

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวัดค่าโพลีฟีนอลโดยรวม

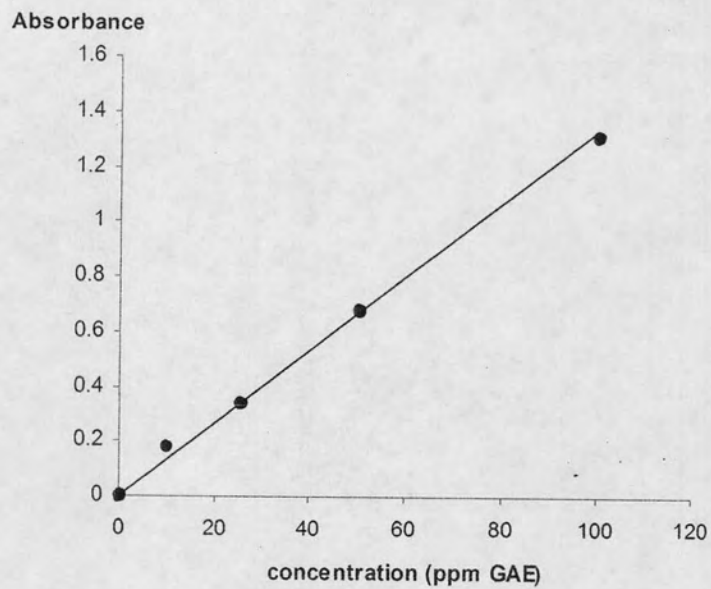
ในการทดลองนี้ได้มีการสกัดสารจากแอปเปิ้ลในรูปของสารสกัดอย่างหยาบทั้งหมด 3 วิธีด้วยกัน เพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดที่สามารถให้ค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมได้สูงที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการทดลองกับเซลล์มะเร็งในการทดลองขั้นต่อไป โดยสามารถสรุปความแตกต่างของแต่ละวิธีการสกัดได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 5 : ความแตกต่างในแต่ละวิธีการสกัดแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธี

ขั้นตอนการสกัด	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3
ตัวทำละลาย	90% เอทานอล	90% เอทานอล	100% เมทานอล
กรรมวิธีของไนโตรเจนเหลว	-	/	/
กรรมวิธีของ Lyophilize	-	/	-
กรรมวิธีของ Sonicate	-	/	-
กระบวนการระเหยแห้งเพื่อเอาตัวทำละลายออก (Evaporation)	/	/	/

เมื่อได้สารสกัดจากแอปเปิ้ลอย่างหยาบจากวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีแล้ว เนื่องจากในการสกัดสารจากแอปเปิ้ลนั้น จะต้องทำการสกัดโดยแบ่งแอปเปิ้ลออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ ส่วนของเนื้อและเปลือกของแอปเปิ้ล นอกจากนี้ยังแบ่งการสกัดออกเป็น 3 วิธี อันได้แก่ สารสกัดจากเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1, สารสกัดจากเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 2 และ สารสกัดจากเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 รวมทั้งสิ้นจำนวน 6 ตัวอย่าง

จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่างมาทำการวัดเพื่อหาค่าโพลีฟีนอลโดยรวม ตามหลักการของ Folin-Ciocalteu โดยค่าโพลีฟีนอลโดยรวมที่ได้จะรายงานในหน่วย ppm (mg/l) ของ Gallic acid equivalent (ppm GAE) ตามตาราง เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกดังต่อไปนี้



ภาพที่ 18 : กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ตารางที่ 6 : ค่าโพลีฟีนอลโดยรวมในแต่ละสารสกัดจากแอปเปิ้ล

สารสกัดแอปเปิ้ลอย่างหยาบ	ppm GAE
<u>วิธีการสกัดแบบที่ 1</u>	
- เปลือกแอปเปิ้ล	44,962.41
- เนื้อแอปเปิ้ล	19,661.65
<u>วิธีการสกัดแบบที่ 2</u>	
- เปลือกแอปเปิ้ล	18,609.02
- เนื้อแอปเปิ้ล	9,436.09
<u>วิธีการสกัดแบบที่ 3</u>	
- เปลือกแอปเปิ้ล	43,721.80
- เนื้อแอปเปิ้ล	11,390.98

จากตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่วัดได้ สามารถนำมาเรียงจัดลำดับ จากค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมจากมากไปน้อยได้ดังต่อไปนี้

เนื้อแอปเปิ้ล

1. เนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1
2. เนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3
3. เนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 2

เปลือกแอปเปิ้ล

1. เปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1
2. เปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3
3. เปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 2

ซึ่งในการทดลองขั้นนี้ ผู้ทำการทดลองยังไม่สามารถที่จะคัดเลือกสารสกัดใดสารสกัดหนึ่งเพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้ แต่ได้นำสารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่างมาทำเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น (Stock solution) ได้ดังต่อไปนี้ โดยความเข้มข้นตั้งต้นที่เตรียมได้ จะแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารสกัดนั้นๆ ในตัวทำละลาย DMSO

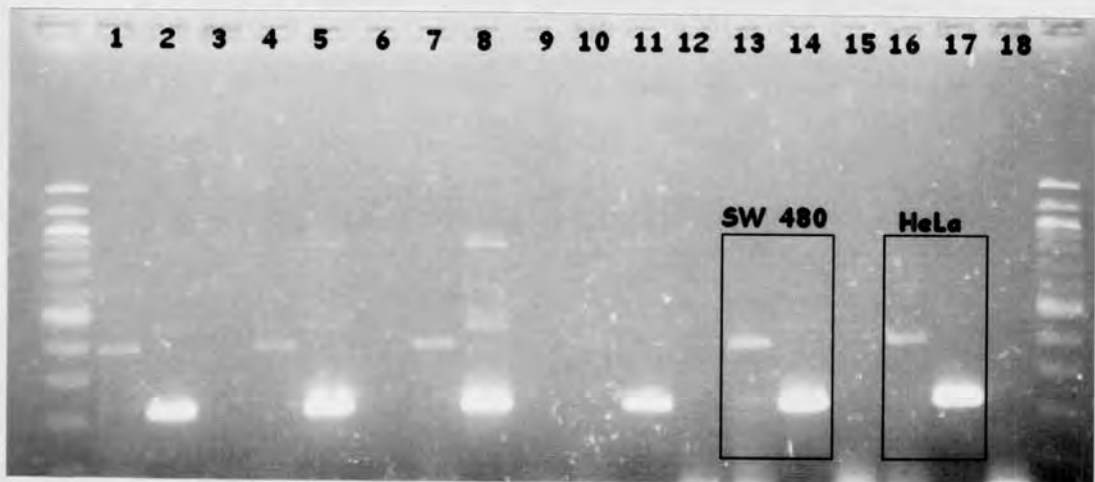
ตารางที่ 7 : ความเข้มข้นตั้งต้น (Stock solution) ของแต่ละสารสกัด

วิธีการสกัดที่	สิ่งตัวอย่าง	ความเข้มข้นตั้งต้นที่เตรียมได้ (g/ml)
1	เนื้อแอปเปิ้ล	0.25
	เปลือกแอปเปิ้ล	0.5
2	เนื้อแอปเปิ้ล	2
	เปลือกแอปเปิ้ล	*
3	เนื้อแอปเปิ้ล	2
	เปลือกแอปเปิ้ล	4

* ผู้ทำการทดลองไม่ได้นำสารสกัดนี้มาทำการเตรียมเป็นสารตั้งต้น

2. การคัดเลือกเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE

ในการคัดเลือก มะเร็งที่จะนำมาใช้ในการทดลองนั้น จะต้องเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน RAGE อยู่บนผิวเซลล์ โดยผู้ทำการทดลองได้คัดเลือกเซลล์มะเร็งที่มีอยู่ในห้องทดลองของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนทั้งหมด 6 cell lines ด้วยกัน อันได้แก่ SW480, HeLa, HT-29, HepG2, HEP-2 และ HaCaT ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer ของยีน RAGE ตรงตำแหน่ง G82S ซึ่งถือเป็นความหลากหลายหนึ่งที่เกิดขึ้นในส่วนของ Exon บนยีน RAGE เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน RAGE ได้ผลดังแสดงตามภาพที่ 19 ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 19 : การแสดงออกของยีน RAGE และ ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง โดยแต่ละหมายเลขแสดงถึงการแสดงออกของ (1) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HepG2 (2) ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง HepG2 (3) Negative control ของเซลล์มะเร็ง HepG2 (4) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HEp-2 (5) ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง HEp-2 (6) Negative control ของเซลล์มะเร็ง HEp-2 (7) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HT-29 (8) ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง HT-29 (9) Negative control ของเซลล์มะเร็ง HT-29 (10) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HaCaT (11) ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง HaCaT (12) Negative control ของเซลล์มะเร็ง HACAT (13) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 (14) ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง SW480 (15) Negative control ของเซลล์มะเร็ง SW480 (16) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa (17) ยีน GAPDH ในเซลล์มะเร็ง HeLa (18) Negative control ของเซลล์มะเร็ง HeLa

โดยในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน RAGE ในแต่ละเซลล์นั้น จะต้องทำการเทียบเป็นสัดส่วนกับการแสดงออกของยีน GAPDH ซึ่งถือเป็น House-keeping Gene ในแต่ละเซลล์มะเร็งด้วย จากภาพที่ 17 แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa มีการแสดงออกของยีน RAGE มากที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงเลือกเซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa มาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

