง) โดยลดลงไป 50.3% และ 53.2% ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง 25% MRS broth (กลุ่มควบคุม) และ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000, 1:100, 1:10 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และ LGG CFS ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น ลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 เหลือ $99.4 \pm 1.2\%$, $95.1 \pm 6.1\%$, $92.2 \pm 4.7\%$, $89.6 \pm 8.0\%$ และ $49.0 \pm 3.1\%$ ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง 25% MRS broth (กลุ่มควบคุม) และ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000, 1:100, 1:10 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และ LGG CFS ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น ลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 เหลือ $94.9 \pm 2.9\%$, $100.0 \pm 2.4\%$, $99.7 \pm 7.7\%$, $97.0 \pm 3.5\%$ และ $41.6 \pm 4.8\%$ ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ได้ประมาณ 5% และ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น ซึ่งสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ได้มากกว่า 50% และเลือกระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง เนื่องจากให้ผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.06$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการบ่มที่ 48 ชั่วโมง สำหรับการทดลองในขั้นถัดไป 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้นและที่ความเข้มข้นเริ่มต้น จะถูกเรียกว่า LGG CFS low dose (LGG CFS-L) และ LGG CFS high dose (LGG CFS-H) ตามลำดับ

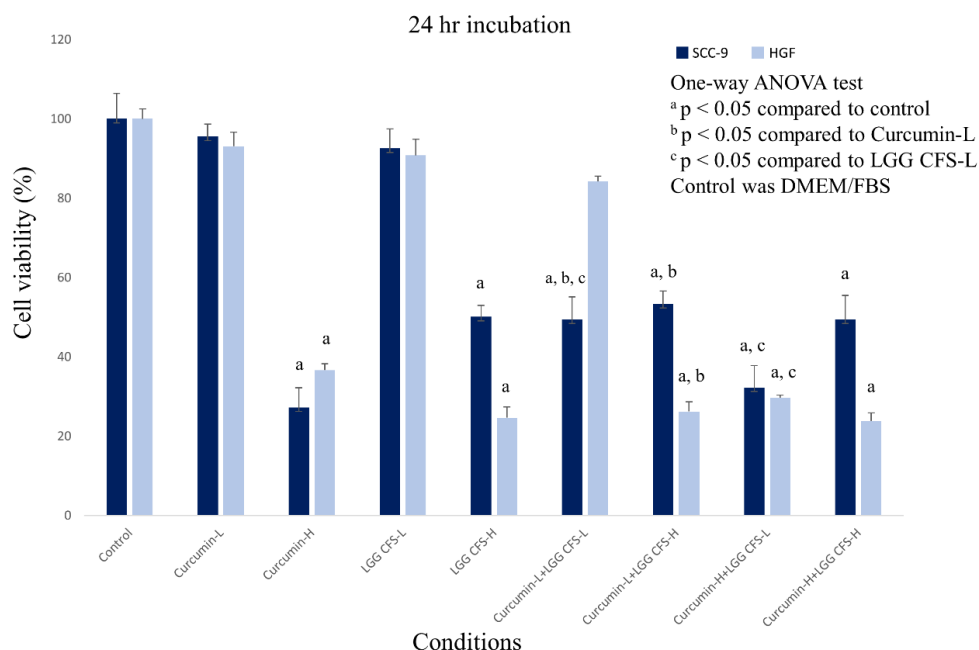


ภาพที่ 7: ร้อยละการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 หลังจากบ่มกับ 25% LGG CFS ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:1,000, 1:100, 1:10 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น และ LGG CFS ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml (ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น) ตั้งแต่ ที่เวลา 24 (กราฟสีดำ) และ 48 (กราฟสีเทา) ชั่วโมง (*p value < 0.05) กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ 25% v/v MRS broth

4.3 ผลการทดสอบเคอควินและ 25% LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและใช้สารผสมที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF โดยเทคนิค MTT assay

เพื่อศึกษาผลกระทบของเคอควินและ 25% LGG CFS ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF โดยบ่มรูปแบบการใช้สารชนิดเดียวได้แก่ เคอควินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ (curcumin-L) เคอควินที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ (curcumin-H) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-H) และบ่มรูปแบบการใช้สารผสมได้แก่ เคอควินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) เคอควินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10^8 (curcumin-L+LGG CFS-H) เคอควินที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-H+LGG CFS-L) และ เคอควินที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10^8 (curcumin-H+LGG CFS-H) กับเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลแสดงในภาพที่ 8 พบว่าการใช้สภาวะ curcumin-H และ LGG CFS-H เพียงอย่างเดียวสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.0001$ สำหรับการใส่สภาวะ curcumin-H และ LGG CFS-H ทั้งในเซลล์ SCC-9 และ HGF) และยังพบว่า LGG CFS-H ส่งผลให้การมีชีวิตของเซลล์ HGF ต่ำกว่าเซลล์ SCC-9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ในขณะที่สภาวะ curcumin-H ลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.0001$) และไม่พบความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ($P = 0.06$) แสดงให้เห็นว่าสภาวะ curcumin-H และ LGG CFS-H มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ HGF ในขณะที่การใช้สภาวะ curcumin-L และ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.99$ และ $p = 0.20$ สำหรับการใส่สภาวะ curcumin-L ในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ตามลำดับ และ $p = 0.20$ และ $p = 0.19$ สำหรับการใส่สภาวะ LGG CFS-L ในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ตามลำดับ) สภาวะการใช้สารผสมร่วมกันในทุกูปแบบ (curcumin-L+LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-H, curcumin-H+LGG CFS-L และ curcumin-H+LGG CFS-H) สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.02$, $p=0.04$, $p<0.0001$ และ $p=0.02$ ตามลำดับ) ในขณะที่สภาวะการใช้สารผสม (curcumin-L+LGG CFS-H, curcumin-H+ LGG CFS-L และ curcumin-H+LGG CFS-H) ลดการมีชีวิตของเซลล์ HGF ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.0001$, $p=0.002$ และ $p<0.0001$ ตามลำดับ) ยกเว้นสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L ที่ไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ HGF ($p=0.14$) และยังพบการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ที่ต่ำกว่าเซลล์ HGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) เมื่อใช้สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L นอกจากนี้สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการใช้ curcumin-L หรือ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียว ($p<0.0001$ หรือ $p=0.002$ ตามลำดับ) จากผลการทดลองครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวสำหรับการทดลองในขั้นถัดไป



ภาพที่ 8 ร้อยละการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติ HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารชนิดเดียวได้แก่ เคอควมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) เคอควมินที่ความเข้มข้น 40 µg/ml (curcumin-H) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10⁸ (ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น) (LGG CFS-H) และการใช้สารผสมได้แก่ เคอควมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) เคอควมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10⁸ (curcumin-L+LGG CFS-H) เคอควมินที่ความเข้มข้น 40 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-H+LGG CFS-L) และ เคอควมินที่ความเข้มข้น 40 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10⁸ (curcumin-H+LGG CFS-H) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl ^a คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ^b คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ curcumin-L ^c คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ LGG CFS-L

4.4 ผลการศึกษาารูปแบบการตายของเซลล์ภายหลังการบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF กับเคอควินและ 25% LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและสารผสม โดยเทคนิค Flow cytometry

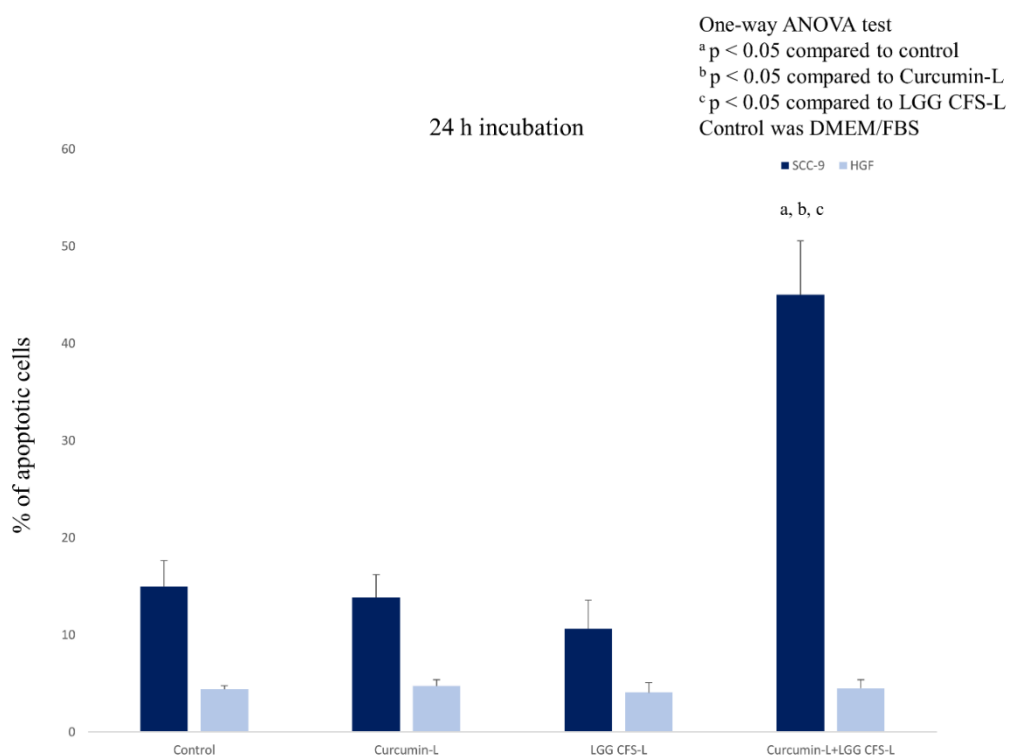
เพื่อศึกษาผลกระทบของเคอควินและ 25% LGG CFS ทั้งแบบใช้สารเดี่ยวและสารผสมต่อรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ภายหลังจากการทดลองในข้อ 4.3 สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L และสภาวะการใช้สารเดี่ยว ได้แก่ curcumin-L และ LGG CFS-L ถูกนำมาใช้ในการทดสอบต่อ โดยบ่มด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L และ curcumin-L+LGG CFS-L กับเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์มะเร็ง SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF โดยใช้วิธีตรวจ AnnexinV/PI binding และวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Flow cytometry ผลแสดงในภาพที่ 9 พบว่าสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งชนิด SCC-9 เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส (ทั้ง early และ late stage) ได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$ ในทุกสภาวะ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและสภาวะการใช้สารเดี่ยวทั้ง curcumin-L และ LGG CFS-L ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์ HGF ในทุกสภาวะการทดสอบ ($p = 0.76$) นอกจากนี้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L ยังเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งชนิด SCC-9 เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสได้มากกว่าเซลล์ HGF ($p < 0.0001$) โดยร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ที่มีการตายแบบอะพอพโตซิส (ทั้ง early และ late stage) ภายหลังจากบ่มด้วยสภาวะควบคุม สภาวะ curcumin-L สภาวะ LGG CFS-L และสภาวะการใช้ curcumin-L+LGG CFS-L ได้แก่ $14.9 \pm 2.7\%$, $13.8 \pm 2.3\%$, $10.6 \pm 2.9\%$ และ $45.0 \pm 5.5\%$ ตามลำดับ ร้อยละของจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ที่มีการตายแบบอะพอพโตซิส (ทั้ง early และ late stage) ภายหลังจากบ่มด้วยสภาวะควบคุม สภาวะ curcumin-L สภาวะ LGG CFS-L และสภาวะการใช้ curcumin-L+LGG CFS-L ได้แก่ $4.4 \pm 0.3\%$, $4.7 \pm 0.6\%$, $4.0 \pm 1.0\%$ และ $4.5 \pm 0.8\%$ ตามลำดับ

จาก ภาพที่ 10 พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครซิส (necrosis) ในทั้งเซลล์มะเร็ง SCC-9 และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ($p = 0.12$ และ $p = 0.26$ ตามลำดับ) ในทุกสภาวะการทดสอบ โดยร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ที่มีการตายแบบเนโครซิส ภายหลังจากบ่มด้วยสภาวะควบคุม สภาวะ curcumin-L สภาวะ LGG CFS-L และสภาวะการใช้

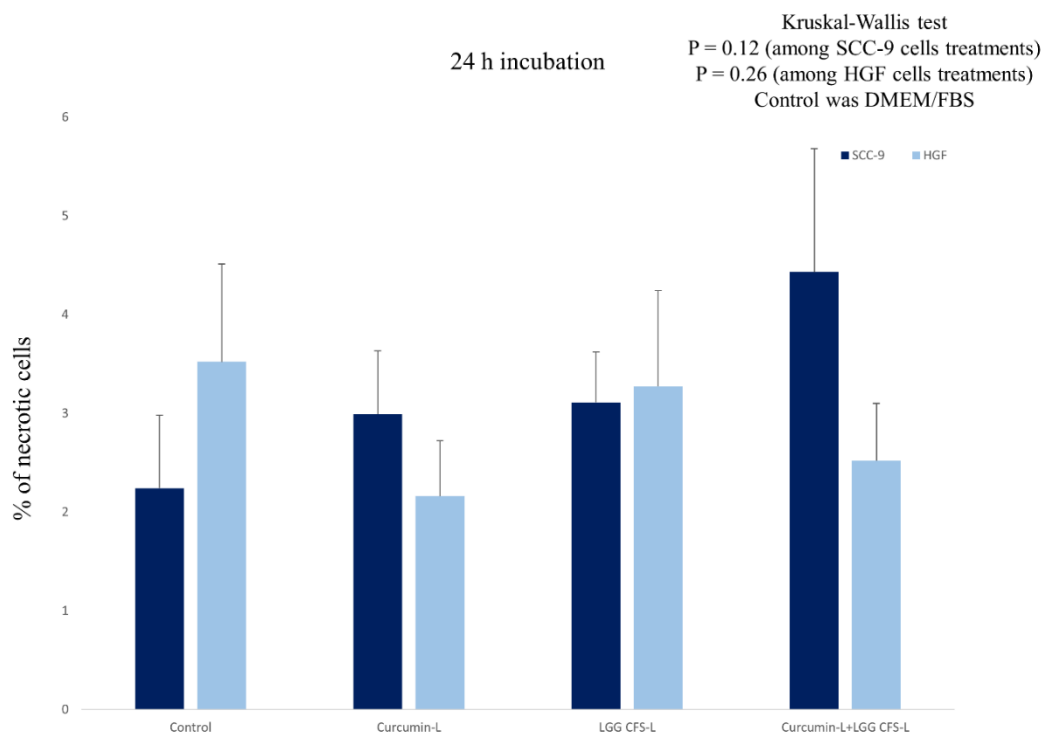
curcumin-L+LGG CFS-L ได้แก่ $2.2 \pm 0.7\%$, $2.9 \pm 0.6\%$, $3.1 \pm 0.5\%$ และ $4.4 \pm 1.2\%$ ตามลำดับ ร้อยละของจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ที่มีการตายแบบเนโครซิส ภายหลังการบ่มด้วยสภาวะควบคุม สภาวะcurcumin-L สภาวะ LGG CFS-L และสภาวะการใช้ curcumin-L+LGG CFS-L ได้แก่ $3.5 \pm 0.9\%$, $2.1 \pm 0.5\%$, $3.2 \pm 0.9\%$ และ $2.5 \pm 0.5\%$ ตามลำดับ

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการใช้สารเดี่ยวและสภาวะควบคุม และนำไปสู่การทดสอบระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโตซิสในขั้นตอนต่อไป ภาพที่ 11 และ 12 แสดงภาพตัวแทนของ Scatter plot หลังจากบ่มเซลล์มะเร็ง SCC-9 และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-L และหลุมควบคุม

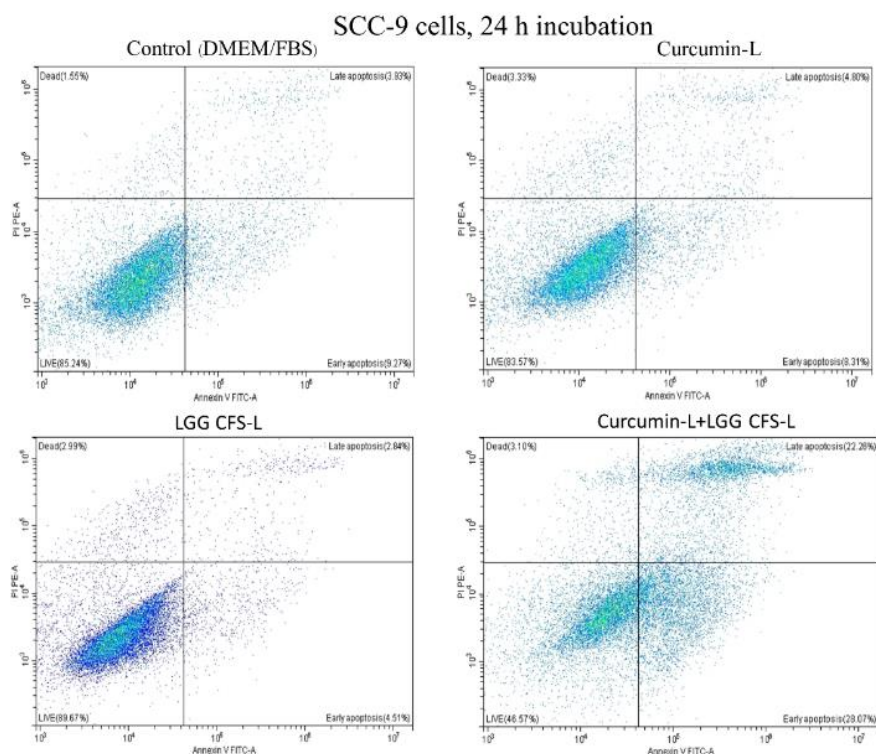




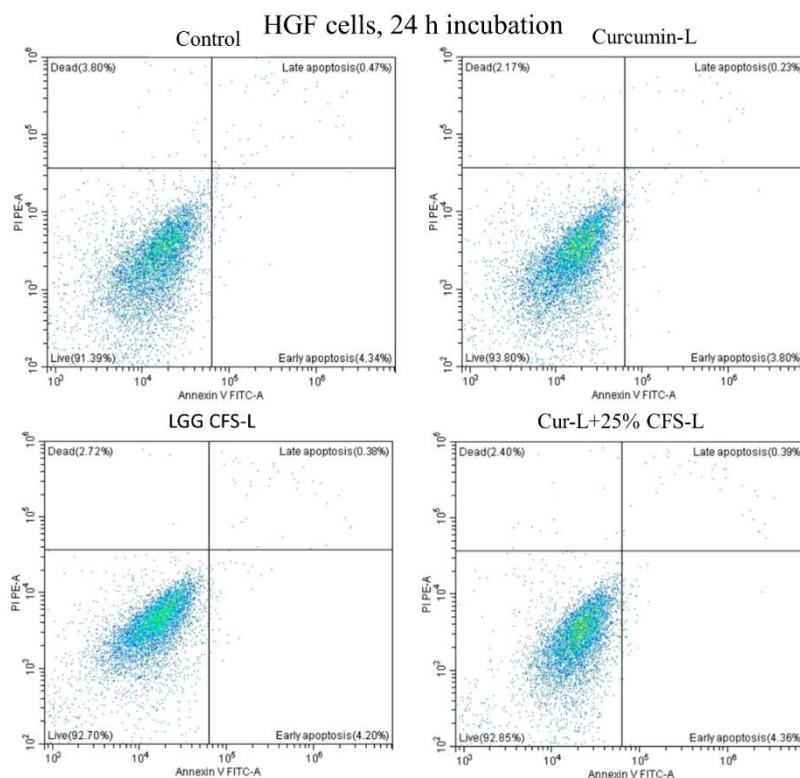
ภาพที่ 9 ร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) ที่มีการตายแบบอะพอพโตซิส (ทั้ง early และ late stage) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ^a คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ^b คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ curcumin-L ^c คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ LGG CFS-L



ภาพที่ 10 ร้อยละของจำนวนเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) ที่มีการตายแบบเนโครซิส หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS



ภาพที่ 11 ภาพตัวแทนของ Scatter plot หลังจากบ่มเซลล์มะเร็งเรื้องรังช่องปาก SCC-9 ด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-L และหลุมควบคุม จากภาพในแต่ละสภาวะ ประกอบไปด้วยร้อยละของเซลล์ ดังนี้เซลล์ที่ยังมีชีวิต เซลล์ตายแบบเนโครซิส เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (early stage) และเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (late stage) ของสภาวะ curcumin-L เท่ากับ 83.57%, 3.33%, 8.31% และ 4.80% ตามลำดับ ของสภาวะ LGG CFS-L เท่ากับ 89.67%, 2.99%, 4.51% และ 2.84% ตามลำดับ ของสภาวะ curcumin-L+LGG CFS-L เท่ากับ 46.57%, 3.10%, 28.07% และ 22.26% ตามลำดับ และของสภาวะควบคุม เท่ากับ 85.24%, 1.55%, 9.27% และ 3.93% ตามลำดับ

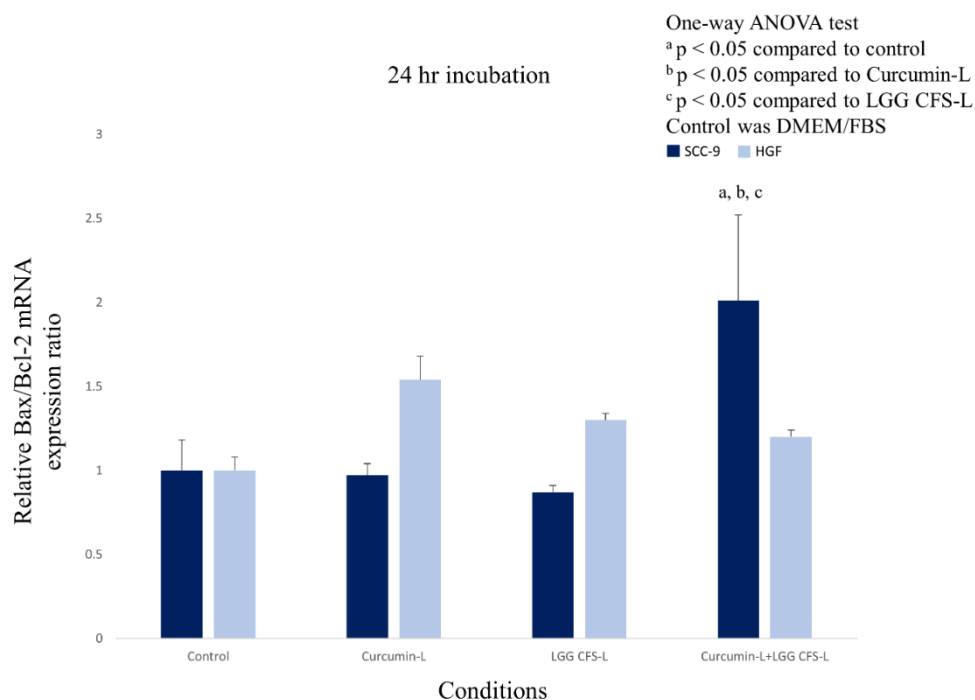


ภาพที่ 12 ภาพตัวแทนของ Scatter plot หลังจากบ่มเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-L และหลุมควบคุม จากภาพในแต่ละสภาวะ ประกอบไปด้วยร้อยละของเซลล์ ดังนี้ เซลล์ที่ยังมีชีวิต เซลล์ตายแบบเนโครซิส เซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส (early stage) และเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส (late stage) ของสภาวะ curcumin-L เท่ากับ 93.80%, 2.17%, 3.80% และ 0.23% ตามลำดับ ของสภาวะ LGG CFS-L เท่ากับ 92.70%, 2.72%, 4.20% และ 0.38% ตามลำดับ ของสภาวะ curcumin-L+LGG CFS-L เท่ากับ 92.85%, 2.40%, 4.36% และ 0.39% ตามลำดับ ของสภาวะควบคุม เท่ากับ 91.39%, 3.80%, 4.34% และ 0.47% ตามลำดับ

4.5 ผลการแสดงผลของยีน *Bax* และ *Bcl-2* ภายหลังจากการบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และ เซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF กับเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวและ สารผสม โดยเทคนิค real-time PCR

เพื่อศึกษาผลกระทบของเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวและสารผสมต่อการแสดงออกของยีน *Bax* และ *Bcl-2* ในเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ภายหลังจากการทดลองในข้อ 4.3 สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L และสภาวะการใช้สารเดี่ยวได้แก่ curcumin-L และ LGG CFS-L ถูกนำมาใช้ในการทดสอบต่อ โดยบ่มด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L และ curcumin-L+LGG CFS-L กับเซลล์ SCC-9 และ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการสกัด RNA เพื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน *Bax* และ *Bcl-2* โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกในรูปแบบอัตราส่วนของ *Bax* ต่อ *Bcl-2* (*Bax/Bcl-2* ratio) ทั้งนี้ *Bax* เป็นยีนที่ควบคุมโปรตีนที่ส่งเสริมการเกิดอะพอพโตซิส ในขณะที่ *Bcl-2* เป็นยีนที่ควบคุมโปรตีนที่ต้านการเกิดอะพอพโตซิส ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหาก *Bax/Bcl-2* ratio มีค่าสูงขึ้นแสดงให้เห็นถึงเซลล์มีการตายแบบอะพอพโตซิสมากขึ้น ในขณะที่หาก *Bax/Bcl-2* ratio มีค่าต่ำลงแสดงให้เห็นถึงเซลล์มีการตายแบบอะพอพโตซิสน้อยลงหรือมีชีวิตอยู่มากขึ้น ผลแสดงในภาพที่ 13 พบว่าสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L และ LGG CFS-L ไม่มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *Bax/Bcl-2* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งในเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ($p > 0.99$ และ $p = 0.73$ ตามลำดับ สำหรับสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L และ $p > 0.99$ สำหรับสภาวะการใช้สารเดี่ยว LGG CFS-L ทั้งในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF) โดยพบว่า *Bax/Bcl-2* ratio อยู่ในระดับเดียวกับที่พบในกลุ่มควบคุม ในขณะที่สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L พบว่า *Bax/Bcl-2* ratio ของเซลล์ SCC-9 มีระดับที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและสภาวะการใช้สารชนิดเดียว curcumin-L และ LGG CFS-L ($p = 0.01$, $p = 0.01$ และ $p = 0.004$ ตามลำดับ) และเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HGF ($p = 0.04$) แสดงให้เห็นถึงอัตราการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสที่สูงขึ้น ในขณะที่สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L ในเซลล์ HGF ไม่มีผลกระทบต่อ *Bax/Bcl-2* ratio ของเซลล์ดังกล่าว ($p > 0.99$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 เกิดการตาย