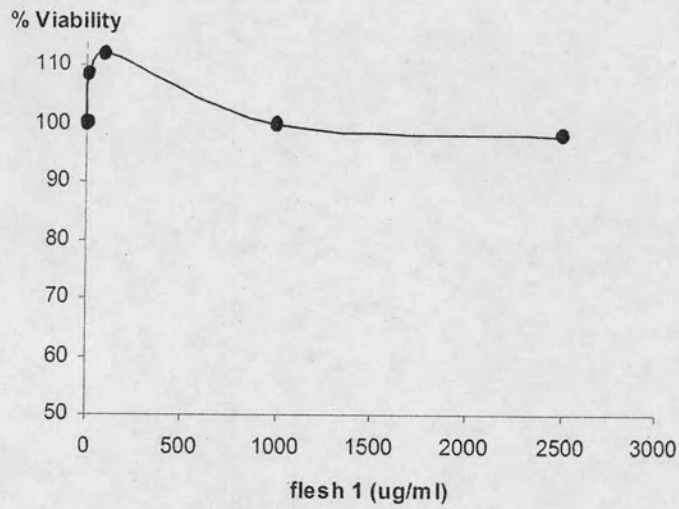
3. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

เป็นการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลงครึ่งหนึ่งจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น หรือที่เรียกกันว่าค่า IC_{50} โดยสารสกัดแอปเปิ้ลที่ได้ จะนำมาใช้ในการบ่มกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ SW480 และ HeLa ซึ่งเป็น 2 เซลล์มะเร็งที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วว่าเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE มากที่สุดจากบรรดาเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด อันได้แก่ SW480, HeLa, HT-29, HepG2, HEP-2 และ HaCaT ซึ่งค่า IC_{50} ที่หาได้ในแต่ละเซลล์ในการทดลองนี้ จะถูกนำไปเป็นแนวทางในการคัดเลือกค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป โดยสารสกัดจะถูกนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำเซลล์มะเร็งมาทดสอบกับน้ำยา MTS โดยความเข้มข้นของสารสกัดในแต่ละการทดลองที่นำมาใช้นั้น จะถูกควบคุมไม่ให้มีปริมาณของ DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารตั้งต้นเกิน 1% ของปริมาตรโดยรวม เพราะถ้าปริมาณของ DMSO เกินกว่า 1% แล้ว อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้

3.1 เซลล์มะเร็ง SW480

3.1.1 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดอย่างหยาบจากเนื้อของแอปเปิ้ล

เนื่องจากสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลอย่างหยาบที่ได้มาจากการสกัดทั้ง 3 วิธีนั้น เมื่อเรียงตามลำดับค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมแล้ว จะเห็นได้ว่าสารสกัดอย่างหยาบในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลที่ได้จากวิธีการสกัดแบบที่ 1 (19,661.65 ppm GAE) นั้น มีปริมาณของค่าโพลีฟีนอลโดยรวม สูงกว่าสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลในวิธีการสกัดแบบที่ 3 (11,390.98 mg/l GAE) และ 2 (9,436.09 mg/l GAE) โดยเรียงลำดับค่าโพลีฟีนอลจากมากไปหาน้อย ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงได้ทดลองเลือกสารสกัดอย่างหยาบ ในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลที่ได้จากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ซึ่งถือว่าเป็นสารสกัดที่ได้จากส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลที่มีค่าโพลีฟีนอลสูงที่สุดมาลองทดสอบกับเซลล์มะเร็ง เพื่อดูว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หรือไม่



ภาพที่ 20 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 2,500 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้แต่อย่างใด แม้จะเป็นสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลที่มีค่าโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุดในบรรดาสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธีก็ตามที่

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

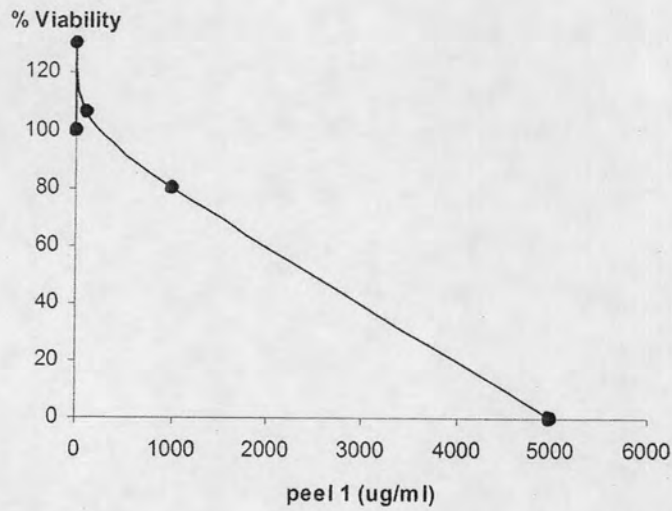
ตารางที่ 8 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
10	109.02 \pm 17.93
100	113.42 \pm 20.45
1,000	99.60 \pm 2.46
2,500	97.45 \pm 2.19

* : $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

3.1.2 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดอย่างหยาบจากเปลือกของแอปเปิ้ล

ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล เมื่อพิจารณาจากค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่วัดได้ จะเห็นได้ว่า ค่าโพลีฟีนอลโดยรวมของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 (44,962.41 ppm GAE) และวิธีที่ 3 (43,721.80 ppm GAE) นั้น ให้ค่าของโพลีฟีนอลที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบในส่วนของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 2 (18,609.02 ppm GAE) จะเห็นได้ว่า มีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมต่ำกว่าเกินกว่า 2 เท่า นอกจากนี้ยังมีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่ต่ำกว่าสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 (19,661.65 ppm GAE) เสียอีก ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงเลือกสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 และ 3 มาทำการทดลองเปรียบเทียบกัน เพื่อหาสารสกัดที่ดีที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้ ทั้งนี้เป็นการทดลองเพื่อหาสารสกัดที่เหมาะสม และเป็นการหาแนวโน้มของช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองนั่นเอง โดยผลของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 สามารถแสดงในรูปของกราฟ % Viability ได้ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 21 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 5,000 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งการยับยั้งที่มีแนวโน้มแบบนี้สามารถเรียกได้ว่าเป็นการยับยั้งแบบ Dose-dependent นั่นเอง โดยความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้ลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือที่เรียกว่า IC_{50} นั้น จะอยู่ระหว่างช่วงของความเข้มข้นที่ 1,000 – 5,000 $\mu\text{g/ml}$

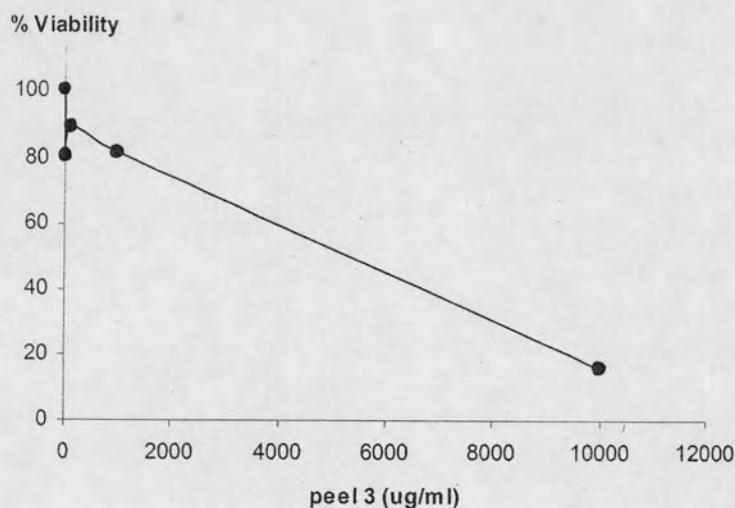
โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 9 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
10	131.91 \pm 9.06 *
100	108.02 \pm 14.02
1,000	81.08 \pm 6.98
5,000	3.20 \pm 1.44 *

* : $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

นอกจากนี้เมื่อได้ทำการทดลองเรื่องการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 โดยบ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้เช่นเดียวกัน โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่สูงขึ้น (Dose-dependent) ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้ลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือที่เรียกว่า IC_{50} นั้น จะอยู่ระหว่างช่วงของความเข้มข้นที่ 1,000 – 10,000 $\mu\text{g/ml}$ ดังจะเห็นได้จากกราฟดังต่อไปนี้



ภาพที่ 22 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

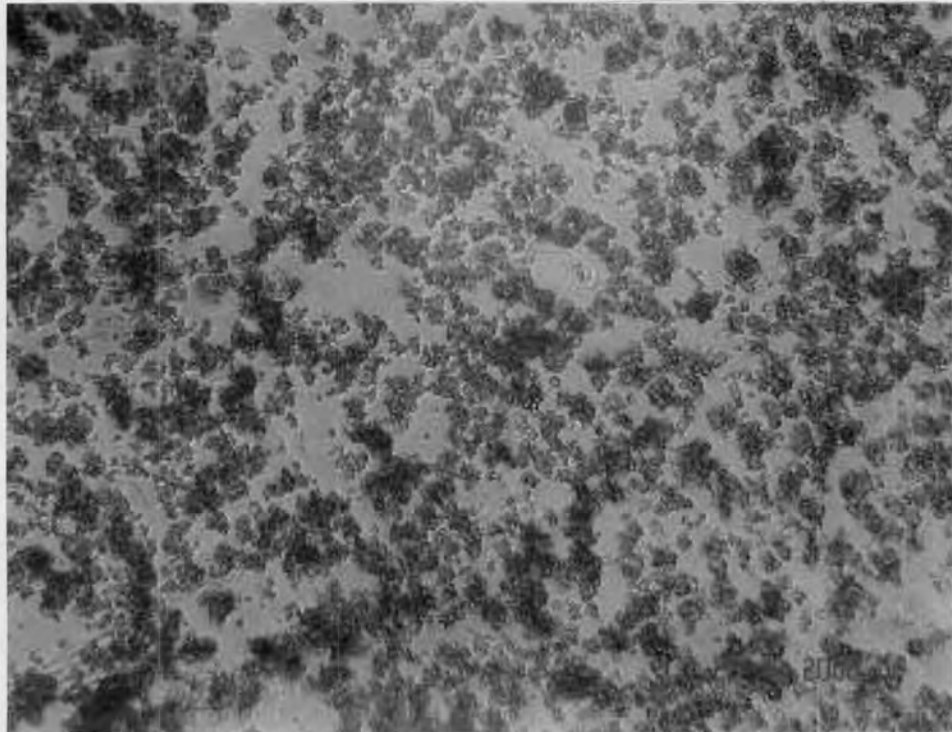
ตารางที่ 10 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
10	82.52 \pm 14.83
100	91.41 \pm 14.56
1,000	83.84 \pm 13.70
10,000	15.75 \pm 2.84 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 และ 3 พบว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 มีแนวโน้มที่จะมีค่าของ IC_{50} ที่ต่ำกว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 ซึ่งหมายความว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้ดีกว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 นั่นเอง