แบบอะพอพโตซิสได้โดยผ่านกลไกการเพิ่มระดับของ Bax/Bcl-2 ในขณะที่สภาวะดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF



ภาพที่ 13 ระดับการแสดงออกของยีน Bax/Bcl2 ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารชนิดเดียวได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสมได้แก่ เคอควิมินที่ความเข้มข้น 5 µg/ml ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 µl ^a คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ^b คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ curcumin-L ^c คือ p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ LGG CFS-L

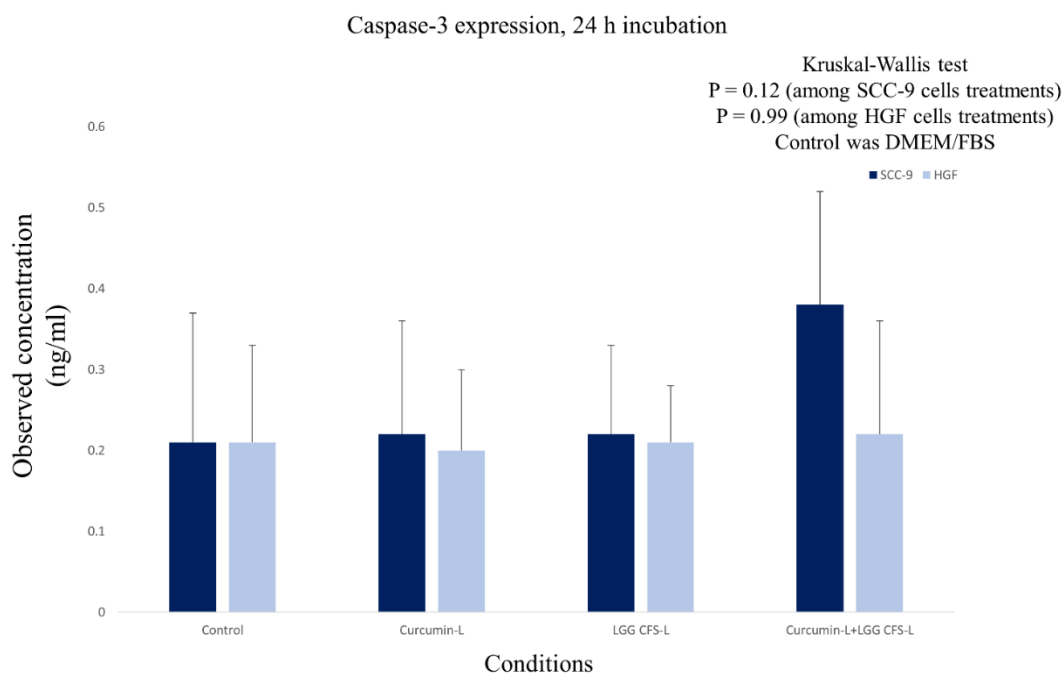
4.6 ผลการแสดงผลของ Apoptotic protein (caspase-3) และ Anti-apoptotic protein (Bcl-xL/Bak และ Mcl-1/Bak) ภายหลังจากบ่มเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF กับเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวและสารผสม โดยเทคนิค Bio-Plex Pro RBM apoptosis assays

เพื่อศึกษาผลกระทบของเคอควิมินและ 25% LGG CFS ทั้งในรูปแบบการใช้สารเดี่ยวและสารผสมต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโตซิส ได้แก่ caspase-3, Bcl-xL/Bak และ Mcl-1/Bak ในเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ภายหลังจากการทดลองในข้อ 4.3 สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L และสภาวะการใช้สารเดี่ยว ได้แก่ curcumin-L และ LGG CFS-L ถูกนำมาใช้ในการทดสอบต่อ โดยบ่มด้วยสภาวะ curcumin-L, LGG CFS-L และ curcumin-L+LGG CFS-L กับเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการย่อยเซลล์และวัดการแสดงออกของ apoptotic และ anti-apoptotic protein ผลแสดงในภาพที่ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ

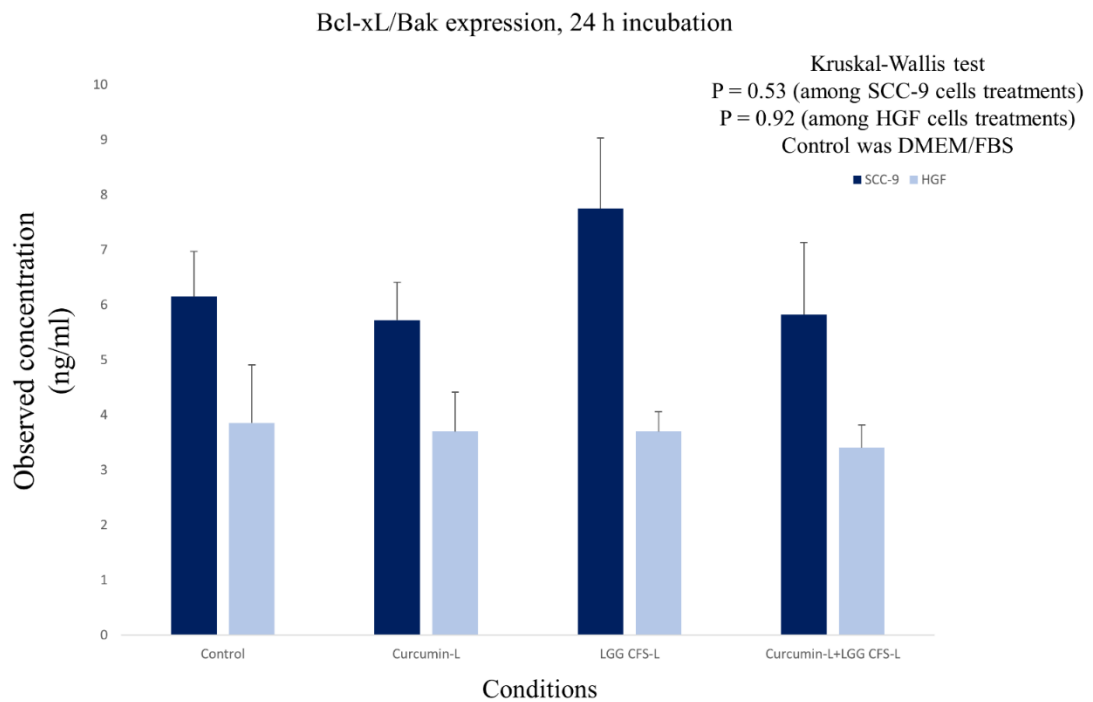
จากภาพที่ 14 พบว่าสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ในเซลล์ SCC-9 ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L และ LGG CFS-L โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.12$) แต่ไม่มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ในเซลล์ HGF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L และ LGG CFS-L ($p=0.99$) นอกจากนี้ยังพบระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ในเซลล์ SCC-9 ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในเซลล์ HGF โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.23$) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสที่สูงขึ้นในเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ผ่านกลไกการเพิ่มระดับของ caspase-3 ในขณะที่สภาวะดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ในขณะที่สภาวะการใช้สารเดี่ยวทั้ง curcumin-L และ LGG CFS-L ไม่มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ทั้งในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.99$ ในทุกสภาวะ) หรือเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด ($p>0.99$)

จากภาพที่ 15 และ 16 พบว่าสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L และ LGG CFS-L และสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L ไม่มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน

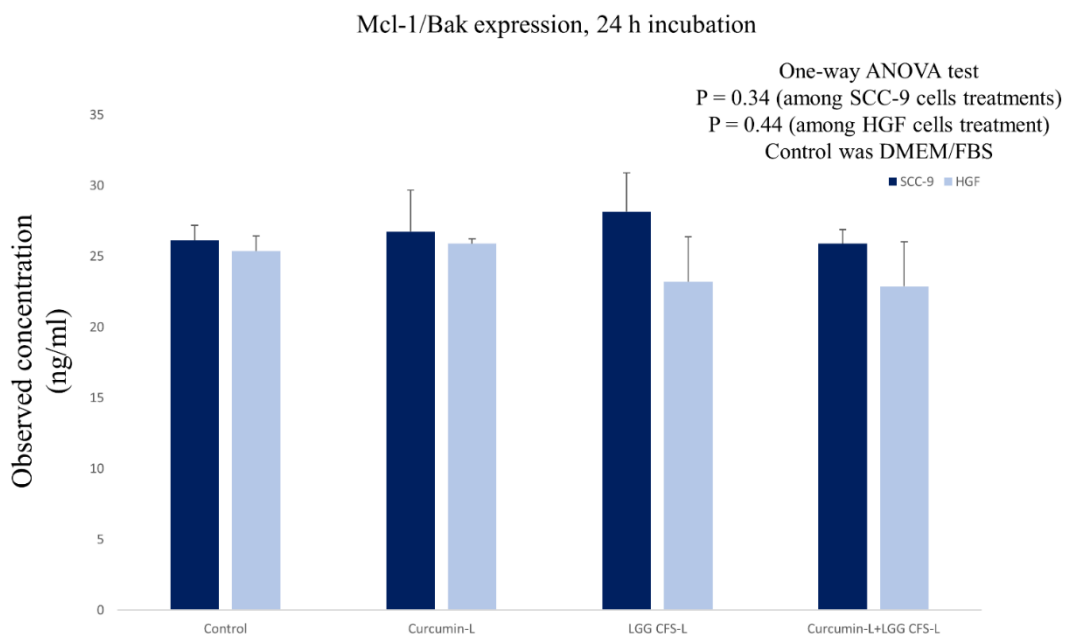
Bcl-xL/Bak และโปรตีน Mcl-1/Bak ทั้งในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.53$ และ $p=0.92$ สำหรับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL/Bak ในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ตามลำดับ และ $p=0.34$ และ $p=0.44$ สำหรับการแสดงออกของโปรตีน Mcl-1/Bak ในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดพบว่าเซลล์ SCC-9 มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL/Bak มากกว่าเซลล์ HGF ในสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L และ LGG CFS-L สภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L และสภาวะควบคุม ($p=0.02$, $p=0.006$, $p=0.03$ และ $p=0.04$ ตามลำดับ) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน Mcl-1/Bak ไม่มีความแตกต่างกันในทุกสภาวะ ($p=0.62$ สำหรับสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L, $p=0.10$ สำหรับสภาวะการใช้สารเดี่ยว LGG CFS-L, $p=0.18$ สำหรับสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L และ $p=0.42$ สำหรับสภาวะควบคุม)



ภาพที่ 14 ระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μl



ภาพที่ 15 ระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL/Bak ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μl



ภาพที่ 16 ระดับการแสดงออกของโปรตีน Mcl-1/Bak ของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 (กราฟสีน้ำเงิน) และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF (กราฟสีฟ้า) หลังจากบ่มกับสารเดี่ยว ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ (curcumin-L) 25% LGG CFS ที่ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (LGG CFS-L) และการใช้สารผสม ได้แก่ เคอควินินที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 25% LGG CFS ความเข้มข้น 1:100 เท่าจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น (curcumin-L+LGG CFS-L) ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมได้แก่สภาวะ DMEM/FBS ปริมาตร 100 μl

4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ LGG CFS โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

การวิเคราะห์ LC-MS/MS พบสารชีวภาพใน LGG CFS ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เป็นสารประเภทโปรตีนโดยมีทั้งหมด 30 ชนิด และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักตามคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีน ได้แก่ กลุ่ม metabolic enzyme and protein มีทั้งหมด 26 ชนิด และกลุ่ม surface layer protein มีทั้งหมด 4 ชนิด ดังที่ได้แสดงผลในตารางที่ 4



ตารางที่ 4 ชนิดของโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของ LGG CFS ที่ผ่านการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

กลุ่มของโปรตีน	ลำดับที่	ชนิดของโปรตีน
Metabolic enzymes and proteins	1.	Peptidase
	2.	Metal transporting ATPase
	3.	Magnesium transporting ATPase
	4.	Cation-translocating P-type ATPase
	5.	Calcium transporting ATPase
	6.	Alpha-L-rhamnosidase
	7.	Exopolyphosphatase
	8.	Catabolite control protein A
	9.	Oligoendopeptidase
	10.	Transposase
	11.	Citrate lyase alpha chain
	12.	Alpha/beta hydrolase
	13.	L-fructose isomerase
	14.	Acetyltransferase
	15.	Leucine tRNA ligase
	16.	DNA-directed RNA polymerase
	17.	Diacyl glycerol kinase
	18.	Lipid kinase
	19.	Primosomal protein N'
	20.	PTS fructose transporter
	21.	Aminotransferase
	22.	Ribonuclease R
	23.	Glycerol kinase
	24.	Chaperone protein Dnak
	25.	GTPase Obg
	26.	Beta-galactosidase
Surface layer proteins	27.	Putative cell surface protein
	28.	Gram positive anchoring domain-containing protein
	29.	LPXTG cell wall anchoring domain-containing protein
	30.	Adhesin

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ถือเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดของมะเร็งศีรษะและลำคอ (2) มีสาเหตุหลักมาจากการกลายพันธุ์ของยีนกำเนิดมะเร็งและยีนยับยั้งมะเร็งหลายชนิด ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เองหรือเกิดภายหลังการได้รับสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ ต่อเซลล์เนื้อเยื่อช่องปาก เช่น สารพิษบางอย่างในบุหรี่และแอลกอฮอล์ มะเร็งชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้คนไข้สูญเสียอวัยวะในช่องปากอย่างถาวรและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ (2, 3, 4) วิธีการรักษามะเร็งช่องปากชนิด OSCC ในปัจจุบันจะเริ่มต้นจากการรักษาทางศัลยศาสตร์ด้วยการผ่าตัดรอยโรคออกทั้งหมด หากรอยโรคกลับมาเป็นซ้ำจึงจะเริ่มให้การรักษาด้วยการฉายรังสีรักษาหรือการใช้ยาเคมีบำบัดเพิ่มเติมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน (4) ปัจจุบันแม้ว่าจะมีการพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งช่องปากชนิด OSCC อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตใน 5 ปีของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากชนิดนี้ยังอยู่ที่ประมาณ 50% เท่านั้น (4, 10, 112) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงยังมุ่งเน้นทำวิจัยเพื่อหาวิธีการรักษาแบบอื่นๆ เพื่อมาเสริมกับวิธีการรักษามาตรฐาน โดยมุ่งหวังให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากชนิด OSCC สูงขึ้น งานวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของเคอควิมินและ LGG CFS ต่อการยับยั้งการมีชีวิตและการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-9 cells) ร่วมกับการพิจารณาผลกระทบของสารดังกล่าวที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก (HGF cells) ซึ่งเป็นเซลล์ปกติหรือไม่ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาการป้องกัน การรักษามะเร็งช่องปากชนิด OSCC รูปแบบใหม่และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้เพิ่มเติมในอนาคต

เป็นที่ทราบกันดีว่าเคอควิมินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายประการ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (30, 84, 113) ในการศึกษาพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าเคอควิมินเข้มข้น 40 และ 80 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในหลายการศึกษา ที่พบว่าเคอควิมินมีผลยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (107, 114, 115) เช่น การศึกษาของ Liu และคณะในปี ค.ศ. 2021 พบว่าเคอควิมินความเข้มข้น

20 μM สามารถลดการมีชีวิตและการสร้างโคโลนีของเซลล์ (colony formation ability) ในเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HSC3 และ CAL33 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเคอควิมินสามารถลดระดับการแสดงออกของ NF- κB , specificity protein 1 และ p65 mRNA และโปรตีน ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (114) นอกจากนี้ Zhen และคณะในปี ค.ศ. 2014 พบว่าเคอควิมินความเข้มข้น 10 μM นอกจากจะลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-25 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell invasion) ของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้อีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเคอควิมินสามารถกระตุ้นวัฏจักรของเซลล์ให้หยุดอยู่ที่ระยะ G2/M ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่เคอควิมินสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน phosphorylated-epidermal growth factor receptor ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการมีชีวิตและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (107) Xiao และคณะในปี ค.ศ. 2014 รายงานว่าเคอควิมินความเข้มข้น 60 μM สามารถลดการมีชีวิตและการสร้างโคโลนีของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากเคอควิมินสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1 ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (115) ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาการบ่มที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ระหว่างเคอควิมินและเซลล์ SCC-9 และพบว่าเคอควิมินสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ได้ในระดับที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.83$) อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้าพบว่า ผลการยับยั้งของเคอควิมินต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (107, 114) Zhen และคณะในปี ค.ศ.2014 ซึ่งได้ทำการศึกษากับเคอควิมินที่ความเข้มข้น 10 μM และ Liu และคณะในปี ค.ศ.2021 ซึ่งได้ทำการศึกษากับเคอควิมินที่ความเข้มข้น 10 μM พบว่าหากเพิ่มระยะเวลาการบ่มเคอควิมินร่วมกับเซลล์มะเร็งให้นานขึ้น จะสามารถลดอัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (107, 114) ดังนั้นในการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตควรขยายระยะเวลาการบ่มระหว่างเคอควิมินและเซลล์ SCC-9 ให้นานขึ้นกว่า 48 ชั่วโมง ซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลของเคอควิมินที่ความเข้มข้นต่ำแต่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น เทียบเท่ากับการใช้เคอควิมินความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าเคอควิมินมีประสิทธิภาพที่ดีเพียงพอในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9

โพรไบโอติกแบคทีเรียชนิด LGG (ATCC 53103) เป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียชนิดแรกที่ถูกนำมาศึกษาในแง่การยับยั้งเซลล์มะเร็ง และพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (21, 24) อย่างไรก็ตามการศึกษาการใช้ LGG ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากยังคงมีอยู่อย่างจำกัด (8, 24) โดยในการศึกษานี้พบว่า 25% (v/v) LGG CFS ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาก่อนหน้าพบว่า LGG ทั้งในรูปแบบเชื้อที่มีชีวิต รูปแบบที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และรูปแบบการใช้เฉพาะน้ำเลี้ยงส่วนใส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (24) Rokka และคณะในปี ค.ศ. 2008 พบว่าการใช้ LGG ที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^{10} CFU/ml สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* บนเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การบ่มเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ร่วมกับแบคทีเรีย LGG ที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ก่อนจะบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-8 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่มีเชื้อ *H. pylori* เกาะติดอยู่ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ LGG ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งเป็นกระบวนการเริ่มต้นที่สำคัญของเชื้อในการอยู่อาศัยในกระเพาะอาหาร และนำมาสู่การพัฒนาให้เกิดเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร และลดระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-8 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (62) Seow และคณะในปี ค.ศ.2010 ได้รายงานว่าการใช้ LGG ทั้งในรูปแบบที่มีชีวิตและรูปแบบที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งสามารถเพิ่มอัตราการหายจากโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยคณะผู้วิจัยได้สรุปว่าการใช้ LGG ในทั้งสองรูปแบบสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน chemokine (c motif) ligand (XCL1) ซึ่งมีบทบาทในการเหนี่ยวนำเซลล์อักเสบชนิด T cells และ NK cells เข้ามายังบริเวณเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และทำให้เซลล์มะเร็งถูกกำจัดไป นอกจากนี้การใช้ LGG ในทั้งสองรูปแบบสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-9 ซึ่งส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ที่ลดลง (75) Mousavi และคณะในปี ค.ศ.2020 ได้รายงานว่าการใช้ LGG ในรูปแบบ Silver-LGG nanoparticles ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ $62.5 \mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเมื่อพิจารณาจากผล flow cytometry พบว่าการใช้ LGG ในรูปแบบ Silver-LGG nanoparticles สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดสภาวะ late

apoptosis (116) Orlando และคณะในปี ค.ศ.2016 ได้รายงานว่าการใช้ LGG ในรูปแบบที่มีชีวิต ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อบ่มที่เวลา 48 – 72 ชั่วโมง โดย LGG ที่มีชีวิตสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน Bax/Bcl-2 และเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสได้มากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า LGG มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (73) สำหรับการใช้ LGG ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก Cheng และคณะในปี ค.ศ.2017 พบว่าการใช้ LGG ในรูปแบบที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HSC-3 cells (25) ในขณะที่ Linsalata และคณะได้ทำการศึกษาในปี ค.ศ.2010 และรายงานว่าการใช้ LGG CFS ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คณะผู้วิจัยได้สรุปว่าการใช้ LGG CFS สามารถลดระดับการแสดงออกของ ornithine decarboxylase mRNA ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด HGC-27 ได้ ซึ่งมีผลให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนที่ลดลง (77) Escamilla และคณะในปี ค.ศ. 2012 รายงานว่า 25% (v/v) LGG CFS ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และได้สรุปว่าการใช้ LGG CFS สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP-9 และเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน zona occludens-1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (78) อีกหนึ่งการศึกษาที่สนับสนุนประสิทธิภาพของ LGG CFS ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แก่การศึกษาของ Nouri และคณะในปี ค.ศ. 2018 ซึ่งพบว่า 16% (v/v) LGG CFS ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย LGG CFS สามารถลดระดับการแสดงออกของ cancer testis antigens mRNA ลงได้ ซึ่งมีผลให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนที่ลดลง (117) จากข้อมูลทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า LGG น่าจะมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดทั้งในรูปแบบ *in vitro* และ *in vivo* นอกจากนี้สารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงส่วนใดยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดเทียบเท่ากับเชื้อ LGG ที่ยังมีชีวิต การศึกษานำร่องในครั้งนี้ได้ทำการทดสอบเพาะเลี้ยงเซลล์ SCC-9 กับเชื้อ LGG ที่ยังมีชีวิต และประเมินผลการทดสอบในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่าผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อน กล่าวคือเมื่อใช้ LGG ที่ยังมีชีวิต ที่ความเข้มข้นสูง (10^9 CFU/ml) บ่ม

ร่วมกับเซลล์ SCC-9 จากนั้นนำไปวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay แล้วพบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มมากขึ้น แสดงถึงการมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ LGG ที่ยังมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่ำกว่า และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใช้ LGG ที่ยังมีชีวิต ซึ่งขัดแย้งจากผลการทบทวนวรรณกรรมก่อนหน้า ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการที่ไม่สามารถล้าง LGG ที่ยังมีชีวิตออกจากเซลล์ SCC-9 ได้ทั้งหมด ทำให้ MTT assay ตรวจวัดการมีชีวิตของทั้งเซลล์ SCC-9 และ LGG ที่ยังมีชีวิต จึงทำให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นเพื่อทดสอบสมมติฐานจึงทดสอบนำสารละลาย PBS ในหลุมผ่านการล้างเชื้อ LGG ที่ยังมีชีวิตออกจากเซลล์ SCC-9 ทั้งจากการล้างครั้งที่ 2 ครั้งที่ 5 และครั้งที่ 10 ไปเพาะเลี้ยงหาเชื้อ LGG บน MRS agar ซึ่งพบโคโลนีของเชื้อ LGG เจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง แสดงให้เห็นว่ายังคงมีเซลล์เชื้อ LGG ตกค้างอยู่ในหลุม และไม่สามารถล้าง LGG ที่ยังมีชีวิตออกจากเซลล์ SCC-9 แม้ทำการล้างด้วยสารละลาย PBS หลายครั้ง ทำให้ได้ค่าการวัดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ด้วยเทคนิค MTT assay สูงกว่าความเป็นจริง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการใช้เชื้อ LGG ที่ยังมีชีวิตในการศึกษาคั้งนี้ จึงได้พิจารณาเลือกใช้ LGG CFS แทน

การศึกษาการใช้โพรไบโอติก LGG ร่วมกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้นยังคงมีอยู่อย่างจำกัด (73) Orlando และคณะในปี ค.ศ.2016 ได้รายงานว่าการใช้ LGG ในรูปแบบที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ร่วมกับการใช้วิตามินเค 1 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ LGG เพียงอย่างเดียว โดยวิตามินเค 1 อาจจะมีบทบาทในการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factor) สำหรับ LGG และทำให้สภาวะการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้มากขึ้น (73) Cheng และคณะในปี ค.ศ.2017 ได้รายงานว่าการใช้ LGG ในรูปแบบที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ร่วมกับการใช้สารเจนีโพลีไซด์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเจนีโพลีไซด์เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้ LGG มีบทบาทในการเปลี่ยนสารเจนีโพลีไซด์ให้เป็นสารเจนีพิน ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (25) Yazdi และคณะในปี ค.ศ.2019 รายงานว่าการใช้สารสกัดหยาบจากขมิ้นชัน (Turmeric extract, TE) ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีส่วนประกอบฟีนอล (รวมถึงเคอควิมิน) ประมาณ 6.4% ของสารประกอบทั้งหมด สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของ LGG ได้มากขึ้น โดยเฉพาะในช่วงภายหลัง 24 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมงของการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ

เหลวชนิด MRS ร่วมกับ TE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด MRS ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส โดย TE อาจมีบทบาทเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งถือเป็นอาหารของ LGG (31) ทำให้ LGG เจริญเติบโตได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้ LGG ที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ร่วมกับเคอคิวมินหรือ TE ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ สามารถลดระดับการแสดงออกของสารสื่อการอักเสบ IL-8 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เพียงอย่างเดียว และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ร่วมกับการใช้ LGG เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เคอคิวมินร่วมกับ LGG เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารทั้งสองชนิด ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาหรือวิธีการรักษาในรูปแบบใหม่ในทางคลินิก (31)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเคอคิวมินและ LGG CFS ทั้งในรูปแบบของสารเดี่ยวแต่ละชนิด และสารผสมของทั้งสองชนิดร่วมกัน ในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 โดยเลือกใช้เคอคิวมินและ LGG CFS ทั้งที่ความเข้มข้นสูง (curcumin-H และ LGG CFS-H) และที่ความเข้มข้นต่ำ (curcumin-L และ LGG CFS-L) พบว่าการใช้สภาวะ curcumin-H และ LGG CFS-H เพียงอย่างเดียวสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 ได้ ในขณะที่เดียวกันยังส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ HGF ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อปกติ ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นถึงผลข้างเคียงของการใช้สารทั้งสองชนิดในความเข้มข้นที่สูง ซึ่งอาจกระทบหรือเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Cianfruglia และคณะในปี ค.ศ.2019 ที่พบว่าเคอคิวมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ มีผลต่อการมีชีวิตทั้งในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันปกติ (118) การศึกษาก่อนหน้าพบว่าเคอคิวมินที่ความเข้มข้นสูง อาจมีคุณสมบัติที่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติได้ โดยการที่เคอคิวมินสามารถกระตุ้นให้ DNA ของเซลล์ถูกทำลาย มีการเปลี่ยนแปลงไปของโครโมโซมในเซลล์ รวมถึงทำลายไมโทคอนเดรียของเซลล์ได้ ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการทดลองโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์ในหลายๆวัย (119) สำหรับผลกระทบของ LGG หรือ LGG CFS ที่มีต่อเซลล์ปกตินั้น ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดและควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าการใช้สภาวะ curcumin-L และ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ($p>0.05$) แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยต่อเซลล์เมื่อมีการใช้สารทั้งสองชนิดนี้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่เดียวกันก็ไม่พบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม

ตามเมื่อนำสารทั้งสองชนิดมาผสมกันในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ curcumin-L+LGG CFS-L, curcumin-L+LGG CFS-H, curcumin-H+LGG CFS-L และ curcumin-H+LGG CFS-H พบว่าหากมีส่วนผสมของสารในสารหนึ่งในความเข้มข้นที่สูง (curcumin-L+LGG CFS-H, curcumin-H+LGG CFS-L และ curcumin-H+LGG CFS-H) นอกจากจะยับยั้งเซลล์ SCC-9 แล้ว สารผสมดังกล่าวยังคงส่งผลกระทบต่อหรือเป็นพิษต่อเซลล์ HGF ยกเว้นสารผสมของทั้งสองชนิดในระดับความเข้มข้นต่ำ หรือ curcumin-L+LGG CFS-L ที่สามารถลดการมีชีวิตเฉพาะเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ HGF จึงมีความเป็นไปได้ว่าการใช้เคอควิมินร่วมกับ LGG CFS ที่ความเข้มข้นต่ำน่าจะมีผลเสริมฤทธิ์กันในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติ (120)

รูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก SCC-9 และเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ภายหลังจากการบ่มด้วยสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L ถูกวิเคราะห์ด้วยการย้อม Annexin V/PI binding ร่วมกับเทคนิค Flow cytometer และเปรียบเทียบกับสภาวะการใช้สารเดี่ยว curcumin-L, LGG CFS-L และสภาวะควบคุม ทำให้สามารถจำแนกเซลล์ได้ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีชีวิต (Annexin V negative/PI negative) กลุ่มที่มีการตายแบบอะพอพโตซิสระยะเริ่ม (early apoptosis) (Annexin V positive/PI negative) กลุ่มที่มีการตายแบบอะพอพโตซิสระยะท้าย (late apoptosis) (Annexin V positive/PI positive) และกลุ่มที่มีการตายแบบเนโครซิส (Annexin V negative/PI positive) (121) ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ SCC-9 เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสทั้งในระยะแรกและระยะท้ายได้มากขึ้น แต่ไม่ส่งผลดังกล่าวต่อเซลล์ HGF ซึ่งมีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างจากสภาวะควบคุม ในขณะที่ไม่พบภาวะการตายแบบเนโครซิสที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ทั้งสองชนิด แสดงให้เห็นว่าการใช้เคอควิมินร่วมกับ LGG CFS มีผลยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 ผ่านการกระตุ้นกระบวนการตายแบบอะพอพโตซิส การศึกษาก่อนหน้าของ Chen และคณะในปี ค.ศ.2022 และ Almaki และคณะในปี ค.ศ.2021 พบว่าเคอควิมินมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสทั้งในระยะแรกและระยะท้ายได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม และยังให้ผลเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสได้มากขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของเคอควิมินสูงขึ้น (122, 123) ในขณะที่ LGG CFS ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสทั้งในระยะแรก

และระยะท้ายได้มากขึ้นเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะควบคุม (124) นอกจากนี้ ผลของ Scattering plot ยังแสดงให้เห็นว่า การใช้สภาวะ curcumin-L+LGG CFS-L สามารถทำให้เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC เข้าสู่ระยะ early apoptosis ได้เพิ่มขึ้น และจาก early apoptosis เข้าสู่ระยะ late apoptosis ได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สภาวะ curcumin-L หรือ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียวและสถานะควบคุม การศึกษาก่อนหน้าของ Chen และคณะในปี ค.ศ.2022 และ Ma และคณะในปี ค.ศ.2020 พบว่าการใช้สารเคอควินที่ความเข้มข้นสูง (20 และ 100 μM) สามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC เข้าสู่ระยะ early apoptosis ได้เพิ่มขึ้น และจาก early apoptosis เข้าสู่ระยะ late apoptosis ได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคอควินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (104, 122) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี่ที่ใช้สารเคอควินและ LGG CFS ร่วมกันที่สภาวะความเข้มข้นต่ำ สารเคอควินสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนยับยั้งมะเร็งชนิด p53 และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสผ่านวิถี intrinsic pathway โดยการเพิ่มการแสดงออกของ pro-apoptotic protein Bax และ caspase-3 และทำให้โปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ชนิด phosphatidylserin (PS) เคลื่อนที่ออกมาด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มเสียสภาพ และนำไปสู่การตายแบบอะพอพโตซิสทั้ง early และ late stage ในที่สุด (104, 121, 122) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าการใช้สารเคอควินและ LGG CFS ร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งชนิด OSCC เข้าสู่ระยะการตายแบบ early และ late apoptosis ได้ เช่นเดียวกับการใช้สารเคอควินที่ระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งยังคงต้องมีการทดสอบต่อไปในอนาคต

อะพอพโตซิสเป็นแบบแผนการตายของเซลล์ที่ถูกควบคุมโดยยีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ความผิดปกติจากการยับยั้งอะพอพโตซิส จะทำให้สมดุลของเซลล์เสียไปและทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติเพิ่มจำนวนขึ้น นำไปสู่การรอดของเซลล์มะเร็งจากวัฏจักรเซลล์ และทำให้เกิดโรคมะเร็งได้หลายชนิดรวมถึงมะเร็งช่องปากชนิด OSCC (15) ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนายาเคมีบำบัดหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งช่องปากชนิด OSCC โดยมีโมเลกุลเป้าหมายคือการกระตุ้นโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส และยับยั้งโปรตีนที่ต่อต้านการตายแบบอะพอพโตซิส เพื่อยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง (11, 15) สารสกัดจากธรรมชาติที่นิยมนำมาศึกษาเพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ได้แก่ สารสกัดกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งพบในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น สาร catechins ซึ่งพบในใบชาเขียว และเคอควินซึ่งพบในขมิ้นชัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งชนิด OSCC เกิดการตายแบบอะพอพ

โตซิสได้ (125) สำหรับวิธีการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบได้แก่ intrinsic apoptotic (mitochondria-mediated) pathway และ extrinsic apoptotic pathway โปรตีน Bcl-2 family ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนที่ส่งเสริมให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส (Bad, Bid, Bim, Bak, Bax) และ โปรตีนที่ต่อต้านการตายแบบอะพอพโตซิส (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) มีบทบาทสำคัญในการควบคุม intrinsic apoptotic pathway เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าชนิดต่างๆ เช่น การได้รับยาเคมีบำบัดหรือสารสกัดจากธรรมชาติบางชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์ แสงอัลตราไวโอเล็ต จะส่งผลให้โครงสร้าง DNA ในเซลล์เสียหายและเกิดภาวะเครียดขึ้น นำไปสู่การสะสมโปรตีน p53 ขึ้นภายในเซลล์ และเริ่มกระตุ้นให้โปรตีน Bad, Bid และ Bim ทำงาน โปรตีนดังกล่าวจะกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสชนิด Bak และ Bax ให้ทำงาน โปรตีน Bak และ Bax จะเคลื่อนมาที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียส่วนนอกและกระตุ้นให้เกิดการซึมผ่านของสาร cytochrome c ออกมา จากนั้น สาร cytochrome c จะเข้าจับกับ apoptotic proteases-activating factor-1 (APAF-1) และ เอนไซม์ procaspase-9 เกิดเป็นสารเชิงซ้อนขนาดใหญ่ที่เรียกว่า apoptosome ภายใน apoptosome เอนไซม์ procaspase-9 จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นเอนไซม์ caspase-9 ที่พร้อมทำงาน ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ effector caspases เช่น เอนไซม์ caspase-3 ต่อไป เอนไซม์ caspase-3 มีหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างของเซลล์และ DNA จนนำไปสู่การตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ในที่สุด (49, 51, 52) เป็นที่ยอมรับกันว่าเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมถึงเซลล์มะเร็ง OSCC มีการแสดงออกของโปรตีนต่อต้านการตายแบบอะพอพโตซิสเพิ่มมากขึ้น นำไปสู่การหลบหลีกการตายแบบอะพอพโตซิสและทำให้พยากรณ์ของโรคแย่ลง (11)

โปรตีนต่อต้านการตายแบบอะพอพโตซิสที่สำคัญได้แก่ Bcl-2 ซึ่งจะสามารถจับกับโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสชนิด Bax และยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax นำไปสู่การยับยั้งการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์ (126) Pettersson และคณะในปี ค.ศ.2002 รายงานว่าการพิจารณาอัตราส่วนการแสดงออกของ Bax/Bcl-2 สามารถบ่งชี้ถึงกระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ได้แม่นยำกว่าการพิจารณาจากการแสดงออกของโปรตีน Bax หรือ Bcl-2 เพียงตัวเดียว โดยหากอัตราส่วนการแสดงออกของ Bax/Bcl-2 มีค่ามาก หมายถึงเซลล์ดังกล่าวมีการตายแบบอะพอพโตซิส

(127) สำหรับโปรตีนต่อต้านการตายแบบอะพอพโตซิสชนิด Bcl-xL และ Mcl-1 จะสามารถจับกับโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสชนิด Bak นำไปสู่การยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bak และยับยั้งการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์ โดยหากอัตราส่วนการแสดงออกของ Bcl-xL/Bak และ

Mcl-1/Bak มีค่ามากหมายถึงเซลล์นั้น ๆ สามารถหลบหลีกเลี่ยงการตายแบบอะพอพโตซิส (128) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อป้อนเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 ด้วยสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ *Bax/Bcl-2* ratio เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและการใช้สาร curcumin-L หรือ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียว และไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของ *Bax/Bcl-2* ratio ในเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ซึ่งสนับสนุนผลของการทดสอบด้วยเทคนิค Flow cytometry ที่พบว่าเคอควิมินและ LGG CFS ที่ความเข้มข้นต่ำร่วมกันนั้นมีฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโตซิสต่อเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่กระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของ *Bax/Bcl-2* ratio ยังเป็นตัวบ่งชี้กลไกในระดับโมเลกุลที่อาจเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโตซิสที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่าเคอควิมินและ LGG CFS ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่งผลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสที่จำเพาะต่อเซลล์ SCC-9 เท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 สามารถนำเคอควิมินและ LGG CFS เข้าสู่เซลล์และนิวเคลียสได้มากกว่าเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติ เนื่องจากคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งและเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกปกติมีความแตกต่างกัน และขนาดของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ จึงอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถนำเคอควิมินและ LGG CFS เข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าเซลล์ปกติ (129) นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 อาจมีการแสดงของยีนและโปรตีน NF- κ B มากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่ง NF- κ B ถือเป็นโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญของเคอควิมิน จึงพบผลกระทบของเคอควิมินในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ (129) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบวัดระดับการแสดงออกของ *Bax/Bcl-2* ratio เพียงคู่เดียว ทั้งนี้อาจมียีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายแบบอะพอพโตซิสชนิดอื่น เช่น ยีน *BCL2-Like 1 (BCL2L1)* ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีน *Bcl-xL Apaf1, Casp9* และ *Casp3* (48) ดังนั้นควรทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อให้ได้ผลที่ครอบคลุมกลไกการตายแบบอะพอพโตซิสที่มากขึ้น

การศึกษาก่อนหน้าจำนวนมากได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเคอควิมินในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มอัตราส่วนการแสดงออกของ *Bax/Bcl-2* และลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอหลายชนิด รวมถึงในเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเคอควิมินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสได้