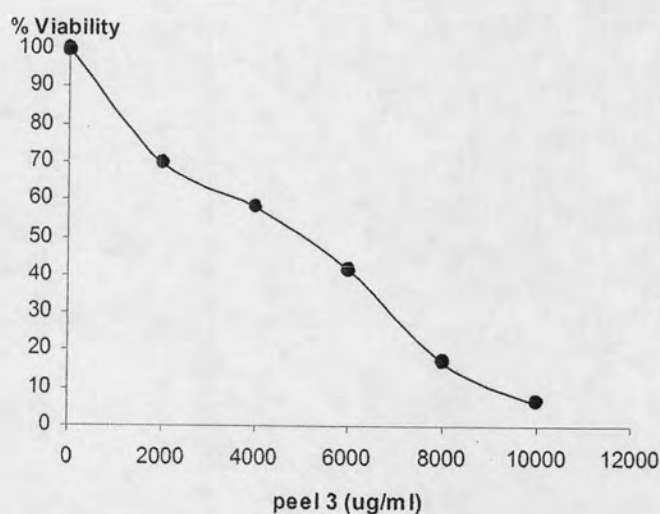
แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า หลังจากที่ได้บ่มสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 กับเซลล์มะเร็ง SW480 แล้ว พบว่าได้เกิดตะกอนขึ้น ตามภาพที่ 23



ภาพที่ 23 : ตะกอนที่เกิดจากการบ่มสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 กับเซลล์มะเร็ง

ดังนั้นในเรื่องของการเลือกสารสกัดที่จะนำมาใช้ในการทดลองนี้ ผู้ทำการทดลองจึงเลือกสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 เป็นสารสกัดที่เหมาะสมกว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 นั่นเอง

เมื่อได้สารสกัดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองแล้ว ซึ่งก็คือ สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 โดยผู้ทำการทดลองได้ทดลองบ่มสารสกัดในช่วงของความเข้มข้นที่มีแนวโน้มว่าจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ลดลงครึ่งหนึ่งอีกครั้ง ได้ผลดังกราฟต่อไปนี้



ภาพที่ 24 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 เมื่อทำการเจาะความเข้มข้นเพื่อหาค่า IC_{50} ณ ความเข้มข้นที่ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าค่า IC_{50} อยู่ที่ความเข้มข้น $5,019.48 \pm 112.88 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm SD) เมื่อได้ค่า IC_{50} ที่ต้องการแล้ว ให้ทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันช่วงของค่า IC_{50} ที่ได้

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 11 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3

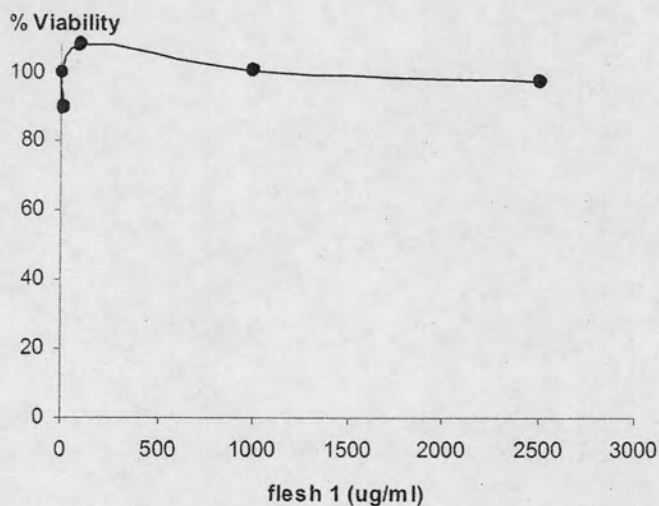
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
2,000	64.01 \pm 4.102 *
4,000	58.14 \pm 3.89 *
6,000	41.29 \pm 0.544 *
8,000	17.09 \pm 0.51 *
10,000	5.90 \pm 0.15 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

3.2 เซลล์มะเร็ง HeLa

3.2.1 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดอย่างหยาบจากเนื้อของแอปเปิ้ล

แม้ว่าในการทดสอบเรื่องสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ล ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 นั้น จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW480 เลยก็ตาม แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดต่างก็มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงได้ทดลองเลือกสารสกัดอย่างหยาบในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลที่ได้จากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ซึ่งถือว่าเป็นสารสกัดที่ได้จากส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลที่มีค่าโพลีฟีนอลสูงที่สุดมาลองทดสอบกับเซลล์มะเร็ง HeLa เพื่อดูว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้หรือไม่ ผลที่ได้แสดงในรูปกราฟดังต่อไปนี้



ภาพที่ 25 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 2,500 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1 นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้แต่อย่างใด แม้จะเป็นสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลที่มีค่าโพลีฟีนอลโดยรวมสูงที่สุดในบรรดาสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลทั้ง 3 วิธีก็ตามที

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

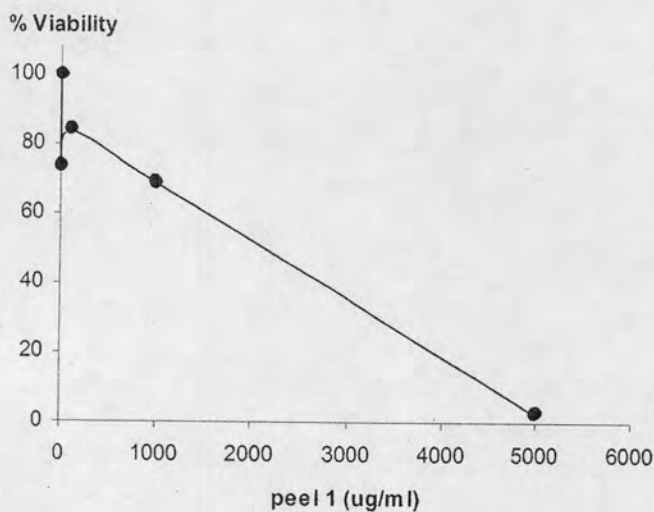
ตารางที่ 12 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเนื้อแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
10	89.34 \pm 8.54 *
100	107.37 \pm 14.86 *
1,000	100.21 \pm 6.31 *
2,500	95.78 \pm 34.31 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

3.2.2 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดอย่างหยาบจากเปลือกของแอปเปิ้ล

ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล เมื่อพิจารณาจากค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่วัดได้ จะเห็นได้ว่า ค่าโพลีฟีนอลโดยรวมของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 และวิธีที่ 3 นั้น ให้ค่าของโพลีฟีนอลที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบในส่วนของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 2 จะเห็นได้ว่ามีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมต่ำกว่าเกินกว่า 2 เท่า นอกจากนี้ยังมีค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมที่ต่ำกว่าสารสกัดเนื้อแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 เสียอีกด้วย ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงเลือกสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 และ 3 มาทำการทดลองเปรียบเทียบกัน เพื่อหาสารสกัดที่ดีที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ ทั้งนี้เป็นการทดลองเพื่อหาสารสกัดที่เหมาะสม และเป็นการหาแนวโน้มของช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองนั่นเอง โดยผลของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa สามารถแสดงในรูปของกราฟ % Viability ได้ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 26 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 1 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 5,000 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งการยับยั้งที่มีแนวโน้มแบบนี้สามารถเรียกได้ว่าเป็นการยับยั้งแบบ Dose-dependent นั่นเอง ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือที่เรียกว่า IC_{50} นั้น จะอยู่ระหว่างช่วงของความเข้มข้นที่ 1,000 – 5,000 $\mu\text{g/ml}$ เช่นเดียวกับผลของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง SW480

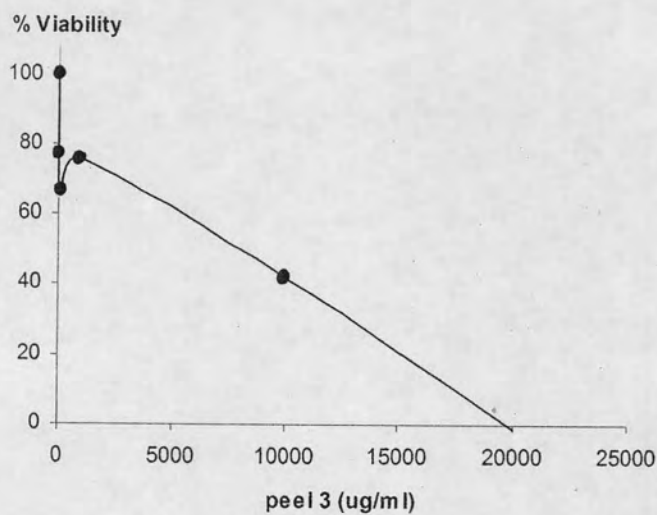
โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 13 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 1

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
10	73.49 \pm 5.33
100	84.49 \pm 7.42
1,000	69.21 \pm 6.26
5,000	2.00 \pm 0.9

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

นอกจากนี้เมื่อได้ทำการทดลองเรื่องการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยบ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้เช่นเดียวกันโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่สูงขึ้น (Dose-dependent) ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือที่เรียกว่า IC_{50} นั้น จะอยู่ระหว่างช่วงของความเข้มข้น 1,000 – 10,000 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 27 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 14 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง heLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3

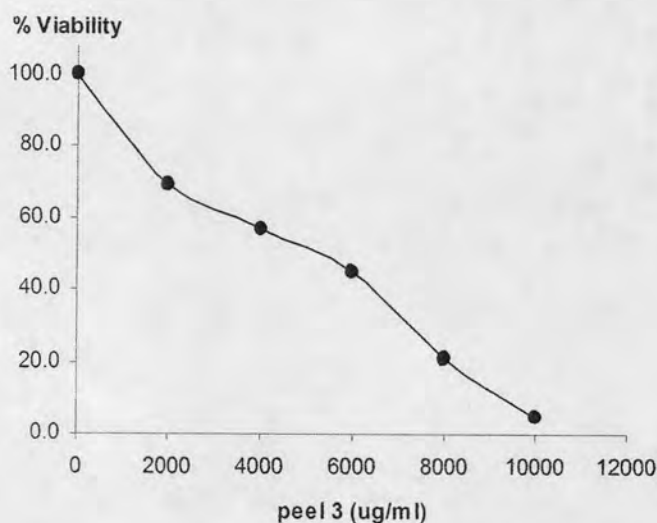
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
10	77.91 \pm 9.26 *
100	65.88 \pm 7.46 *
1,000	75.48 \pm 7.03 *
10,000	41.88 \pm 1.99 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 และ 3 พบว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 มีแนวโน้มที่จะมีค่าของ IC_{50} ที่ต่ำกว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 ซึ่งหมายความว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ดีกว่า สารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 นั่นเอง

แต่เนื่องด้วยสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 เมื่อนำไปบ่มกับเซลล์มะเร็ง HeLa แล้ว ก่อให้เกิดการตกตะกอนขึ้น ดังนั้นในเรื่องของการเลือกสารสกัดที่จะนำมาใช้ในการทดลองนี้ ผู้ทำการทดลองจึงทำการเลือกสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 เป็นสารสกัดที่เหมาะสมกว่าสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 1 นั่นเอง

เมื่อได้สารสกัดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองแล้ว ซึ่งก็คือสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 โดยผู้ทำการทดลองได้ทดลองบ่มสารสกัดในช่วงของความเข้มข้นที่มีแนวโน้มว่าจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ลดลงครึ่งหนึ่ง ได้ผลดังกราฟต่อไปนี้



ภาพที่ 28 : กราฟแสดง % viability ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 เมื่อทำการเจาะความเข้มข้นเพื่อหาค่า IC_{50} ณ ความเข้มข้นที่ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าค่า IC_{50} อยู่ที่ความเข้มข้น $4,933.66 \pm 51.21 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm SD) เมื่อได้ค่า IC_{50} ที่ต้องการแล้ว ให้ทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันช่วงของค่า IC_{50} ที่ได้

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % viability เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 15 : แสดงค่า % viability ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3

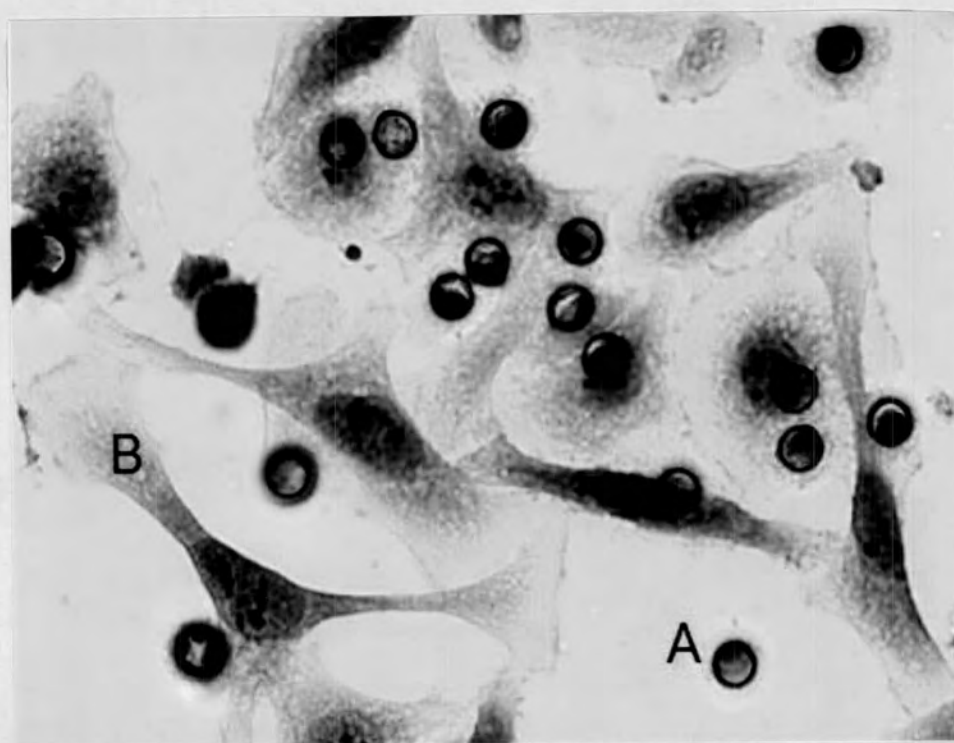
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% viability (mean \pm SD)
2,000	69 ± 7.38 *
4,000	56.72 ± 0.88 *
6,000	44.38 ± 11.22 *
8,000	20.81 ± 1.32 *
10,000	4.52 ± 0.80 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

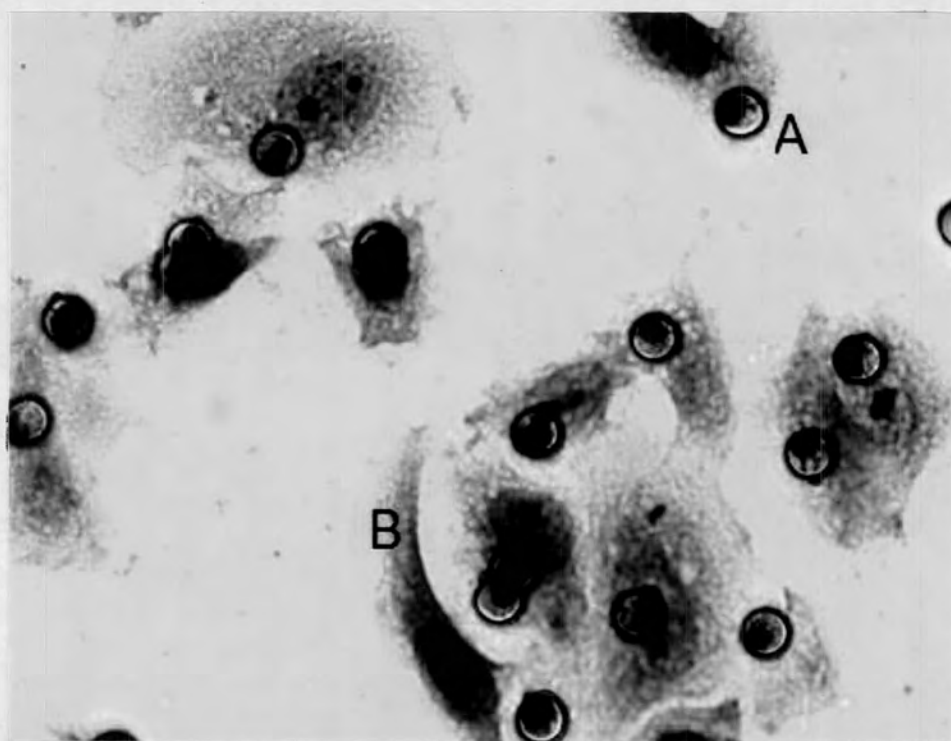
แม้ว่าสารสกัดจากเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ล จะผ่านขั้นตอนการวัดเพื่อหาค่าโพลีฟีนอลโดยรวมแล้วในขั้นตอนหนึ่ง แต่ยังไม่สามารถคัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมที่จะนำมาทำการทดลองได้ แต่จากการทดลองเรื่องการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งในเซลล์ SW480 และ HeLa จึงถือเป็นตัวช่วยหนึ่งในการคัดเลือกสารสกัดที่จะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไปนั่นเอง ซึ่งสารสกัดที่จะนำมาใช้ในการทดลองในขั้นต่อไปอันได้แก่ การทดสอบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของยีน RAGE นั่นเอง

4. การทดสอบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

ค่าของความเข้มข้นที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองนี้ในแต่ละเซลล์มะเร็งนั้น จะเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} ที่หาได้จากการทดลองเรื่องของการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ก่อนที่จะทำการทดลองเรื่องการทดสอบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ผู้ทำการทดลองได้ทำการคัดเลือกเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอีกรอบหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เริ่มมีผลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ในแต่ละการทดลองจะต้องมีการทำการทดลองควบคู่ไปกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มของเซลล์มะเร็งที่บ่มกับ 1% DMSO เพื่อเป็นการยืนยันว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดนั้น ไม่ได้ก่อให้เกิดผลอันตรายต่อเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบแต่อย่างใด ซึ่งภาพของการรุกรานของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa ได้แสดงไว้ดังภาพที่ 29 และ 30 ตามลำดับ โดยสามารถแยกอธิบายได้ออกเป็น 2 หัวข้อดังต่อไปนี้



ภาพที่ 29 : เซลล์มะเร็ง SW480 ที่รุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 400X โดยสัญลักษณ์ในรูปภาพหมายความว่าดังต่อไปนี้ (A) ฐานของ insert (B) เซลล์มะเร็ง SW480 ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ได้



ภาพที่ 30 : เซลล์มะเร็ง HeLa ที่รุกรานลงมายังด้านล่างของ Insert เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 400X โดยสัญลักษณ์ในรูปภาพหมายความว่า (A) รูปร่างของ insert (B) เซลล์มะเร็ง HeLa ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ได้

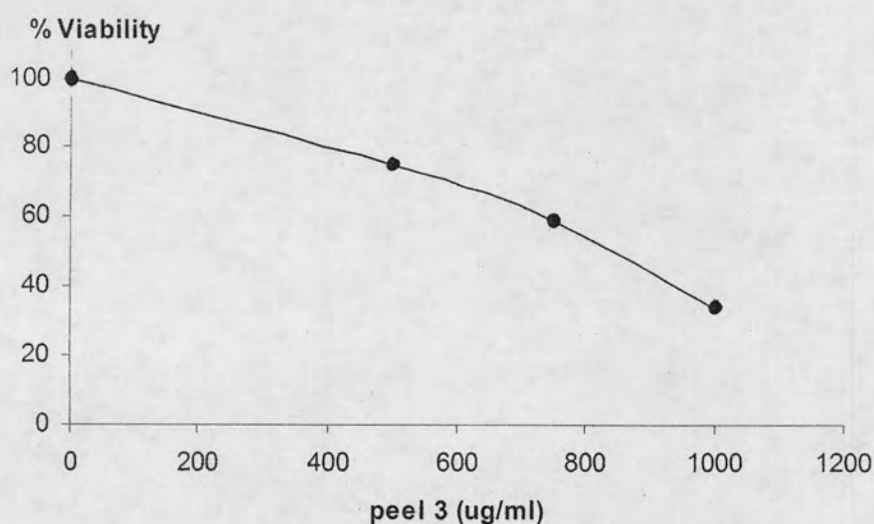
4.1. เซลล์มะเร็ง SW480

4.1.1 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 นั้น ในขั้นแรกผู้ทำการทดลองได้ทดลองใช้ Matrigel 0.5, 0.2 และ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เคลือบลงบน insert แล้วปล่อยให้เซลล์มะเร็ง SW480 ทำการรุกรานเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ณ ความเข้มข้น Matrigel 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ไม่พบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 ลงมาแต่อย่างใด ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้น Matrigel 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร พบว่า ในช่วงเวลาที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่พบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 ลงมาเช่นกัน แต่ที่ 72 ชั่วโมงนั้น พบว่ามีการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ลงมาเพียงเล็กน้อยมาก แม้จะเป็นกลุ่มควบคุมก็ตามที่ ดังนั้น ผู้ทำการทดลองจึงปรับความเข้มข้นของ Matrigel ใหม่อีกครั้ง โดยให้ต่ำลงมาในระดับ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ลงมายังด้านล่างของ insert เพียงแต่ยังอยู่ในระดับที่ต่ำอยู่ ดังนั้นจึงทำการทดลองอีกครั้ง โดยเพิ่มช่วงเวลายาวขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง พบว่ามีการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่เซลล์มะเร็ง SW480 สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ได้นั้น จะอยู่ที่เวลา 72 ชั่วโมง ณ ความเข้มข้น Matrigel ที่เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร นั่นเอง

4.1.2 การทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480

ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหายาจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ มีทั้งหมด 3 ความเข้มข้นด้วยกัน คือ 500, 750 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งผลการนับเซลล์ที่สามารถรุกราน สามารถแสดงได้ตามกราฟดังต่อไปนี้



ภาพที่ 31 : กราฟแสดง % Invasion ของเซลล์มะเร็ง SW480 อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 500, 750 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$

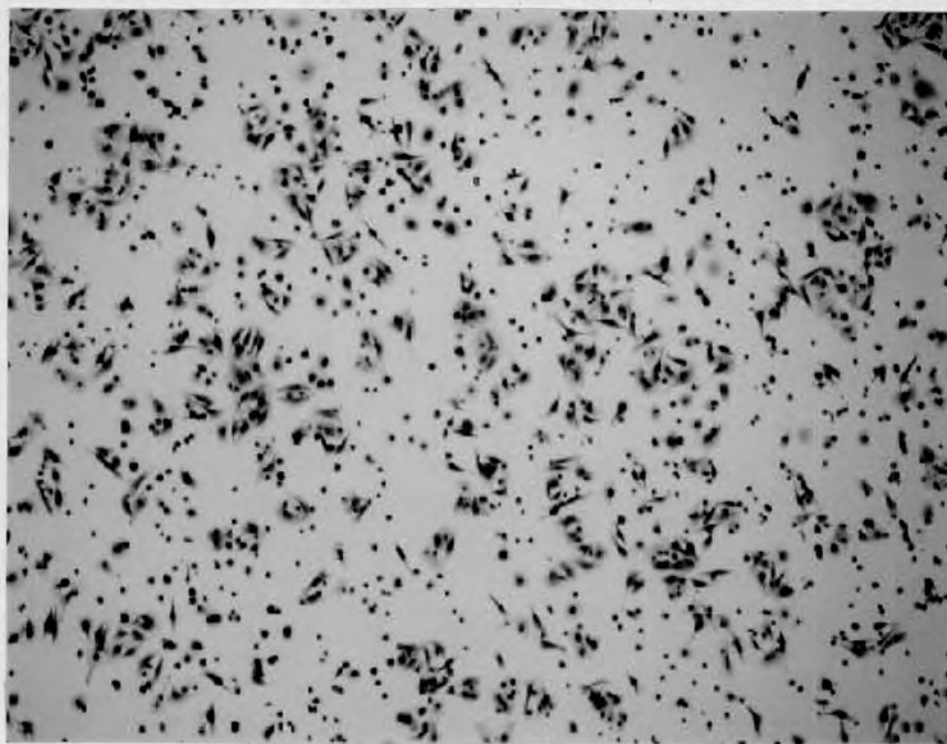
โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % invasion เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % invasion เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 16 : แสดงค่า % invasion ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3

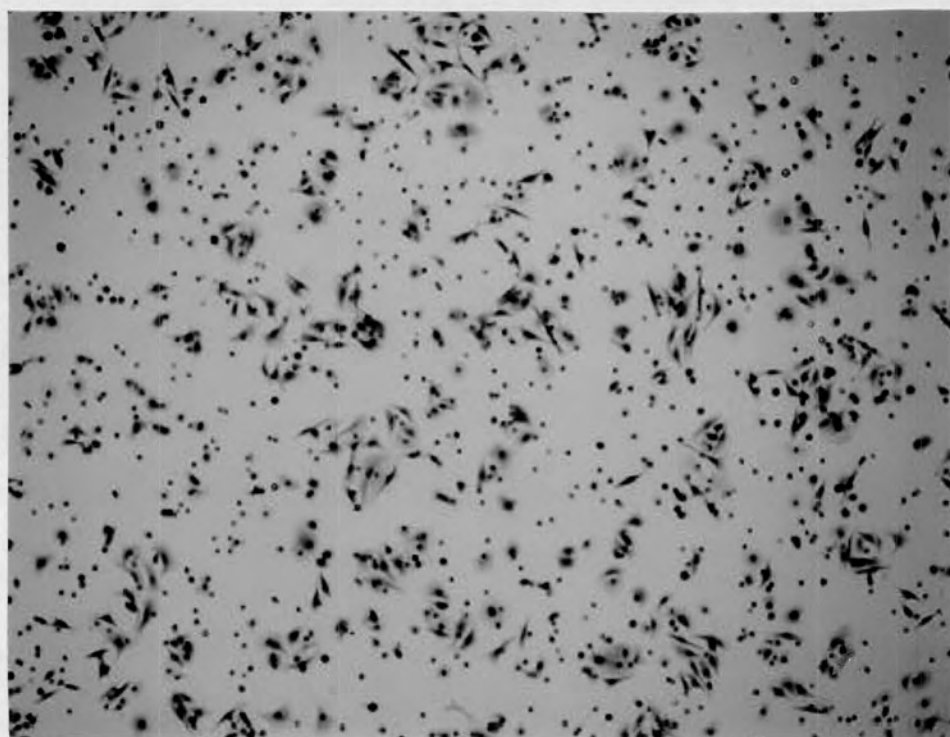
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% invasion (mean \pm SD)
500	74.76 \pm 7.44 *
750	59.02 \pm 3.86 *
1,000	33.43 \pm 12.17 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

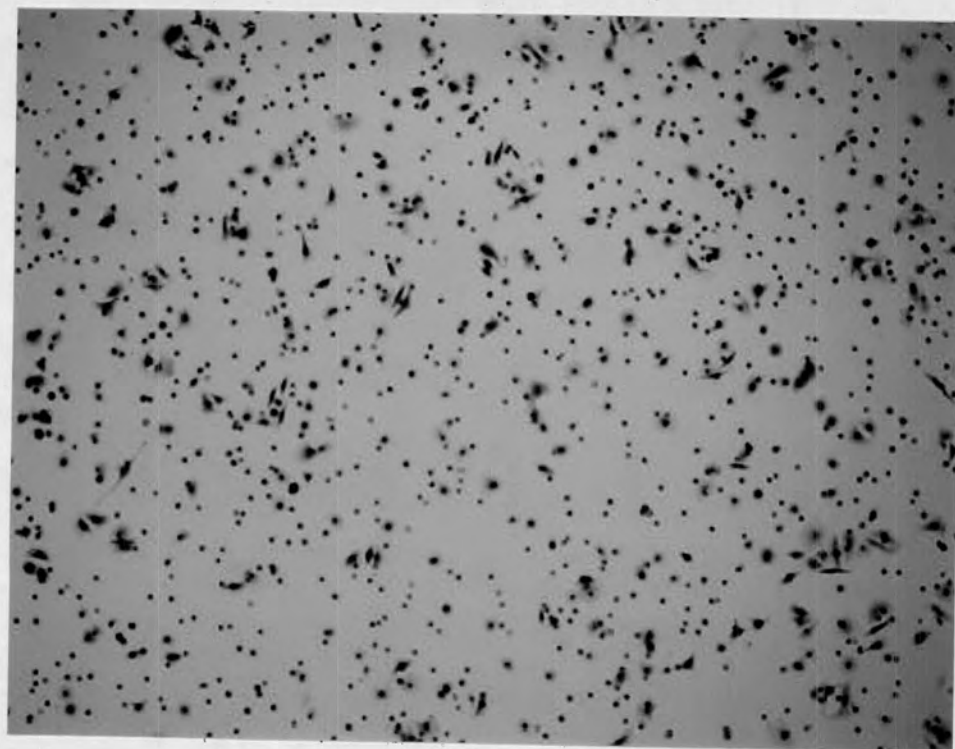
จากกราฟในภาพที่ 30 แสดงให้เห็นว่าค่า IC_{50} อยู่ที่ความเข้มข้น $839.92 \pm 135.45 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm SD) จะเห็นได้ว่าค่า IC_{50} อยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 750 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อได้ช่วงของค่า IC_{50} ที่ต้องการแล้ว ความเข้มข้นที่ 750 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ จะถูกนำไปใช้ในการทดลองเรื่องการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ต่อไป โดยในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 นี้ จะเห็นได้ว่า ณ ความเข้มข้นที่มากขึ้น การรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 จะน้อยลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลนั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 ในแบบ Dose-dependent นั่นเอง ซึ่งการรุกรานที่ลดลงของเซลล์มะเร็ง SW480 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นนั้น ได้แสดงให้เห็นตามรูปดังต่อไปนี้



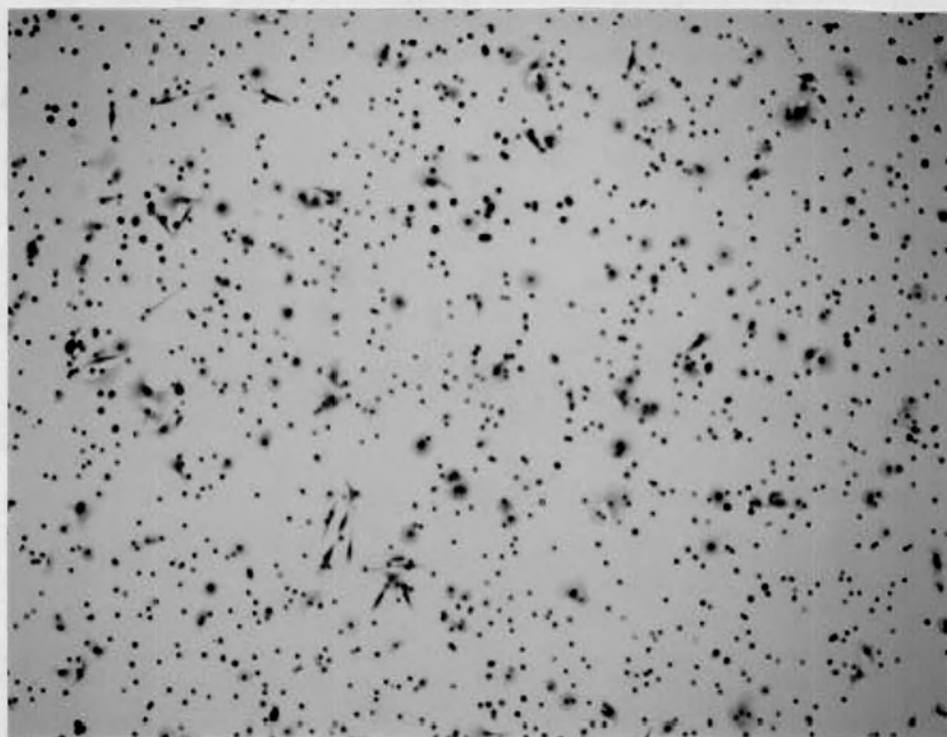
ภาพที่ 32 : เซลล์มะเร็ง SW480 ในกลุ่มควบคุมที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X



ภาพที่ 33 : เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X



ภาพที่ 34 : เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X



ภาพที่ 35 : เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 40X ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X

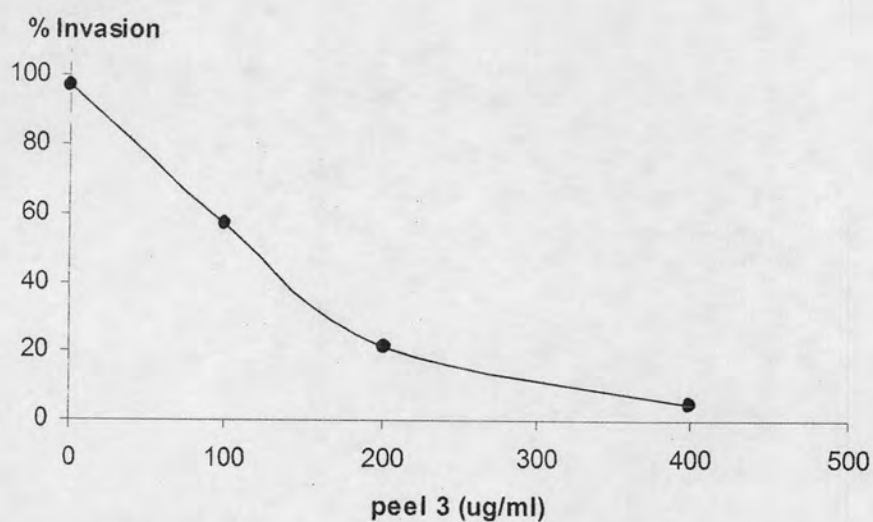
4.2 เซลล์มะเร็ง HeLa

4.2.1 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa

เนื่องจากในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งนี้ ผู้ทำการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ นพ. ดร. กวิญ ลีละวัฒน์ โรงพยาบาลราชวิถี ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการชี้แนะแนวทางเกี่ยวกับรายละเอียดของวิธีการทำ invasion assay อีกทั้งยังได้รับคำแนะนำถึงสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa อีกด้วย โดยสภาวะที่เหมาะสมที่เซลล์มะเร็ง HeLa สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ได้นั้น จะอยู่ที่เวลา 24 ชั่วโมง ณ ความเข้มข้น Matrigel ที่เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และเมื่อทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อดูการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa แล้ว พบว่า ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ณ ความเข้มข้นของ Matrigel ที่ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เซลล์มะเร็ง HeLa นั้น สามารถเกิดการรุกรานลงมายังข้างล่างของ insert ได้จริง ดังนั้นในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa นี้ จะใช้ Matrigel 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงนั่นเอง

4.2.2 การทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa

ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบจากเปลือกแอปเปิ้ลที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ มีทั้งหมด 3 ความเข้มข้นด้วยกัน คือ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งผลการนับเซลล์ที่สามารถรุกราน สามารถแสดงได้ตามกราฟดังต่อไปนี้



ภาพที่ 36 : กราฟแสดง % invasion ของเซลล์มะเร็ง HeLa อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$

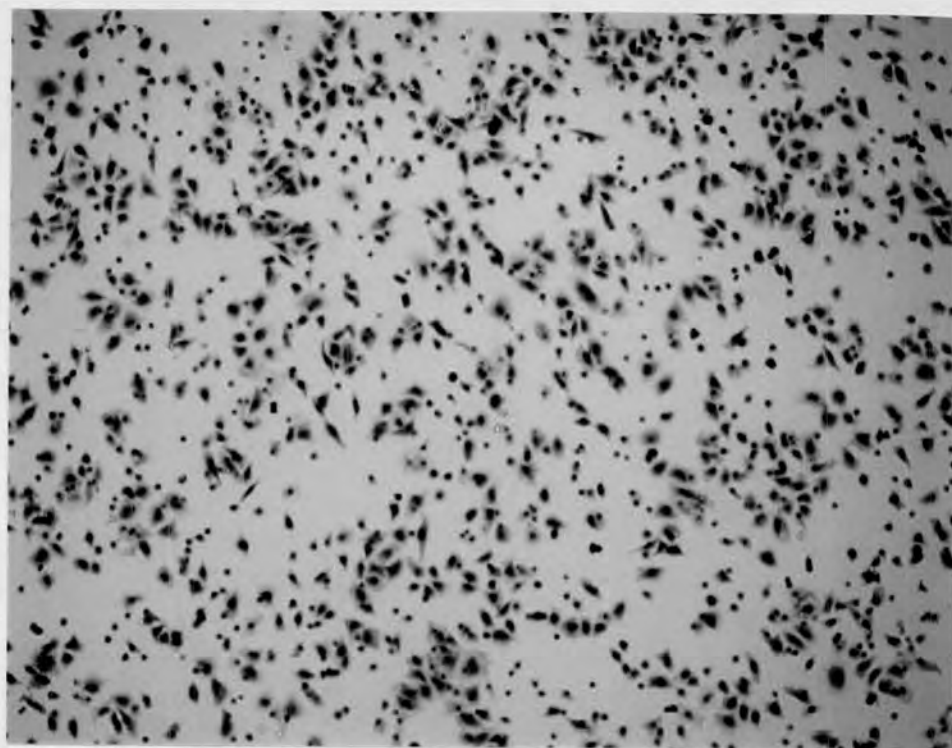
โดยสามารถแจกแจงข้อมูล % invasion เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มควบคุมมีค่า % invasion เท่ากับ 100% ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 17 : แสดงค่า % invasion ในรูปของค่า mean \pm SD ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3

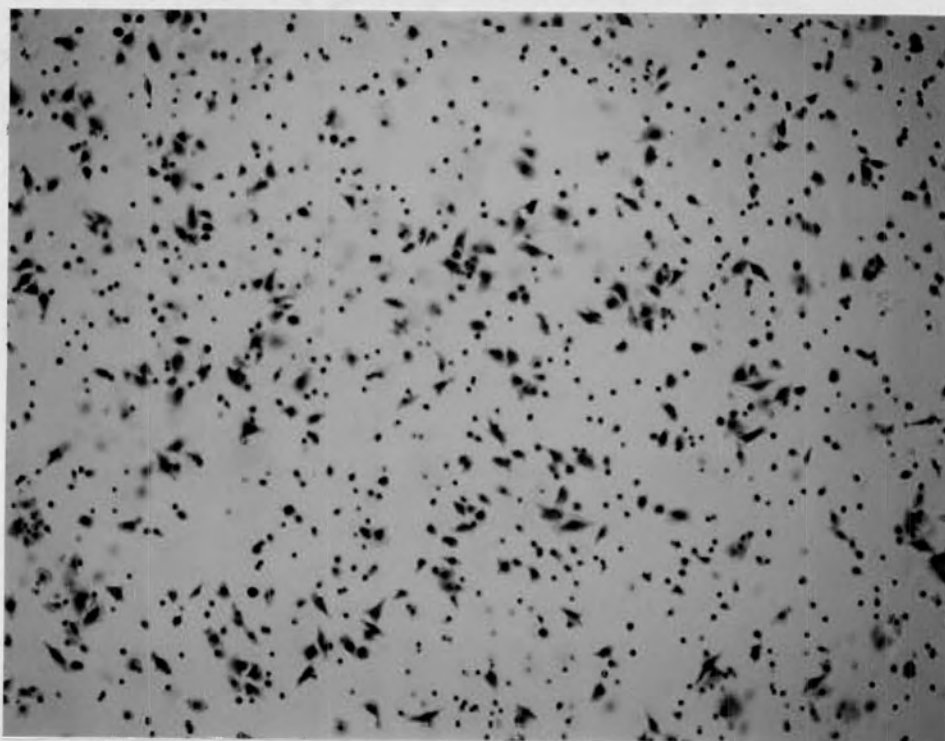
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% invasion (mean \pm SD)
100	58.23 \pm 11.82 *
200	22.15 \pm 1.81 *
400	4.66 \pm 0.50 *

*: $p < 0.05$ (แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

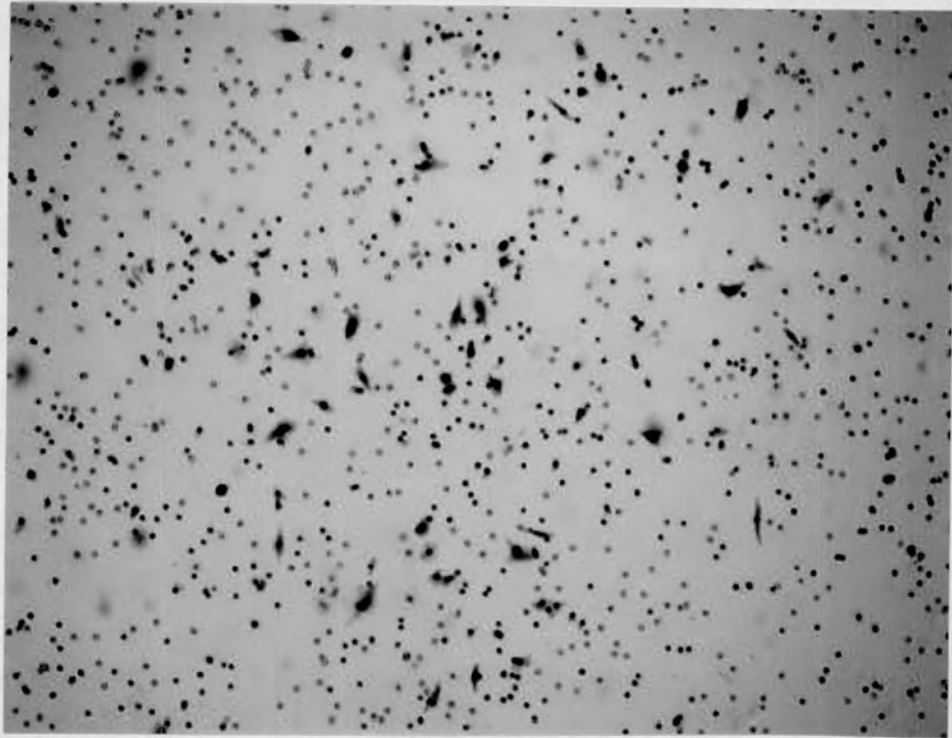
จากกราฟในภาพที่ 35 แสดงให้เห็นว่าค่า IC_{50} อยู่ที่ความเข้มข้น $126.19 \pm 11.91 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm SD) จะเห็นได้ว่าค่า IC_{50} อยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อได้ช่วงของค่า IC_{50} ที่ต้องการแล้ว ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ จะถูกนำไปใช้ในกรทดลองเรื่องการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ต่อไป โดยในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa นี้ จะเห็นได้ว่า ณ ความเข้มข้นที่มากขึ้น การรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa จะน้อยลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล นั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ในแบบ Dose-dependent นั่นเอง ซึ่งการรุกรานที่ลดลงของเซลล์มะเร็ง HeLa ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นนั้น ได้แสดงให้เห็นตามรูปดังต่อไปนี้



ภาพที่ 37 : เซลล์มะเร็ง HeLa ในกลุ่มควบคุมที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X



ภาพที่ 38 : เซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X



ภาพที่ 39 : เซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X



ภาพที่ 40 : เซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ ที่สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert เมื่อเคลือบ insert ด้วย 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และดูด้วยกำลังขยาย 40X

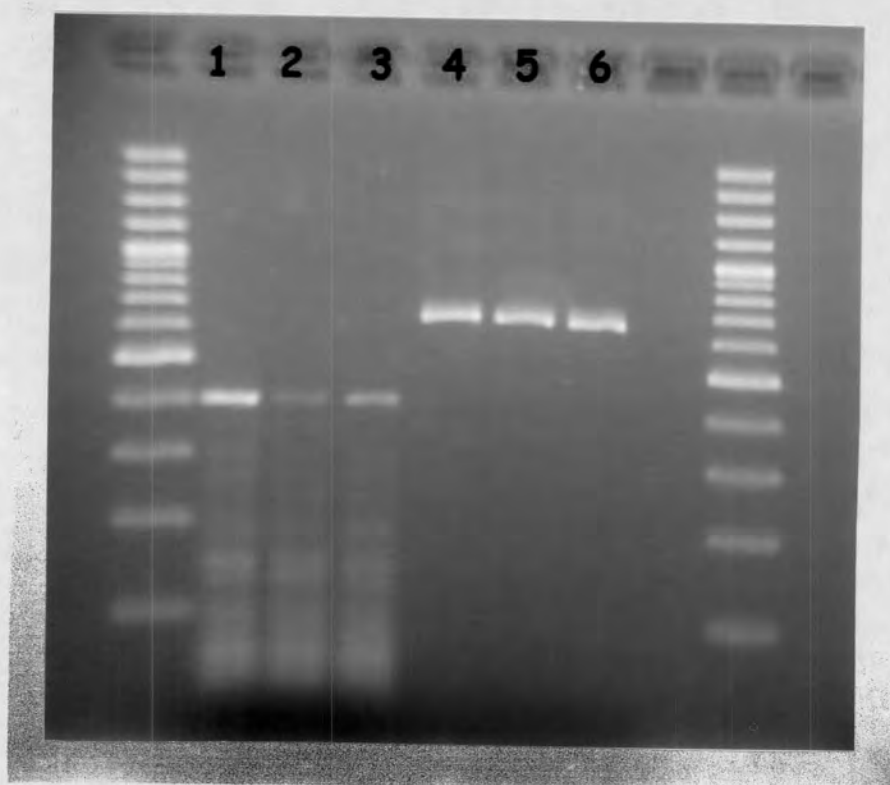
5. การวัดการแสดงออกของเซลล์มะเร็ง

เป็นการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ด้วยวิธี RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง SW480 และ HeLa ที่ได้รับการบ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

5.1 เซลล์มะเร็ง SW480

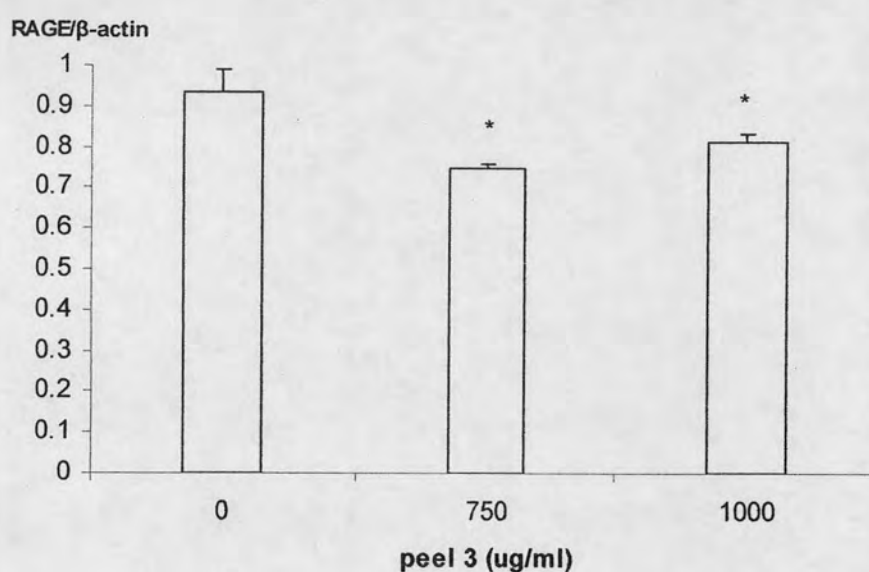
เมื่อได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่ส่งผลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 แล้ว พบว่าค่าของความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง SW480 ได้ลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จะอยู่ในช่วงของความเข้มข้น 750 – 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นในการทดลองเรื่องการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 นี้ จึงทดลองโดยการบ่มสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่ 2 ความเข้มข้นนี้ กับเซลล์มะเร็ง SW480 ก่อนที่จะนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการ RT-PCR เพื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดแอปเปิ้ลที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ทางด้าน Quantitative โดยใช้โปรแกรม AlphasImager 2000 ซึ่งระดับของการแสดงออกของยีนนี้จะถูกคำนวณในรูปของสัดส่วน Optical Density ของผลผลิต PCR ระหว่างยีน RAGE และ β -actin ซึ่งถือเป็น House-keeping Gene ในแต่ละเซลล์มะเร็งด้วย

โดยภาพที่ 41 ได้แสดงให้เห็นถึงภาพผลผลิตของ PCR ของเซลล์มะเร็ง SW480 ในยีน RAGE และ ยีน β -actin เมื่อนำมาขึ้นตอนของกระบวนการอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้ 2.5% เจล อะกาโรส



ภาพที่ 41 : การแสดงออกของยีน RAGE และ ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง SW480 โดยแต่
 ละหมายเลขแสดงถึงการแสดงออกของ (1) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480
 กลุ่มควบคุม (2) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือก
 แอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g/ml}$ (3) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง
 SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$
 (4) ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง SW480 กลุ่มควบคุม (5) ยีน β -actin ใน
 เซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น
 750 $\mu\text{g/ml}$ (6) ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดเปลือก
 แอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$

เมื่อได้แถบผลผลิตของ PCR ทั้งยีน RAGE และ ยีน β -actin ของเซลล์มะเร็ง SW480 แล้ว แถบผลผลิตที่ได้นี้ จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphasizer 2000 โดยระดับของการแสดงออกของยีน RAGE นี้จะถูกคำนวณในรูปของสัดส่วน Optical Density ของผลผลิต PCR ระหว่างยีน RAGE และ β -actin ตามกราฟดังต่อไปนี้



ภาพที่ 42 : กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480

จากกราฟ ข้อมูลจะถูกแสดงในรูปของ mean \pm SD และหาค่านัยสำคัญ (* : $p < 0.05$) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในเซลล์มะเร็ง SW480 ที่ได้รับการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 750 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ นั้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน RAGE ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็ง SW480 ในกลุ่มควบคุม

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล Optical Density เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

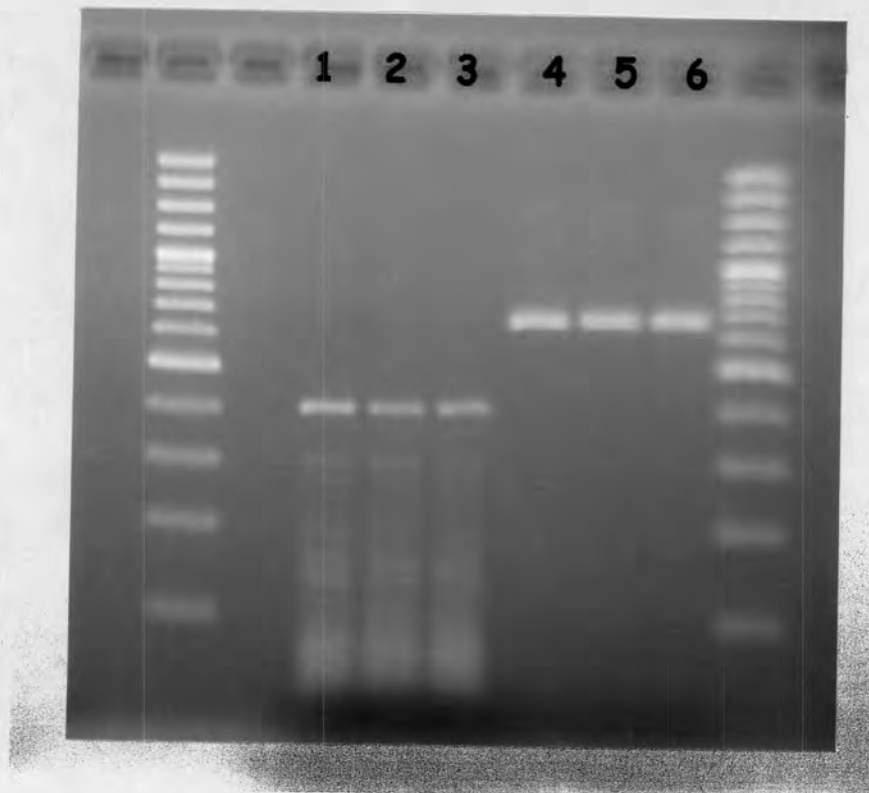
ตารางที่ 18 : แสดงค่าสัดส่วน Optical Density จากแถบผลผลิต PCR ในยีน RAGE ต่อยีน β -actin ของเซลล์มะเร็ง SW480 ในรูปของค่า mean \pm SD เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphasizer 2000

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	Optical Density (mean \pm SD)
0	0.937 \pm 0.051
750	0.75 \pm 0.01
1,000	0.813 \pm 0.021

5.2 เซลล์มะเร็ง HeLa

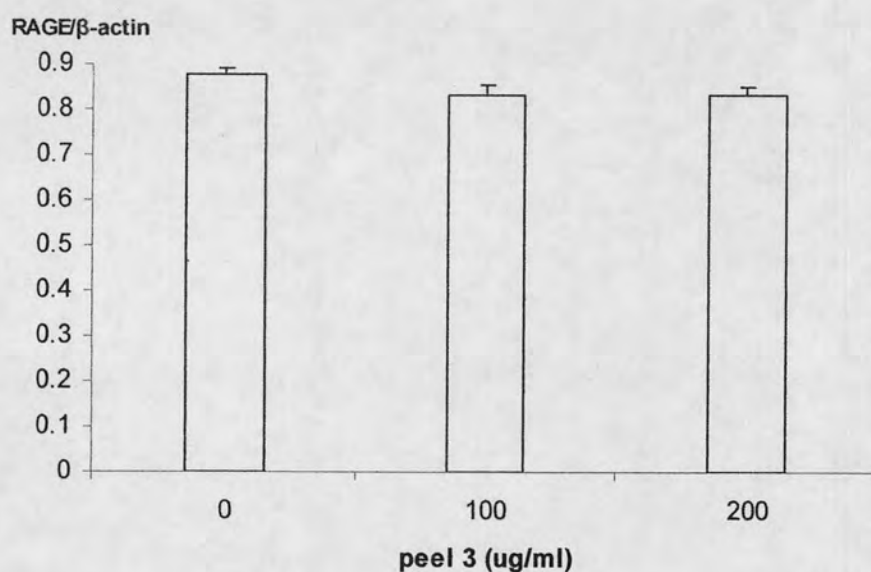
เมื่อได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่ส่งผลต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa แล้วพบว่าค่าของความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จะอยู่ในช่วงของความเข้มข้น 100 – 200 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นในการทดลองเรื่องการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa นี้ จึงทดลองโดยการบ่มสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่ 2 ความเข้มข้นนี้ กับเซลล์มะเร็ง HeLa ก่อนที่จะนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการ RT-PCR เพื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดแอปเปิ้ลที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ทางด้าน Quantitative โดยใช้โปรแกรม Alphasizer 2000 ซึ่งระดับของการแสดงออกของยีนนี้จะถูกคำนวณในรูปของสัดส่วน Optical Density ของผลผลิต PCR ระหว่างยีน RAGE และ β -actin ซึ่งถือเป็น House-keeping Gene ในแต่ละเซลล์มะเร็งด้วย

โดยภาพที่ 43 ได้แสดงให้เห็นถึงภาพผลผลิตของ PCR ของเซลล์มะเร็ง HeLa ใน ยีน RAGE และ ยีน β -actin เมื่อนำมาขึ้นตอนของกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีสิส โดยใช้ 2.5% เจล อะกาโรส



ภาพที่ 43 : การแสดงออกของยีน RAGE และ ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง HeLa โดยแต่ละหมายเลขแสดงถึงการแสดงออกของ (1) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa กลุ่มควบคุม (2) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 100 μ g/ml (3) ยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 200 μ g/ml (4) ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง HeLa กลุ่มควบคุม (5) ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 100 μ g/ml (6) ยีน β -actin ในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลวิธีที่ 3 ณ ความเข้มข้น 200 μ g/ml

เมื่อได้แถบผลผลิตของ PCR ทั้งยีน RAGE และ ยีน β -actin ของเซลล์มะเร็ง HeLa แล้ว แถบผลผลิตที่ได้นี้ จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม AlphaImager 2000 โดยระดับของการแสดงออกของยีน RAGE นี้จะถูกคำนวณในรูปของสัดส่วน Optical Density ของผลผลิต PCR ระหว่างยีน RAGE และ β -actin ตามกราฟดังต่อไปนี้



ภาพที่ 44 : กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่มีต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa

จากกราฟ ข้อมูลจะถูกแสดงในรูปของ mean \pm SD และหาค่านัยสำคัญ (* : $p < 0.05$) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ได้รับการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ณ ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 μ g/ml นั้น ไม่พบว่ามี การแสดงออกของยีน RAGE ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในความเข้มข้นใดเลย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็ง HeLa ในกลุ่มควบคุม

โดยสามารถแจกแจงข้อมูล Optical Density เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ให้อยู่ในรูปค่า mean \pm SD ได้ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 19 : แสดงค่าสัดส่วน Optical Density จากแถบผลผลิต PCR ในยีน RAGE ต่อยีน β -actin ของเซลล์มะเร็ง HeLa ในรูปของค่า mean \pm SD เมื่อทำการบ่มกับสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphamager 2000

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	Optical Density (mean \pm SD)
0	0.877 \pm 0.015
100	0.830 \pm 0.026
200	0.830 \pm 0.020