(103, 104, 130, 131) สำหรับผลของ LGG CFS ต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโตซิส Orlando และคณะในปี ค.ศ.2016 ได้รายงานว่าการใช้ LGG ในรูปแบบที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^8 CFU/ml สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีอัตราการแสดงออกของยีน *Bax/Bcl-2* ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งนำไปสู่การตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (73) Gamallat และคณะในปี ค.ศ.2016 รายงานการใช้ LGG ในรูปแบบที่มีชีวิตความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีการแสดงออกของยีนและโปรตีน Bax และ caspase-3 ที่เพิ่มขึ้น และลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน Bcl-2 ลง จนนำไปสู่การตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลอง (74) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าทั้งสภาวะการใช้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L หรือการใช้สาร curcumin-L หรือ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ และไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของอัตราส่วนโปรตีน Bcl-xL/Bak และโปรตีน Mcl-1/Bak ทั้งในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ทั้งนี้อาจเกิดในขั้นตอนของการสกัดโปรตีนจากเซลล์ ไม่ได้มีการวัดปริมาณโปรตีนก่อนนำไปทดสอบกับชุดทดสอบ Apoptotic and Anti-apoptotic protein Bio-Plex Pro RBM apoptosis assays panel และอาจมีโปรตีนในปริมาณน้อย เมื่อมีการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนจึงกระทบต่อการวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นในการศึกษานี้ (132) ทั้งนี้โปรตีน Bcl-2, Bcl-xL และ Mcl-1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Bcl-2 family มีคุณสมบัติต่อต้านการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์เช่นเดียวกับโปรตีน Bcl-2 แต่ถูกควบคุมการสร้างจากยีนที่ต่างชนิดกัน โดยโปรตีน Bcl-2 ถูกควบคุมจากยีน *BCL2* โปรตีน Bcl-xL ถูกควบคุมจากยีน *BCL2L1* ในขณะที่โปรตีน Mcl-1 ถูกควบคุมจากยีน *BCL2L3* หรือ *MCL-1* gene (48, 49) โปรตีนเหล่านี้มีกระบวนการยับยั้งการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ที่ต่างกัน โดย Bcl-xL และ Mcl-1 จะเข้าจับกับ Bak ในขณะที่ Bcl-2 จะเข้าจับกับ Bax เพื่อยับยั้งกระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ (126, 128) ดังนั้นด้วยคุณสมบัติที่แตกต่างกันเหล่านี้ อาจทำให้โปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกที่แตกต่างกันเมื่อได้รับการกระตุ้น และในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *BCL2L1* และยีน *BCL2L3* จึงไม่สามารถบอกได้ถึงกลไกการตอบสนองของยีนดังกล่าวทั้งสอง ซึ่งอาจส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL/Bak และ Mcl-1/Bak ทั้งในเซลล์ SCC-9 และเซลล์ HGF ภายหลังถูกบ่มร่วมกับเคอควินและ LGG CFS อย่างไรก็ตามกลไกที่แน่ชัดของเคอควินและ LGG

CFS ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC ควรมีการศึกษาในระดับโมเลกุลและโปรตีนต่อไปในอนาคต

เคอคิวมินเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่พบในขมิ้นชัน และถูกศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติต่างๆ มาอย่างกว้างขวาง (129) ในขณะที่ข้อมูลของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่พบใน LGG CFS โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารที่มีบทบาทในการยับยั้งเซลล์มะเร็งยังคงมีอยู่อย่างจำกัด (78) Escamilla และคณะในปี ค.ศ.2012 ได้ทำการศึกษาประเภทของสารชีวโมเลกุลที่น่าจะเป็นองค์ประกอบของ LGG CFS ด้วยเทคนิค CFS size fractionation และพบว่าสารชีวโมเลกุลที่มีน้ำหนัก 50 – 100 kDa และมากกว่า 100 kDa ส่งผลในการลดการเคลื่อนถึงของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดอื่นๆ และกลุ่มควบคุม คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่าสารชีวโมเลกุลที่พบใน LGG CFS และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน่าจะเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยอาจเป็นโปรตีน กรดนิวคลีอิก หรือสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) (78) การศึกษาคั้งนี้ใช้เทคนิค LC-MS/MS วิเคราะห์องค์ประกอบของ LGG CFS ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการมีชีวิตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ SCC-9 เมื่อถูกใช้ในรูปแบบสารผสมร่วมกับเคอคิวมินในระดับความเข้มข้นต่ำ แต่ไม่ส่งผลต่อเซลล์ HGF จากการศึกษาพบว่ามีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนทั้งหมด 30 ชนิด โดยสามารถจำแนกโปรตีนดังกล่าวได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ประกอบไปด้วยโปรตีนกลุ่ม metabolic enzymes and protein และกลุ่ม surface layer protein ทั้งนี้ในปี ค.ศ. 2020 Zhang และคณะ ได้รายงานว่าการแสดงออกของโปรตีนยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด p53, p21 และ p16 และลดการแสดงออกของโปรตีนกำเนิดมะเร็งชนิด cyclin-dependent kinase และ cyclin B (133) นอกจากนี้ยังพบว่า surface layer protein ดังกล่าว ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งมีรูปร่างลักษณะในการตายแบบอะพอโทซิสเพิ่มขึ้น เช่น นิวเคลียสของเซลล์มะเร็งมีการเกาะกลุ่มกันของโครมาตินมากขึ้น (chromatin condensation) และนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเริ่มแสดงการเสื่อมสลาย (nuclear fragmentation) (133) จึงอาจเป็นไปได้ว่า surface layer protein ในโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus* Spp. มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ในขณะที่

โปรตีนในกลุ่ม metabolic enzymes and protein มีคุณสมบัติทำหน้าที่ในการช่วยดำรงชีพของแบคทีเรียดังกล่าว เช่น ย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือเป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ของแบคทีเรีย (134) อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบและสารชีวโมเลกุลใน LGG CFS ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อไปในอนาคต

ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้เคอควินร่วมกับยาเคมีบำบัดในการบำบัดรักษาเซลล์มะเร็งที่ดีต่อการใช้ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียวทั้งในรูปแบบหลอดทดลอง การใช้สัตว์ทดลองและการทดสอบทางคลินิก (135) สำหรับการศึกษาการใช้ LGG ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาในรูปแบบหลอดทดลองและการใช้สัตว์ทดลอง (24) ดังนั้นผลการศึกษาในงานวิจัยในครั้งนี้จึงถือเป็นการศึกษาเบื้องต้นของการนำเคอควินมาใช้ร่วมกับ LGG CFS ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC (SCC-9 cells) การศึกษาในขั้นถัดไปจึงควรนำสถานะการทดสอบดังกล่าวมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดอื่นๆ และเริ่มศึกษาด้วยการใช้สัตว์ทดลองในขั้นถัดไป สำหรับการศึกษาการบริโภคโพรไบโอติกแบคทีเรียชนิด LGG ในทางคลินิก Hibberd และคณะในปี ค.ศ.2014 รายงานว่าในกลุ่มตัวอย่างผู้สูงอายุอายุ 66 – 80 ปี ซึ่งบริโภค LGG ความเข้มข้น 10^{10} CFU/ml เป็นเวลา 28 วัน ไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรงจากการบริโภค LGG กลุ่มตัวอย่างบางส่วนมีเพียงอาการท้องอืดและคลื่นไส้ในระดับอาการไม่รุนแรงบ้าง แม้ว่าการใช้ LGG จะมีความปลอดภัยสูงในทางคลินิก อย่างไรก็ตามการใช้ LGG ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องควรพิจารณาอย่างรอบคอบและควรอยู่ภายใต้ความควบคุมของแพทย์ (80)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้พบว่าสถานะการใช้สารผสมระหว่างเคอควินและ LGG CFS ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (curcumin-L+LGG CFS-L) สามารถยับยั้งการชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 และกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด SCC-9 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยเพิ่มอัตราส่วนการแสดงออกของยีน Bax/Bcl-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและการใช้สถานะ curcumin-L หรือ LGG CFS-L เพียงอย่างเดียว และยังเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ทั้งนี้สารผสม curcumin-L+LGG CFS-L ไม่มีผลกระทบหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก HGF ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ โดยพบว่าสารที่มีความเป็นไปได้ในการออกฤทธิ์

ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่พบใน LGG CFS เป็นสารประเภทโปรตีน การศึกษากลไกของเคอคิวมินและ LGG CFS ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด OSCC และประสิทธิภาพของการใช้สารผสมระหว่างเคอคิวมินและ LGG CFS รวมไปถึงความปลอดภัยกรณีนำมาใช้ในทางคลินิกยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต



ภาคผนวก

ชนิดของโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของ LGG CFS ที่ผ่านการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

Protein group	Protein ID	Average mass	Description
6	33	311888	Putative cell surface protein
6	32	311888	Peptidase
6	31	311916	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein
6	30	311872	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein
358	25950	95242	Metal ABC transporter ATPase
358	25949	95089	Magnesium-transporting ATPase
358	25948	95163	Cation-translocating P-type ATPase
358	25947	95089	HAD-IC family P-type ATPase
358	25946	95143	Cation-translocating P-type ATPase
358	25945	95149	Magnesium-transporting ATPase
358	25944	95145	HAD-IC family P-type ATPase
358	25943	95155	Cation-transporting ATPase
358	3886	99719	Calcium-transporting ATPase
358	3885	99719	Cation-transport ATPase
80	25953	39492	Alpha-L-rhamnosidase
80	25960	102362	Alpha-L-rhamnosidase
80	25959	102479	Alpha-L-rhamnosidase
80	25958	102362	Alpha-L-rhamnosidase
80	25957	102411	Alpha-L-rhamnosidase
80	25956	102370	Alpha-L-rhamnosidase
80	25955	102490	Alpha-L-rhamnosidase
80	25954	102384	Alpha-L-rhamnosidase
80	3940	102413	Alpha-L-rhamnosidase
8	23	284458	Gram positive anchoring domain-containing protein
66	815	84440	Restriction endonuclease
55	4996	35158	exopolyphosphatase
55	323	35158	exopolyphosphatase

55	322	35158	exopolyphosphatase
25	39	322760	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein
223	25963	36315	Catabolite control protein A
223	25962	36315	Catabolite control protein A
223	25961	36312	Catabolite control protein A
40	121	381991	Adhesin
40	247	381772	Adhesin
362	25965	68034	Oligoendopeptidase
83	25980	46140	Transposase
83	25979	46023	Transposase
83	25978	46149	IS200/IS605 family element transposase accessory protein
83	25977	46140	IS200/IS605 family element transposase accessory protein
83	25976	46182	IS200/IS605 family element transposase accessory protein
83	25975	46173	Transposase
69	25972	71443	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein
69	25971	71492	ATPase components of ABC transporter with duplicated ATPase domain
69	25970	71478	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein
69	25969	71462	ATP-binding cassette domain-containing protein
69	25968	71468	ABC transporter ATP-binding protein
69	25967	71468	ABC transporter ATP-binding protein
69	25966	71492	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein
69	5516	71434	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein
24	5719	54509	Citrate lyase alpha chain
24	5718	54509	Citrate lyase alpha chain
24	3601	54592	Citrate lyase alpha chain

24	3600	54549	Citrate lyase alpha chain
24	3599	54354	Citrate lyase alpha chain
24	3598	54549	Citrate lyase alpha chain
24	3597	54569	Citrate lyase alpha chain
24	3596	54550	Citrate lyase alpha chain
24	3595	54563	Citrate lyase alpha chain
363	25974	34511	3' to 5' oligoribonuclease
363	6199	34307	Oligoribonuclease
30	265	74477	Alpha/beta fold hydrolase
30	264	74493	Acylamino-acid-releasing enzyme
30	263	74455	Peptidase S9
30	262	74434	Alpha/beta fold hydrolase
30	261	74434	S9 family peptidase
30	260	74531	Peptidase S9
30	259	74501	S9 family peptidase
30	258	74407	S9 family peptidase
48	626	207639	S8 family serine peptidase
48	655	209553	S8 family serine peptidase
48	1092	206585	Endopeptidase lactocepin
48	853	206646	Peptidase S8
48	2220	207537	Peptidase S8
48	3503	204658	S8 family serine peptidase
48	2178	205653	Gram positive anchoring domain-containing protein
49	5883	65654	L-fucose isomerase
49	5882	65684	L-fucose isomerase
49	5881	65684	L-fucose isomerase
49	5880	65684	L-fucose isomerase
47	20779	56144	ABC transporter substrate-binding protein
139	25984	36014	Ppic domain-containing protein
139	5636	35919	Ppic domain-containing protein
164	1389	20394	Acetyltransferase
56	487	91724	Leucine tRNA ligase
56	482	90849	Leucine tRNA ligase

56	846	91721	Leucine tRNA ligase
56	488	91682	Leucine tRNA ligase
56	486	91680	Leucine tRNA ligase
56	485	91740	Leucine tRNA ligase
56	484	91636	Leucine tRNA ligase
56	483	91682	Leucine tRNA ligase
372	2414	93587	Fn3 like domain containing protein
232	147	137020	ATPase
232	100	136876	BREX system P-loop protein
232	99	136607	BREX system P-loop protein
232	98	136635	BREX system P-loop protein
232	97	136952	ATPase family protein
232	96	136903	ATPase
232	95	136607	ATPase
373	21550	22054	MarR family transcriptional regulator
23	207	133373	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
23	206	133373	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
23	211	133850	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
23	210	133908	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
23	209	133892	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
23	208	133850	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
23	842	133705	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
376	25987	26463	HNHc domain-containing protein
379	25988	37881	HTH araC/xylS-type domain-containing protein
71	20875	103622	3'-5' exonuclease DinG
234	21983	37466	Diacylglycerol kinase
234	21982	37496	Diacylglycerol kinase

234	21981	37496	Diacylglycerol kinase
234	21980	37496	Transcription regulator
234	25991	12217	Putative lipid kinase
234	21994	37419	Lipid kinase
158	6656	80902	DUF262 domain-containing protein
94	2998	90106	Primosomol protein N'
94	2997	901110	Primosomol protein N'
94	2996	90074	Primosomol protein N'
94	2995	90008	Primosomol protein N'
94	2994	90074	Primosomol protein N'
94	2993	90086	Primosomol protein N'
3	334	18244	PTS fructose transporter subunit IIB
3	333	18214	PTS fructose transporter subunit IIB
141	2109	25070	Aminotransferase
141	2116	44043	Aminotransferase
141	2114	44130	Aspartate aminotransferase
141	2112	44172	Transcriptional regulator
237	25995	13381	Uncharacterized protein
389	5539	27774	WYL domain-containing protein
162	5804	64181	PTS system mannitol-specific EIICB component
162	4114	64225	PTS system mannitol-specific EIICB component
162	4113	64225	PTS system mannitol-specific EIICB component
162	4102	64194	PTS system mannitol-specific EIICB component
162	4101	64195	PTS system mannitol-specific EIICB component
162	4100	64195	PTS system mannitol-specific EIICB component
393	25998	5550	Phenylalanyl tRNA synthetase alpha subunit
50	3245	88747	Ribonuclease R
50	3224	88793	Ribonuclease R

50	3242	88749	Ribonuclease R
50	3241	88749	Ribonuclease R
50	3240	88763	Ribonuclease R
50	3239	88723	Ribonuclease R
239	21053	73580	WxL domain-containing protein
239	21055	73926	Putative cell surface protein
239	21054	73926	WxL domain-containing protein
398	26004	18307	Glycerol kinase
398	26007	55645	Glycerol kinase
398	26006	55622	Glycerol kinase
398	7543	55651	Glycerol kinase
398	7542	55622	Glycerol kinase
398	7540	55635	Glycerol kinase
401	5137	61487	Alpha-rhamnosidase
403	2869	41841	Chaperone protein DnaK
403	2868	41827	Chaperone protein DnaK
403	2630	67221	Chaperone protein DnaK
403	2629	67221	Chaperone protein DnaK
403	2628	67235	Chaperone protein DnaK
403	2627	67190	Chaperone protein DnaK
403	2626	67221	Chaperone protein DnaK
403	2625	67220	Chaperone protein DnaK
403	2631	67564	Chaperone protein DnaK
32	136	24861	DUF4867 domain-containing protein
32	135	24847	DUF4867 domain-containing protein
408	305	29990	Lipoprotein
408	303	29990	Lipoprotein
168	4895	46401	GTPase Obg
168	4894	46446	GTPase Obg
168	4893	46446	GTPase Obg
168	4892	46387	GTPase Obg
168	4887	46549	GTPase Obg
93	21065	28431	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha

93	21066	28532	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
251	2988	89646	Protein translocase subunit SecA
167	4774	1099706	Lant_dyhydr_N domain-containing protein
413	26017	67919	Beta-galactosidase
414	5135	34190	Sugar kinase
414	5134	34181	2-dehydro-3-deoxygluconate kinase
414	5133	34178	Sugar kinase
414	5132	34211	2-dehydro-3-deoxygluconate kinase
414	5131	34178	2-dehydro-3-deoxygluconate kinase
414	5130	34178	Sugar kinase
254	3273	51374	Family 59 glycoside hydrolase
422	6592	57483	BREX-1 system adenine-specific DNA-methyltransferase PglX
422	1954	85570	Putative restriction enzyme
422	1955	85747	BREX-1 system adenine-specific DNA-methyltransferase PglX
422	1813	139294	Restriction endonuclease subunit M
422	1814	139471	Mmel_Mtase domain-containing protein
257	26025	27145	ABC transporter ATPase
423	20629	34872	Alpha/beta hydrolase
423	26028	34900	Alpha/beta hydrolase
423	26027	34900	Alpha/beta hydrolase
423	26026	34900	Alpha/beta hydrolase
423	26030	38321	Alpha/beta hydrolase
425	5026	13460	PepSY domain-containing protein
161	5309	79072	DUF262 domain-containing protein
161	5308	79072	DUF262 domain-containing protein
429	26036	27927	Regulatory protein DeoR
429	26935	27716	Alkaline phosphatase
176	4700	77729	Glycosyltransferase family 39 protein
176	4701	77695	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase

176	21244	78054	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase
176	21243	78054	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase
176	4702	78009	PMT_2 domain-containing protein
176	4703	78334	Glycosyltransferase family 39 protein
176	4704	78636	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase
432	4725	139791	Phage tail tape measure protein
145	7348	83507	Penicillin-binding protein
145	7338	83590	Penicillin-binding protein
145	7337	83636	Penicillin-binding protein
145	7335	83493	Penicillin-binding protein
145	7334	83564	Penicillin-binding protein
145	7333	83592	Penicillin-binding protein
145	7332	83495	Penicillin-binding protein
434	5020	42107	Phage portal protein
180	26040	36930	Beta-lactamase
181	5853	22287	Tetraphosphatase
181	22569	22678	Tetraphosphatase
181	5856	22678	Tetraphosphatase
181	5855	22678	Tetraphosphatase
181	5854	22678	Tetraphosphatase
441	2514	84649	GTP diphosphokinase
441	2513	84548	GTP diphosphokinase
441	2512	84596	GTP diphosphokinase
441	2511	84548	GTP diphosphokinase
441	2510	84548	GTP diphosphokinase
100	2389	48608	Fumarate hydratase class II
448	26062	59092	Glycosyl transferase family 1
440	21631	47473	dipeptidase
440	21637	48243	Acetylmethionine deacetylase
440	21636	47898	Sapap family Mn ²⁺ -dependent dipeptidase
440	21635	48157	Peptidase

440	21634	48120	Peptidase
440	21633	48337	Sapep family Mn ²⁺ -dependent dipeptidase
440	21632	48120	Dipeptidase
270	20949	56319	Acyl-CoA synthelase
446	26053	54211	PspC domain-containing protein
Protein group	Protein ID	Average mass	Description
446	26052	54234	PspC domain-containing protein
446	26051	54276	DUF4097 family beta strand repeat protein
446	26050	54232	DUF4097 domain-containing protein
446	26049	54218	PspC domain-containing protein
446	7220	54245	DUF4097 family beta strand repeat protein
446	7219	54290	Daptomycin-sensing surface protein
446	7218	54276	PspC domain-containing protein
451	26069	72554	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein
451	26068	72479	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein
451	26067	72542	ABC transporter ATP-binding protein
451	26066	72544	ABC transporter ATP-binding protein
451	26065	72560	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein
451	26064	72542	ABC transporter ATP-binding protein
451	3529	72493	ATP-binding cassette domain-containing protein
451	5313	51672	Amidohydrolase
452	5312	51840	Amidohydrolase
454	26074	34885	Site-specific DNA-methyltransferase
457	5336	19620	MucBP domain-containing protein
103	130	32686	AP endonuclease
279	481	58168	Putative minor capsid protein



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(1):60-72.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
3. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):228-40.
4. Muller S, Tilakaratne WM. Update from the 5th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumors: tumours of the oral cavity and mobile tongue. *Head Neck Pathol.* 2022;16(1):54-62.
5. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):182-96.
6. Mello FW, Melo G, Pasetto JJ, Silva CAB, Warnakulasuriya S, Rivero ERC. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2019;23(7):2849-59.
7. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck.* 2017;39(2):297-304.
8. La Rosa GRM, Gattuso G, Pedullà E, Rapisarda E, Nicolosi D, Salmeri M. Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncol Lett.* 2020;19(4):3045-58.
9. Karpinski TM. Role of oral microbiota in cancer development. *Microorganisms.* 2019;7(1):20.
10. Sakamoto Y, Matsushita Y, Yamada S, Yanamoto S, Shiraishi T, Asahina I, et al. Risk factors of distant metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;121(5):474-80.
11. Dwivedi R, Pandey R, Chandra S, Mehrotra D. Apoptosis and genes involved in oral cancer - a comprehensive review. *Oncol Rev.* 2020;14(2):472.

12. Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Caspase expression in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011;33(8):1191-8.
13. Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann Clin Biochem*. 2005;42(Pt 6):415-31.
14. Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*. 1999;86(6):913-20.
15. Zhang M, Zhang P, Zhang C, Sun J, Wang L, Li J, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(3):307-13.
16. Andressakis D, Lazaris AC, Tsiambas E, Kavantzas N, Rapidis A, Patsouris E. Evaluation of caspase-3 and caspase-8 deregulation in tongue squamous cell carcinoma, based on immunohistochemistry and computerised image analysis. *J Laryngol Otol*. 2008;122(11):1213-8.
17. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
18. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Canada 2002.
19. Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, et al. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr*. 2010;61(5):473-96.
20. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*. 2000;130(2S Suppl):396s-402s.
21. Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *J Clin Gastroenterol*. 2019;53 Suppl 1:S1-s41.
22. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*. 2006;100(6):1171-85.

23. Stage M, Wichmann A, Jørgensen M, Vera-Jiménez NI, Wielje M, Nielsen DS, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG genomic and phenotypic stability in an industrial production process. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(6):e02780-19.
24. Banna GL, Torino F, Marletta F, Santagati M, Salemi R, Cannarozzo E, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG: an overview to explore the rationale of its use in cancer. *Front Pharmacol.* 2017;8:603.
25. Cheng Z, Xu H, Wang X, Liu Z. Lactobacillus raises in vitro anticancer effect of geniposide in HSC-3 human oral squamous cell carcinoma cells. *Exp Ther Med.* 2017;14(5):4586-94.
26. Devassy JG, Nwachukwu ID, Jones PJ. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr Rev.* 2015;73(3):155-65.
27. Liao S, Xia J, Chen Z, Zhang S, Ahmad A, Miele L, et al. Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of Notch-1 and NF- κ B signaling pathways. *J Cell Biochem.* 2011;112(4):1055-65.
28. Zhou S, Zhang S, Shen H, Chen W, Xu H, Chen X, et al. Curcumin inhibits cancer progression through regulating expression of microRNAs. *Tumour Biol.* 2017;39(2):1010428317691680.
29. Wang D, Veena MS, Stevenson K, Tang C, Ho B, Suh JD, et al. Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor kappaB by an AKT-independent pathway. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6228-36.
30. Lu JJ, Wang YT. Identification of anti-cancer compounds from natural products. *Chin J Nat Med.* 2020;18(7):481-2.
31. Ghiamati Yazdi F, Soleimani-Zad S, van den Worm E, Folkerts G. Turmeric extract: potential use as a prebiotic and anti-inflammatory compound? *Plant Foods Hum Nutr.* 2019;74(3):293-9.
32. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(2):167-78.

33. Licitra L, Mesia R, Keilholz U. Individualised quality of life as a measure to guide treatment choices in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2016;52:18-23.
34. Krishna Rao SV, Mejia G, Roberts-Thomson K, Logan R. Epidemiology of oral cancer in Asia in the past decade-an update (2000-2012). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(10):5567-77.
35. Jiang X, Wu J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tob Induc Dis.* 2019;17:29.
36. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Prognostic significance of p53 protein overexpression in betel- and tobacco-related oral oncogenesis. *Int J Cancer.* 1998;79(4):370-5.
37. Azad N, Kumari Maurya M, Kar M, Goel MM, Singh AK, Sagar M, et al. Expression of GLUT-1 in oral squamous cell carcinoma in tobacco and non-tobacco users. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(1):24-30.
38. Ravi D, Nalinakumari KR, Rajaram RS, Nair MK, Pillai MR. Expression of programmed cell death regulatory p53 and bcl-2 proteins in oral lesions. *Cancer Lett.* 1996;105(2):139-46.
39. Tagaino R, Washio J, Abiko Y, Tanda N, Sasaki K, Takahashi N. Metabolic property of acetaldehyde production from ethanol and glucose by oral *Streptococcus* and *Neisseria*. *Sci Rep.* 2019;9(1):10446.
40. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* 2007;43(2):181-6.
41. Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(3):425-34.
42. Hazarey VK, Erlewad DM, Mundhe KA, Ughade SN. Oral submucous fibrosis: study of 1000 cases from central India. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(1):12-7.
43. Wang YY, Tail YH, Wang WC, Chen CY, Kao YH, Chen YK, et al. Malignant transformation in 5071 southern Taiwanese patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *BMC Oral Health.* 2014;14:99.

44. Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The oral microbiota may have influence on oral cancer. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:476.
45. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):405-11.
46. Fukumoto C, Ogisawa S, Tani M, Hyodo T, Kamimura R, Sawatani Y, et al. Clinical characteristics, treatment methods and prognoses of patients with oral squamous cell carcinoma in Japanese population: a single institution retrospective cohort study. *BMC Geriatr.* 2020;20(1):487.
47. Rai KH, Ahmed J. A correlative study of N-Cadherin expression with different grades of oral squamous cell carcinoma projecting as a marker of epithelial to mesenchymal transition in tumor progression. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(8):2327-32.
48. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3):528-37.
49. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
50. Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2004;6(25):1-23.
51. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-19.
52. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol.* 2003;22(1):15-20.
53. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 2002;88 Suppl 1:S39-49.
54. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microb Cell Fact.* 2014;13 Suppl 1(Suppl 1):S7.
55. Singh RP, Damle SG, Chawla A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand.* 2011;69(6):389-94.

56. Hedayati-Hajikand T, Lundberg U, Eldh C, Twetman S. Effect of probiotic chewing tablets on early childhood caries--a randomized controlled trial. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):112.
57. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(42):15611-6.
58. Pace F, Pace M, Quartarone G. Probiotics in digestive diseases: focus on *Lactobacillus* GG. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2015;61(4):273-92.
59. De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;259(1):89-96.
60. Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, et al. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiol Res*. 2011;167(1):27-31.
61. Lu R, Fasano S, Madayiputhiya N, Morin NP, Nataro J, Fasano A. Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus* GG conditional media that exert both anti-Gram-negative and Gram-positive bactericidal activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;49(1):23-30.
62. Rokka S, Myllykangas S, Joutsjoki V. Effect of specific colostral antibodies and selected lactobacilli on the adhesion of *Helicobacter pylori* on AGS cells and the Helicobacter-induced IL-8 production. *Scand J Immunol*. 2008;68(3):280-6.
63. Mailänder-Sánchez D, Braunsdorf C, Grumaz C, Müller C, Lorenz S, Stevens P, et al. Antifungal defense of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG is mediated by blocking adhesion and nutrient depletion. *PLoS One*. 2017;12(10):e0184438.
64. Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(1):119-21.
65. Ou CY, Kuo HC, Wang L, Hsu TY, Chuang H, Liu CA, et al. Prenatal and postnatal probiotics reduces maternal but not childhood allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(9):1386-96.

66. Verma ND, Hall BM, Plain KM, Robinson CM, Boyd R, Tran GT, et al. Interleukin-12 (IL-12p70) promotes induction of highly potent Th1-Like CD4(+)CD25(+) T regulatory cells that inhibit allograft rejection in unmodified recipients. *Front Immunol.* 2014;5:190.
67. Szajewska H, Kotodziej M. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(10):1149-57.
68. Blaabjerg S, Artzi DM, Aabenhus R. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in outpatients-A systematic review and meta-analysis. *Antibiotics (Basel).* 2017;6(4):21.
69. Francavilla R, Miniello V, Magistà AM, De Canio A, Bucci N, Gagliardi F, et al. A randomized controlled trial of *Lactobacillus* GG in children with functional abdominal pain. *Pediatrics.* 2010;126(6):e1445-52.
70. Kajander K, Myllyluoma E, Rajilić-Stojanović M, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Järvenpää S, et al. Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27(1):48-57.
71. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* 2001;35(6):412-20.
72. Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursoy U, Salminen S, Fontana M, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig.* 2015;19(1):77-83.
73. Orlando A, Linsalata M, Russo F. Antiproliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int J Oncol.* 2016;48(6):2629-38.
74. Gamallat Y, Meyiah A, Kuugbee ED, Hago AM, Chiwala G, Awadasseid A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:536-41.

75. Seow SW, Cai S, Rahmat JN, Bay BH, Lee YK, Chan YH, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG induces tumor regression in mice bearing orthotopic bladder tumors. *Cancer Sci.* 2010;101(3):751-8.
76. Behzadi E, Mahmoodzadeh Hosseini H, Imani Fooladi AA. The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. *Microb Pathog.* 2017;110:1-6.
77. Linsalata M, Cavallini A, Messa C, Orlando A, Refolo MG, Russo F. *Lactobacillus rhamnosus* GG influences polyamine metabolism in HGC-27 gastric cancer cell line: a strategy toward nutritional approach to chemoprevention of gastric cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16(7):847-53.
78. Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutr Cancer.* 2012;64(6):871-8.
79. Scalabrin D, Harris C, Johnston WH, Berseth CL. Long-term safety assessment in children who received hydrolyzed protein formulas with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a 5-year follow-up. *Eur J Pediatr.* 2017;176(2):217-24.
80. Hibberd PL, Kleimola L, Fiorino AM, Botelho C, Haverkamp M, Andreyeva I, et al. No evidence of harms of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in healthy elderly—a phase I open label study to assess safety, tolerability and cytokine responses. *PLoS One.* 2014;9(12):e113456.
81. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007;4(6):807-18.
82. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):787-809.
83. Payton F, Sandusky P, Alworth WL. NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod.* 2007;70(2):143-6.
84. Niamsa N SC. Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. *J Pharmaco Toxicol* 2009;4(4):173-7.
85. De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB, et al. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1592-7.

86. Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M. Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(4):1065-72.
87. Kundu P, De R, Pal I, Mukhopadhyay AK, Saha DR, Swarnakar S. Curcumin alleviates matrix metalloproteinase-3 and -9 activities during eradication of *Helicobacter pylori* infection in cultured cells and mice. *PLoS One*. 2011;6(1):e16306.
88. Chen DY SJ, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, et al. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food Chemistry*. 2010;119(4):1346-51.
89. Si X, Wang Y, Wong J, Zhang J, McManus BM, Luo H. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system by curcumin suppresses coxsackievirus B3 replication. *J Virol*. 2007;81(7):3142-50.
90. Kim HJ, Yoo HS, Kim JC, Park CS, Choi MS, Kim M, et al. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *J Ethnopharmacol*. 2009;124(2):189-96.
91. Kim MK, Choi GJ, Lee HS. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J Agric Food Chem*. 2003;51(6):1578-81.
92. Khan N, Shreaz S, Bhatia R, Ahmad SI, Muralidhar S, Manzoor N, et al. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. *Fitoterapia*. 2012;83(3):434-40.
93. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:105-25.
94. Karimian MS, Pirro M, Johnston TP, Majeed M, Sahebkar A. Curcumin and endothelial function: evidence and mechanisms of protective effects. *Curr Pharm Des*. 2017;23(17):2462-73.
95. Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate*. 2001;47(4):293-303.
96. Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*. 2001;20(52):7597-609.

97. Sundram V, Chauhan SC, Jaggi M. Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. *Mol Cancer Res.* 2011;9(8):985-96.
98. Mukhopadhyay A B-RC, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Integr Cancer Ther.* 2004;3(4):349-80.
99. Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, Asangani IA, Kumarswamy R, Nelson LD, et al. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci Rep.* 2011;31(3):185-97.
100. Su CC, Lin JG, Li TM, Chung JG, Yang JS, Ip SW, et al. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 2006;26(6b):4379-89.
101. Hu S, Xu Y, Meng L, Huang L, Sun H. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):1266-72.
102. Zlotogorski A, Dayan A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer—I: Curcumin. *Oral Oncol.* 2013;49(3):187-91.
103. Abdolahinia ED, Ahmadian S, Bohlouli S, Gharehbagh FJ, Jahandizi NG, Vahed SZ, et al. Effect of curcumin on the head and neck squamous cell carcinoma cell line HN5. *Curr Mol Pharmacol.* 2023;16(3):374-80.
104. Ma C, Zhuang Z, Su Q, He J, Li H. Curcumin has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on tongue cancer in vitro: A study with bioinformatics analysis and *in vitro* experiments. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:509-18.
105. Lin C, Tu C, Ma Y, Ye P, Shao X, Yang Z, et al. Curcumin analog EF24 induces apoptosis and downregulates the mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):4927-33.
106. Lee AY, Fan CC, Chen YA, Cheng CW, Sung YJ, Hsu CP, et al. Curcumin inhibits invasiveness and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma through reducing matrix metalloproteinase 2, 9 and modulating p53-E-Cadherin pathway. *Integr Cancer Ther.* 2015;14(5):484-90.

107. Zhen L, Fan D, Yi X, Cao X, Chen D, Wang L. Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(10):6438-46.
108. Shin HK, Kim J, Lee EJ, Kim SH. Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-kappaB activations. *Phytother Res*. 2010;24(4):577-82.
109. de Campos PS, Matte BF, Diel LF, Jesus LH, Bernardi L, Alves AM, et al. Low doses of *Curcuma longa* modulates cell migration and cell-cell adhesion. *Phytother Res*. 2017;31(9):1433-40.
110. The hemocytometer (counting chamber). Grid layout of the Neubauer improved hemocytometer [image on internet]. 2010 [Updated 2010 July 9; cited 2021 May 5]. Available from <https://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber>.
111. Spampinato C, De Maria S, Samataro M, Giordano E, Zanfardino M, Baiano S, et al. Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression. *Int J Oncol*. 2012;40(4):935-41.
112. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):309-16.
113. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1033.
114. Liu T, Long T, Li H. Curcumin suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma through a specificity protein 1/nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Exp Ther Med*. 2021;21(3):202.
115. Xiao C, Wang L, Zhu L, Zhang C, Zhou J. Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma SCC-9 cells proliferation by regulating miR-9 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(4):576-80.
116. Aziz Mousavi SMA, Mirhosseini SA, Rastegar Shariat Panahi M, Mahmoodzadeh Hosseini H. Characterization of biosynthesized silver nanoparticles using *Lactobacillus rhamnosus* GG and its *in vitro* assessment against colorectal cancer cells. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;12(2):740-6.

117. Nouri Z, Neyazi N, Modarressi, Karami F, Abedin-Do A, Taherian-Esfahani Z, et al. Down-regulation of TSGA10, AURKC, OIP5 and AKAP4 genes by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus crispatus* SJ-3C-US supernatants in HeLa cell line. *Klin Onkol*. 2018;31(6):429-33.
118. Cianfruglia L, Minnelli C, Laudadio E, Scirè A, Armeni T. Side effects of curcumin: epigenetic and antiproliferative implications for normal dermal fibroblast and breast cancer cells. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(9):382.
119. Burgos-Morón E, Calderón-Montaña JM, Salvador J, Robles A, López-Lázaro M. The dark side of curcumin. *Int J Cancer*. 2010;126(7):1771-5.
120. Xu Y, Xin Y, Diao Y, Lu C, Fu J, Luo L, et al. Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e29169.
121. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. *In vitro* inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol*. 2003;22(1):107-13.
122. Chen CW, Hsieh MJ, Ju PC, Hsieh YH, Su CW, Chen YL, et al. Curcumin analog HO-3867 triggers apoptotic pathways through activating JNK1/2 signalling in human oral squamous cell carcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2022;26(8):2273-84.
123. Almalki Z, Algregri M, Alhosin M, Alkhaled M, Damiati S, Zamzami MA. *In vitro* cytotoxicity of curcuminoids against head and neck cancer HNO97 cell line. *Braz J Biol*. 2021;83:e248708.
124. Dehghani N, Tafvizi F, Jafari P. Cell cycle arrest and anti-cancer potential of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* against HT-29 cancer cells. *Bioimpacts*. 2021;11(4):245-52.
125. Sakamoto H. Apoptosis-inducing activity and tumor-specificity of antitumor agents against oral squamous cell carcinoma. *Jpn Dent Sci Rev*. 2010;46:173-87.
126. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol*. 2012;2012:524308.
127. Pettersson F, Dalgleish AG, Bissonnette RP, Colston KW. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax. *Br J Cancer*. 2002;87(5):555-61.

128. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005;19(11):1294-305.
129. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *Aaps j.* 2009;11(3):495-510.
130. Subramaniam D, Ponnurangam S, Ramamoorthy P, Standing D, Battafarano RJ, Anant S, et al. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PLoS One.* 2012;7(2):e30590.
131. Mou S, Zhou Z, He Y, Liu F, Gong L. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of laryngeal cancer cells through Bcl-2 and PI3K/Akt, and by upregulating miR-15a. *Oncol Lett.* 2017;14(4):4937-42.
132. Bio-Plex Pro™ RBM Apoptosis Assays Datasheet. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10033631.pdf>.
133. Zhang T, Pan D, Yang Y, Jiang X, Zhang J, Zeng X, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 S-Layer Protein on Colon Cancer HT-29 Cell Proliferation and Apoptosis. *J Agric Food Chem.* 2020;68(9):2639-47.
134. Liu C, Zheng J, Ou X, Han Y. Anti-cancer substances and safety of lactic acid bacteria in clinical treatment. *Front Microbiol.* 2021;12:722052.
135. Tan BL, Norhaizan ME. Curcumin combination chemotherapy: the implication and efficacy in cancer. *Molecules.* 2019;24(14):2527.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายชัชพันธ์ อุดมพัฒนากร
วัน เดือน ปี เกิด	11 มิถุนายน 2532
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	89/1133 ม.โชคชัยคลองจั่น ซ.โอฬาร 2 ถ.นวมินทร์ แขวงนวมินทร์ เขตบึง กุ่ม กทม. 10240



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY