

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. แอปเปิ้ล

แอปเปิ้ล หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Pyrus malus* เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกที่มนุษย์รู้จักกันมานาน โดยมีการปลูกในทวีปยุโรป และทวีปเอเชียมาตั้งแต่ยุคต้นๆของประวัติศาสตร์ อีกทั้งมีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของโลก แอปเปิ้ลได้รับการขนานนามว่าเป็น king of the fruit ทั้งนี้เพราะแอปเปิ้ลเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดี มีกลิ่นหอม สีสวยและรูปทรงสวยสะดุดตา และยังใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง แอปเปิ้ลที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันเกิดจากพันธุ์ลูกผสมของพันธุ์ป่าหลายพันธุ์ด้วยกัน แหล่งปลูกที่สำคัญของโลกคือ ทวีปอเมริกา และ ทวีปยุโรป สำหรับทวีปเอเชีย ปลูกมากในประเทศเกาหลี ประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น ในส่วนของประเทศไทยเองนั้น รู้จักผลแอปเปิ้ลจากการนำเข้ามาจากต่างประเทศมาบริโภค และเป็นที่ชื่นชอบเป็นต้นมา

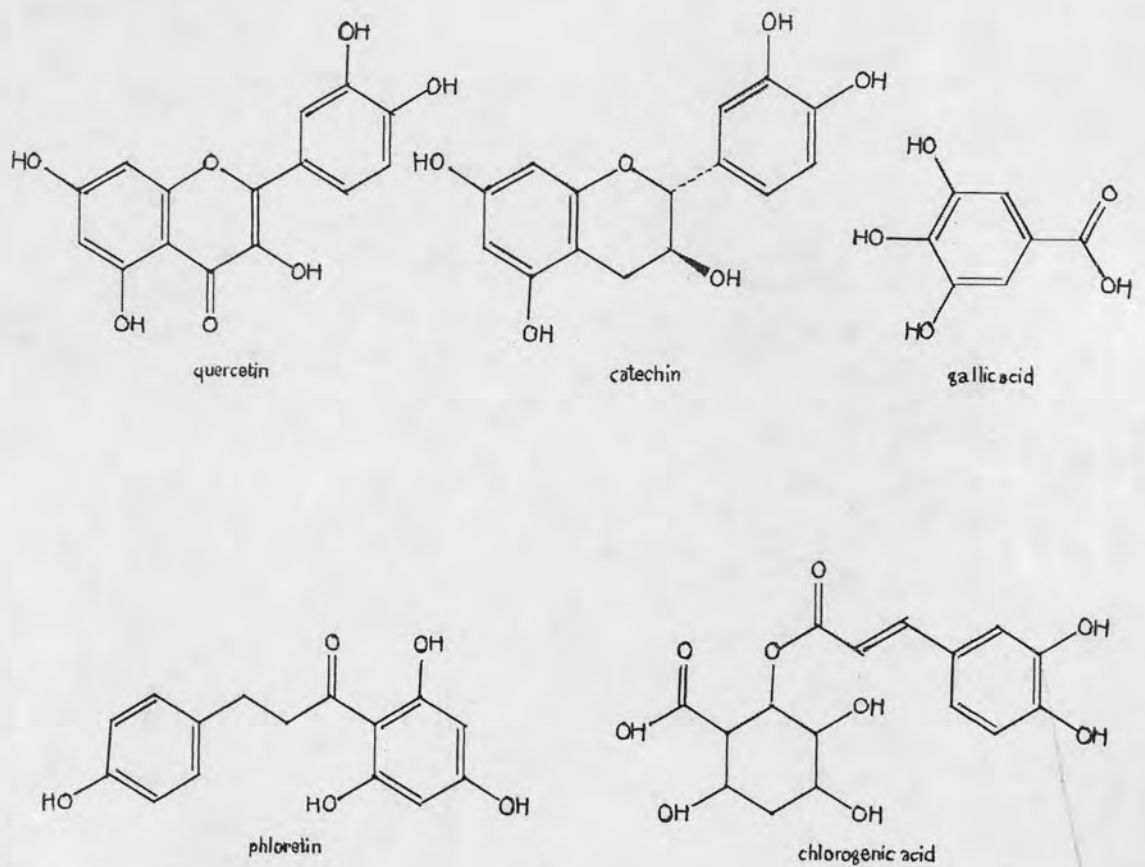
สำหรับการปลูกแอปเปิ้ลในประเทศไทย เป็นการนำพันธุ์แอปเปิ้ลจากต่างประเทศเข้ามาปลูกตามพื้นที่สูงในภาคเหนือ (นพดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537) ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดีอย่างน่าพึงพอใจ ทั้งนี้เนื่องจากอากาศทางภาคเหนือของประเทศไทยที่มีความเหมาะสม ดินมีความอุดมสมบูรณ์ นอกจากนี้ประกอบกับในปัจจุบัน แอปเปิ้ลมีราคาที่ถูกลงกว่าเมื่อก่อนมาก ส่วนข้อดีที่เกษตรกรเริ่มหันมาให้ความสนใจในเรื่องของการปลูกแอปเปิ้ลก็เพราะว่า แอปเปิ้ลเป็นผลไม้ที่ค่อนข้างจะขายได้ราคาดี การซื้อขายเป็นไปอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังสะดวกต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง ประกอบกับความเชื่อที่มีมาแต่โบราณว่า การกินแอปเปิ้ลวันละ 1 ผลนั้น จะสามารถรักษาตนเองให้ห่างไกลจากหมอได้ (An apple a day keeps the doctor away) ด้วยเหตุนี้ แอปเปิ้ลจึงถือเป็น 1 ในกลุ่มของผลไม้ที่มีผู้บริโภคบ่อยที่สุดในบรรดาผลไม้ด้วยกันเอง

ด้วยเหตุผลตามที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้การบริโภคแอปเปิ้ลในประเทศไทยมีอัตราที่สูงขึ้น นอกจากนี้ในหลายๆการศึกษาที่ผ่านมา ได้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของแอปเปิ้ลที่มีต่อการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ความผิดปกติในหน้าที่การทำงานของปอด โรคเบาหวาน การลดน้ำหนัก และโรคมะเร็งอีกหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น (Knekt et al., 1996; Knekt et al., 2000; Tabak et al., 2001;

Eberhardt et al., 2000; Le-Marchand et al., 2000; Xing et al., 2001) ประกอบกับปัจจุบัน ผู้คนหันมาใส่ใจดูแลสุขภาพกันมากขึ้น เน้นการบริโภคผักผลไม้เป็นหลัก ดังนั้นแอปเปิ้ลจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับการนิยมนิยมอยู่ในขณะนี้

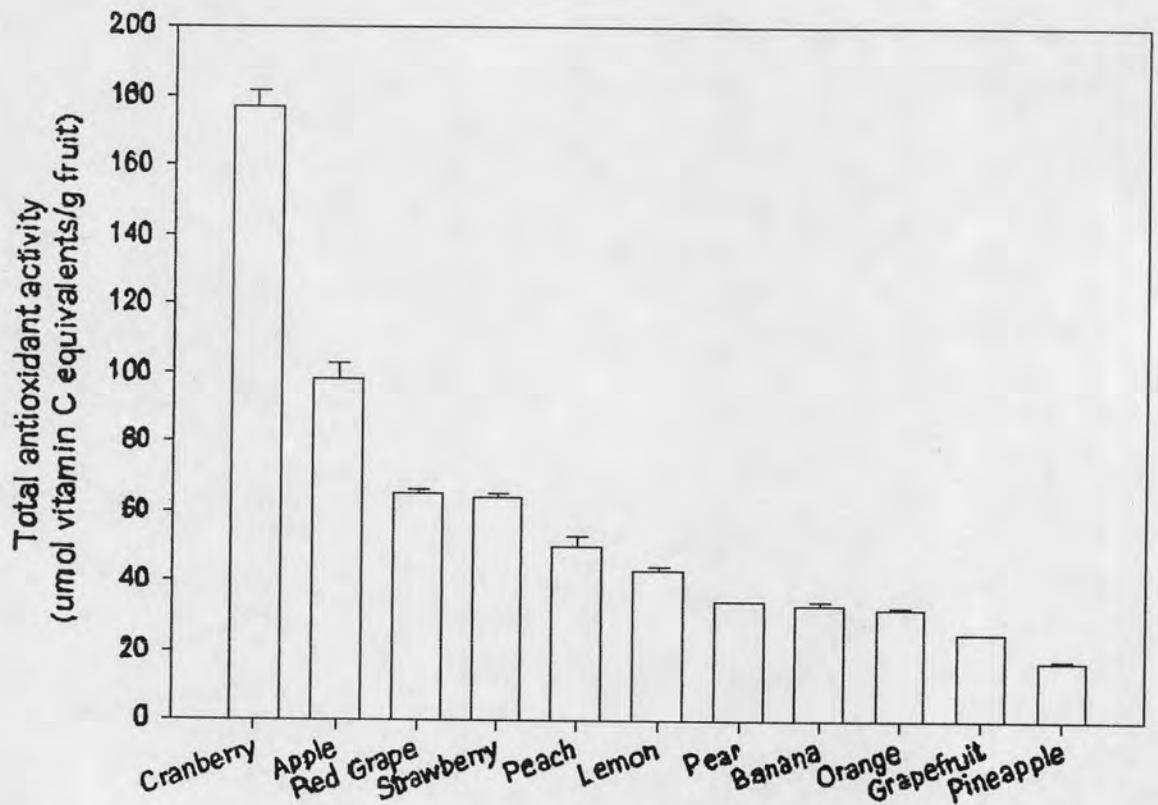
### 1.1 สารโพลีฟีนอลในแอปเปิ้ล

เป็นที่รู้กันดีว่าแอปเปิ้ลเป็นแหล่งของสารเคมีที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะสารในกลุ่มโพลีฟีนอล อันได้แก่ phenolic acid และ flavonoids ในส่วนของประเทศอเมริกานั้นเนื่องจากการที่แอปเปิ้ลมีส่วนแบ่งถึง 22% ของ phenolic จากการบริโภคผลไม้ทั้งหมด จึงส่งผลให้แอปเปิ้ลเป็นแหล่งของ phenolic ที่ใหญ่ที่สุดนั่นเอง (Vinson et al., 2001) ขณะที่ในประเทศเนเธอร์แลนด์นั้น แอปเปิ้ลถือเป็นอันดับที่ 3 ของแหล่ง flavonoids รองจากชาและหัวหอม (Hertog et al., 1993), (Knekt et al., 1997) นอกจากนี้แอปเปิ้ลยังเป็นผลไม้ที่ขึ้นชื่อในเรื่องของการเป็นแหล่ง antioxidant ที่ดีอีกด้วย โดยสารเคมีที่มีประโยชน์ในเรื่องของการมีฤทธิ์เป็นสาร antioxidant ที่รู้จักกันดีในแอปเปิ้ลนั้น ได้แก่ quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, catechin, epicatechin, procyanidin, cyanidin-3-galactoside, coumaric acid, chlorogenic acid, gallic acid และ phloridzin (Boyer and Liu, 2004) เป็นต้น เมื่อนำแอปเปิ้ลไปเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดต่างๆที่มีการบริโภคกันในประเทศอเมริกา จะพบว่าความสามารถในการเป็นสาร antioxidant และการมีสารประกอบจำพวก phenolic ของแอปเปิ้ลนั้นมากเป็นอันดับที่ 2 รองจากแครนเบอร์รี่ ดังจะเห็นได้จากกราฟในภาพที่ 3 ที่สำคัญนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นนั้น แอปเปิ้ลยังถูกกล่าวว่าเป็นผลไม้ที่มีระดับของ free phenolic compounds สูงที่สุดอีกด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับบรรดาผลไม้ที่ถุ่่นนำมาบริโภค (Sun et al., 2002) ซึ่ง free phenolic compounds นั้น เป็นสารประกอบที่ไม่ได้เกิดการจับกับสารต่างๆในผลไม้ ทำให้เกิดการถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ง่ายขึ้น (Boyer and Liu, 2004)



ภาพที่ 2 : ตัวอย่างโครงสร้างของสารเคมีในแอปเปิ้ลที่มีฤทธิ์ในด้านการเป็นสาร antioxidant (Boyer and Liu, 2004)

สารโพลีฟีนอลที่สามารถพบได้ทั่วไปในแอปเปิ้ลได้แก่ chlorogenic acid, quercetin (ซึ่งถือเป็น backbone สำหรับสารในกลุ่มของ flavonoids ชนิดอื่นๆ (Wikipedia, 2006), catechin, epicatechin, phloridzin, phoretin, rutin, procyanidin และ anthocyanidin (อันได้แก่ cyanidin 3-glycoside โดยจะอยู่ในส่วนสีแดงของเปลือก) เป็นต้น (Supplementwatch, 2006) (Lotito and Frei, 2004; Mazza and Velioglu, 1992; Lancaster and Dougall, 1992; Nicolas et al., 1994; Awad et al., 2000) โดยผลแอปเปิ้ลสดนั้นถือเป็น 1 ในแหล่งของ quercetin ที่มากที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างผักและผลไม้อื่นๆ นอกจากสารในกลุ่มของ polyphenol แล้ว แอปเปิ้ลยังมีสารที่เรียกว่า pectin ซึ่งเป็นเส้นใยที่สามารถละลายน้ำได้ มีประโยชน์ในการกำจัดคอเลสเตอรอลออกจากลำไส้เล็ก และทำให้การดูดซึมกลูโคสช้าลงอีกด้วย (Ray, 2006) โดยตัวอย่างโครงสร้างของสารโพลีฟีนอลที่พบได้ในแอปเปิ้ลได้แสดงไว้ตามภาพที่ 2



ภาพที่ 3 : กราฟแสดง Antioxidant activity ที่ได้จากผลไม้ประเภทต่าง ๆ  
(Boyer and Liu, 2004)

สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบได้ทั่วไปเป็นส่วนใหญ่ในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ลนั้น ได้แก่ procyanidins, catechin, epicatechin, chlorogenic acid, phloridzin และเหล่า quercetin conjugates ส่วนสารประกอบโพลีฟีนอลที่พบได้ทั่วไปเป็นส่วนใหญ่ในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลนั้น ได้แก่ catechin, procyanidin, epicatechin และ phloridzin แต่จะมีในจำนวนที่น้อยกว่าที่พบใน ส่วนเปลือกของแอปเปิ้ล โดยเฉพาะ quercetin conjugates ที่จะพบในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ล โดยเฉพาะ แต่ในทางกลับกันนั้น chlorogenic acid จะพบในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ลมากกว่าในส่วน ของเปลือกแอปเปิ้ลเช่นกัน (Escarpa and Gonzalez, 1998) เนื่องด้วยเหตุผลที่ว่าเปลือกของ แอปเปิ้ลนั้นมีส่วนประกอบของสารประกอบที่มีฤทธิ์ antioxidant โดยเฉพาะ quercetin ดังนั้น เปลือกแอปเปิ้ลจึงน่าจะมีฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าเนื้อของ แอปเปิ้ลนั่นเอง จากการวิจัยพบว่าแอปเปิ้ลที่ปราศจากเปลือกนั้น จะมีฤทธิ์ในด้านของการเป็นสาร antioxidant น้อยกว่าแอปเปิ้ลที่มีเปลือก นอกจากนี้แอปเปิ้ลที่มีเปลือกนั้นจะมีความสามารถใน

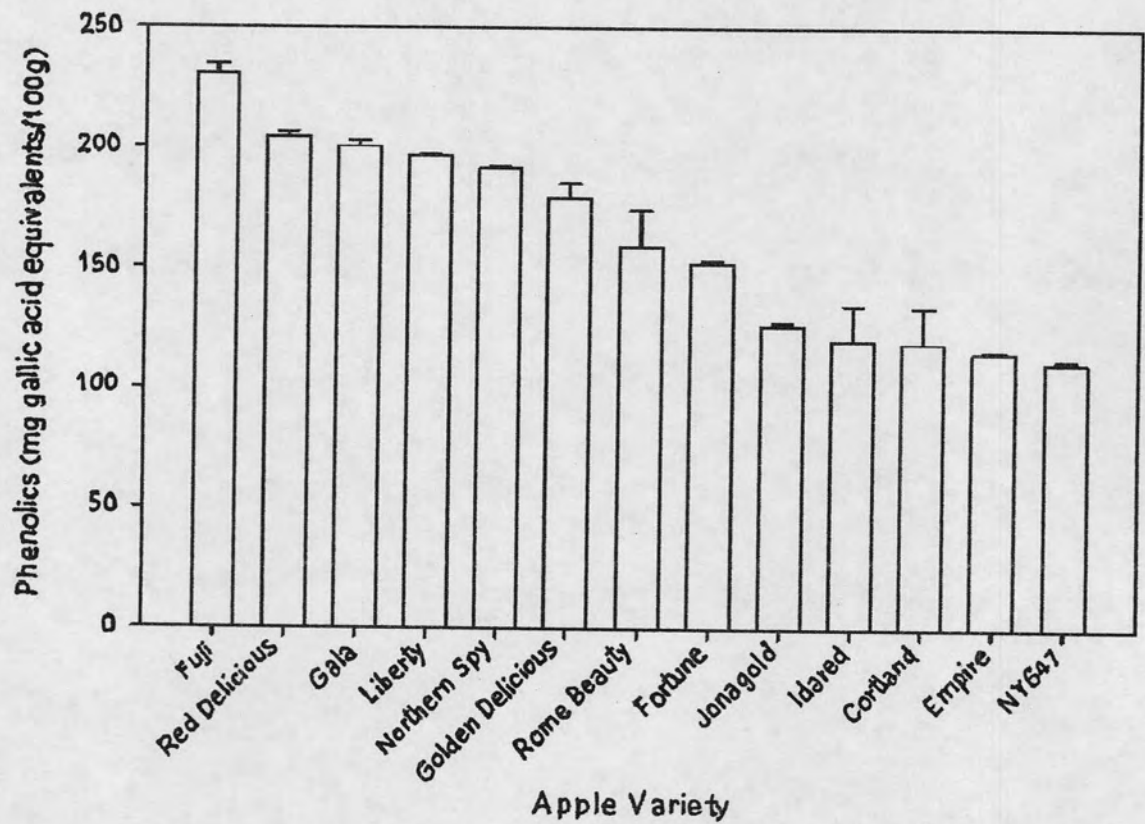
ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกับแอปเปิ้ลที่ปราศจากเปลือก (Eberhardt et al., 2000) ได้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงว่า เปลือกแอปเปิ้ลนั้นมีสารประกอบจำพวก phenolics มากกว่าในส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล 2-6 เท่าซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดของแอปเปิ้ล และยังมีสารจำพวก flavonoids มากกว่า 2-3 เท่าอีกด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบในส่วนของด้านการออกฤทธิ์ antioxidant แล้ว จะพบว่าเปลือกแอปเปิ้ลนั้นมีค่าที่สูงกว่าเนื้อแอปเปิ้ล 2-6 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของแอปเปิ้ล (Wolfe et al., 2003) ซึ่งได้มีการวิจัยที่ออกมาสนับสนุนข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น โดยได้ทำการทดลองกับหนูทดลอง พบว่าหนูที่บริโภคเปลือกแอปเปิ้ลนั้นจะแสดงให้เห็นถึงการยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation และยังมี的增加ขึ้นของค่า antioxidant ในพลาสมาอีกด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มที่ได้รับการบริโภคเนื้อแอปเปิ้ล (Leontowicz et al., 2003)

## 1.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อสารโพลีฟีนอลในแอปเปิ้ล

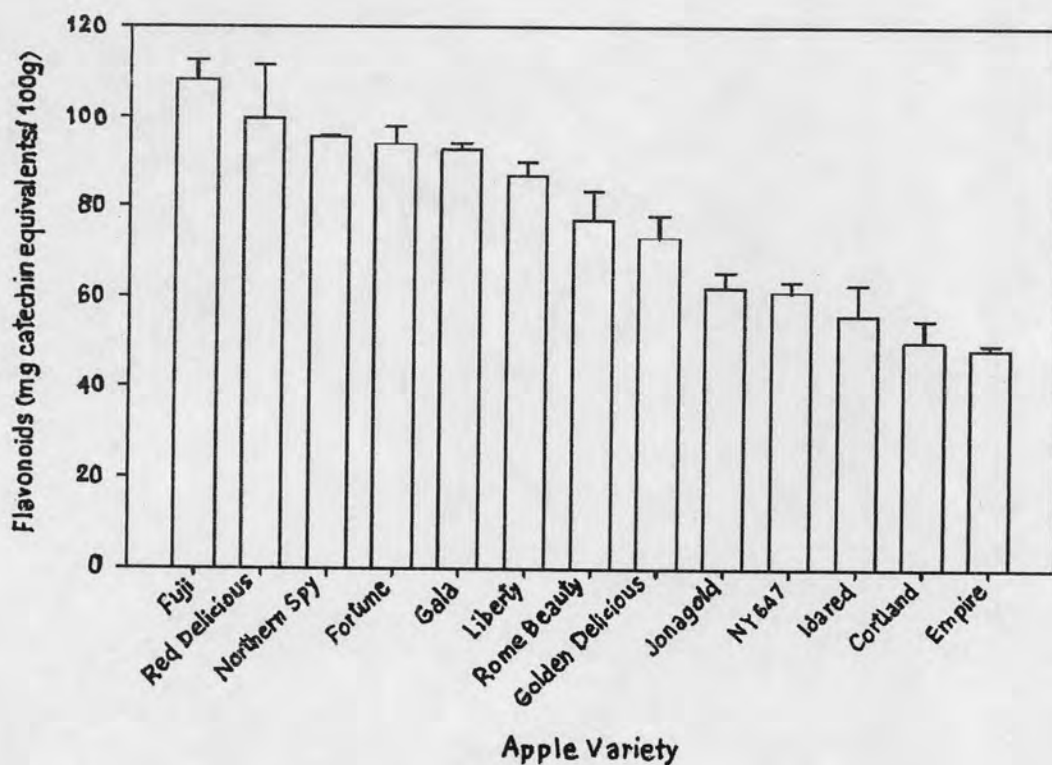
แม้ว่าแอปเปิ้ลจะเป็นแหล่งของสารเคมีที่มีประโยชน์อื่น ๆ อีกมากมาย นอกจากปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีที่มีประโยชน์นี้ จะแตกต่างกันไปในส่วนของเปลือกและเนื้อแอปเปิ้ลแล้ว แต่ระดับความเข้มข้นของสารที่มีประโยชน์เหล่านี้ต่างก็มีปัจจัยอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยอีกเช่นกัน ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของพันธุ์แอปเปิ้ล ซึ่งความแตกต่างของค่า total phenolics และ total flavonoids นั้นจะมีความแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ (Boyer and Liu, 2004) หรือจะเป็นปัจจัยในเรื่องของการปลูกและการเก็บเกี่ยวผลแอปเปิ้ล หรือแม้กระทั่งกระบวนการในการแปรรูปแอปเปิ้ลต่างก็ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่มีประโยชน์ในแอปเปิ้ล

เมื่อทำการเปรียบเทียบแอปเปิ้ลที่นิยมบริโภคกันในประเทศอเมริกาพบว่า แอปเปิ้ลพันธุ์ Fuji นั้น มีค่าของ total phenolics และ total flavonoids สูงที่สุด ดังแสดงตามกราฟในภาพที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ส่วนแอปเปิ้ลพันธุ์ Red Delicious ต่างก็มีค่าที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน ตรงกันข้ามกับแอปเปิ้ลพันธุ์ Empire และ NY647 ที่มีค่าของ phenolics และ flavonoids ที่ต่ำที่สุด ซึ่งความสามารถในการเป็นสาร antioxidant นั้น จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของแอปเปิ้ล นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจอีกว่าแอปเปิ้ลพันธุ์ที่พบว่ามีค่าของ phenolic สูงนั้นจะมีฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant ที่สูงตามไปด้วย (Boyer and Liu, 2004) ส่วน procyanidin นั้น จะพบในแอปเปิ้ลพันธุ์ Granny Smith และ Red Delicious มากที่สุด ตรงกันข้ามกับแอปเปิ้ลพันธุ์

McIntosh และ Golden Delicious ที่พบว่ามีค่าของ flavonoids ที่น้อยที่สุด (Hammerstone et al., 2000)



ภาพที่ 4 : กราฟแสดงค่าของสารประกอบ phenolic ในแต่ละสายพันธุ์ของแอปเปิ้ล (Boyer and Liu, 2004)



ภาพที่ 5 : กราฟแสดงค่าของสารประกอบ flavonoid ในแต่ละสายพันธุ์ของแอปเปิ้ล (Boyer and Liu, 2004)

นอกเหนือไปจากสายพันธุ์ของแอปเปิ้ลที่ส่งผลต่อสารเคมีที่มีประโยชน์ในแอปเปิ้ลแล้ว ยังมีปัจจัยในเรื่องของสภาพแวดล้อมในการปลูกแอปเปิ้ลอีกด้วย โดยยิ่งผลแอปเปิ้ลสัมผัสกับแสงอาทิตย์มากเท่าไร ก็จะช่วยเพิ่มปริมาณของสารเคมีที่เป็นประโยชน์ในผลแอปเปิ้ลมากยิ่งขึ้นเท่านั้น แต่แสงอาทิตย์นี้จะไม่เกิดผลกระทบต่อสารดังต่อไปนี้ อันได้แก่ phloridzin, catechin และ chlorogenic acid (Boyer and Liu, 2004)

ส่วนในเรื่องของผลกระทบอันเนื่องมาจากขั้นตอนในการเก็บรักษาแอปเปิ้ลนั้น อันที่จริงแล้ว ปัจจัยด้านขั้นตอนการเก็บรักษา มักไม่ค่อยส่งผลกระทบต่อสารเคมีที่มีประโยชน์ในแอปเปิ้ลมากเท่าไรนัก ทั้ง quercetin glycoside, phloridzin และ anthocyanin ในแอปเปิ้ลพันธุ์ Jonagold, Golden Delicious, Red Delicious, Elstar และ Cox's orange จะไม่ถูกผลกระทบในขั้นตอนการเก็บเป็นเวลาถึง 52 สัปดาห์เมื่อทำการควบคุมบรรยากาศในการเก็บรักษา โดย chlorogenic acid และ total catechin จะลดลงเป็นจำนวนน้อยในแอปเปิ้ลพันธุ์ Jonagold ส่วน

แอปเปิ้ลพันธุ์ Golden Delicious นั้น ค่าของ total catechins จะมีการลดลงในจำนวนน้อยเช่นกัน แต่ระดับของ chlorogenic acid จะคงที่ (Van der Sluis et al., 2001) หลังจาก 72 สัปดาห์ในการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าไม่มีการลดจำนวนลงของ chlorogenic acid เลยในแอปเปิ้ลทุกสายพันธุ์ โดยระดับของ catechin จะลดต่ำลงมาเล็กน้อยในแอปเปิ้ลพันธุ์ Golden Delicious, Elstar และ Cox's Orange

แต่ไม่ว่าจะเป็นการเก็บรักษาแอปเปิ้ลในที่ที่ถูกควบคุมสภาวะบรรยากาศ หรือในที่อุณหภูมิต่ำก็ตามที่ การเก็บรักษาแอปเปิ้ลทั้ง 2 แบบนี้ไม่มีผลกระทบต่อฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant ในแอปเปิ้ล นอกจากนี้ในการศึกษาอื่นที่เกี่ยวกับผลกระทบของการเก็บรักษาแอปเปิ้ลที่มีต่อค่าของ phenolic ในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ลนั้น พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-9 องศาเซลเซียส จะส่งผลกระทบต่อค่าของ phenolic เพียงเท่านั้น (Goulding et al., 2001) อีกการศึกษาหนึ่งพบว่า 60 วันหลังจากทำการเก็บรักษาแอปเปิ้ลในที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าค่าของ total phenolics ในแอปเปิ้ลพันธุ์ Golden Delicious นั้นมีค่าที่เพิ่มขึ้น และหลังจากผ่านไป 100 วัน ค่าของ total phenolic ในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ลจะเริ่มลดลง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 200 วัน ค่าของ phenolic ที่พบจะใกล้เคียงกับเมื่อครั้งที่เก็บเกี่ยว (Lattanzio et al., 2001)

### 1.3 แอปเปิ้ลกับโรคมะเร็ง

จากหลายๆการศึกษาได้แสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงกันระหว่างการบริโภคแอปเปิ้ลกับความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งที่ลดลง แอปเปิ้ลนั้นถือเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความสามารถในเรื่องของการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งทรวงอก (Slattery, 2001; Smith-Warner et al., 2001; Malin et al., 2003) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Deneo-Pellegrini et al., 1996) มะเร็งในช่องปาก (Rajkumar et al., 2003) มะเร็งที่ไต (Lindblad et al., 1997) และมะเร็งปอด (Knekt et al., 1997; Le-Marchand et al., 2000; Boyer and Liu, 2004; Kubik et al., 2004) เป็นต้น โดยการบริโภคแอปเปิ้ลนั้นสามารถลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ทั้ง 2 เพศ ไม่ว่าจะบริโภคในเพศหญิงหรือเพศชายก็ตามที่ (Le-Marchand et al., 2000) ทั้งนี้เนื่องจากแอปเปิ้ลมีสารจำพวก flavonoids ในระดับที่สูง โดยเฉพาะสารจำพวก quercetin และ quercetin conjugates (Hollman and Arts, 2000) มีการศึกษาหนึ่งได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์แบบแปรผกผันระหว่างปริมาณของ quercetin กับโรคมะเร็งปอด แม้แนวโน้มที่ได้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตามที่ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าความสัมพันธ์แบบแปรผกผันระหว่างการ



บริเวณแอปเปิ้ลกับโรคมะเร็งปอดนี้ จะเห็นได้ชัดใน squamous cell carcinomas มากกว่า adenocarcinomas (Le-Marchand et al., 2000)

นอกจากนี้ในส่วนของเปลือกแอปเปิ้ลที่มีฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อีกด้วย (Wolfe et al., 2003; Eberhardt et al., 2000) โดยแอปเปิ้ลถือเป็นผลไม้ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูงเป็นอันดับที่ 3 จากบรรดาผลไม้ที่มีการบริโภคกันเป็นประจำ (Sun et al., 2002) ทั้งนี้ประเภทของแอปเปิ้ลแต่ละชนิดก็จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกันออกไปด้วยเช่นกัน เช่น เซลล์มะเร็งตับ (Liu et al., 2003) ในระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดที่ได้จากแอปเปิ้ลพันธุ์ Fuji จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้ 39% แต่ในขณะเดียวกันสารสกัดที่ได้จากแอปเปิ้ลพันธุ์ Red Delicious สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 57% ส่วนแอปเปิ้ลพันธุ์ Northern Spy นั้นกลับไม่ส่งผลใดๆเลยต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Liu et al., 2003) นอกจากนี้แอปเปิ้ลที่ปราศจากเปลือกนั้น จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้น้อยกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกับแอปเปิ้ลที่ยังมีเปลือกอยู่ จากการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าเปลือกของแอปเปิ้ลนั้น น่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้นั่นเอง ซึ่งตรงกับการศึกษาหนึ่งที่ได้แสดงให้เห็นว่าเปลือกของแอปเปิ้ลเพียงอย่างเดียว จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้อย่างมีนัยสำคัญมากกว่าแอปเปิ้ลทั้งผลเสียอีก ยกตัวอย่างเช่น เปลือกแอปเปิ้ลที่ได้จากพันธุ์ Idared นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% ณ ความเข้มข้น 13.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่แอปเปิ้ลทั้งผลนั้นจะต้องใช้ความเข้มข้นถึง 125.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เลยทีเดียว ถึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% (Wolfe et al., 2003)

จากที่กล่าวมาข้างต้น ไม่ว่าจะป็นในเรื่องของสายพันธุ์แอปเปิ้ล หรือส่วนต่างๆของแอปเปิ้ลที่นำไปใช้ในการทดลองกับเซลล์มะเร็งก็ตามที่ จะเห็นได้ว่าล้วนแต่ทำให้เกิดผลต่อเซลล์มะเร็งที่ต่างกันออกไป ซึ่งการตอบสนองของเซลล์มะเร็งที่มีต่อสารสกัดแอปเปิ้ลนั้น ยังมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็งอีกด้วย ยกตัวอย่างของการศึกษาหนึ่งที่ได้แสดงให้เห็นถึงกรณีเมื่อนำสารสกัดจากแอปเปิ้ลมาบ่มกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นถูกยับยั้งแบบ dose-dependent โดยสามารถยับยั้งได้มากที่สุด  $43 \pm 1\%$  เมื่อบ่มกับแอปเปิ้ลที่มีเปลือก และ  $29 \pm 4.1\%$  เมื่อบ่มกับแอปเปิ้ลที่ไร้เปลือก ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างนี้บ่ม ณ

ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แนวโน้มเดียวกันนี้เองสามารถพบได้ เมื่อบ่มสารสกัดจาก แอปเปิ้ลกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยสามารถยับยั้งได้มากที่สุด  $57 \pm 0.21\%$  เมื่อบ่มกับแอปเปิ้ลที่มีเปลือก และ  $40 \pm 0.64\%$  เมื่อบ่มกับแอปเปิ้ลที่ไร้เปลือก ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างนี้บ่ม ณ ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Eberhardt et al., 2000)

นอกจากที่กล่าวมาข้างต้น ในเรื่องความเกี่ยวข้องของสารต่างๆที่สามารถพบได้ในแอปเปิ้ลที่มีต่อโรคมะเร็งนั้น ได้มีผู้ให้ความสนใจทำการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยในปี 1995 Menon และคณะได้ทำการศึกษาใน B16F10 melanoma cell และรายงานว่ catechin, rutin, และ epicatechin สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ แต่พวกเขากลับพบว่า quercetin นั้นเป็นสารโพลีฟีนอลที่ไม่สามารถยับยั้งการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Menon et al., 1995; Manach et al., 2004) แต่จากนั้นในปี 1999 Huang และคณะได้ผลการศึกษาที่ออกมาขัดแย้งกับคณะของ Menon โดยพวกเขาได้รายงานไว้ว่า quercetin น่าจะเป็นสารในกลุ่มของ flavonoids ตัวหนึ่งที่มีความสามารถในการต้านมะเร็งและยับยั้งการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยมีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการหลั่งเอนไซม์ Matrix metalloproteinase (MMP) (Huang et al., 1999) และในปีเดียวกันนี้เองที่ Tazawa และคณะพบว่า pectin มีฤทธิ์ในด้านการยับยั้งการอักเสบและยังมีหน้าที่ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ การป้องกันการเกิดการแพร่กระจายของมะเร็งตับ (Tazawa et al., 1999) ต่อมาในปี 2002 Knekt และคณะได้ทำการศึกษารายงานต่างๆในกลุ่มของ flavonoids กับอัตราการเกิดโรคมะเร็ง พบว่าอัตราในการเกิดโรคมะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่บริโภค quercetin โดยเฉพาะมะเร็งปอดและมะเร็งเต้านม (Knekt et al., 2002) ส่วนในปี 2005 Gosse และคณะพบว่า procyanidin สามารถทำให้เกิดการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้พวกเขายังพบว่า procyanidin มีฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งอีกด้วยโดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็ง SW620 (Human metastasis colon carcinoma) (Gosse et al., 2005)

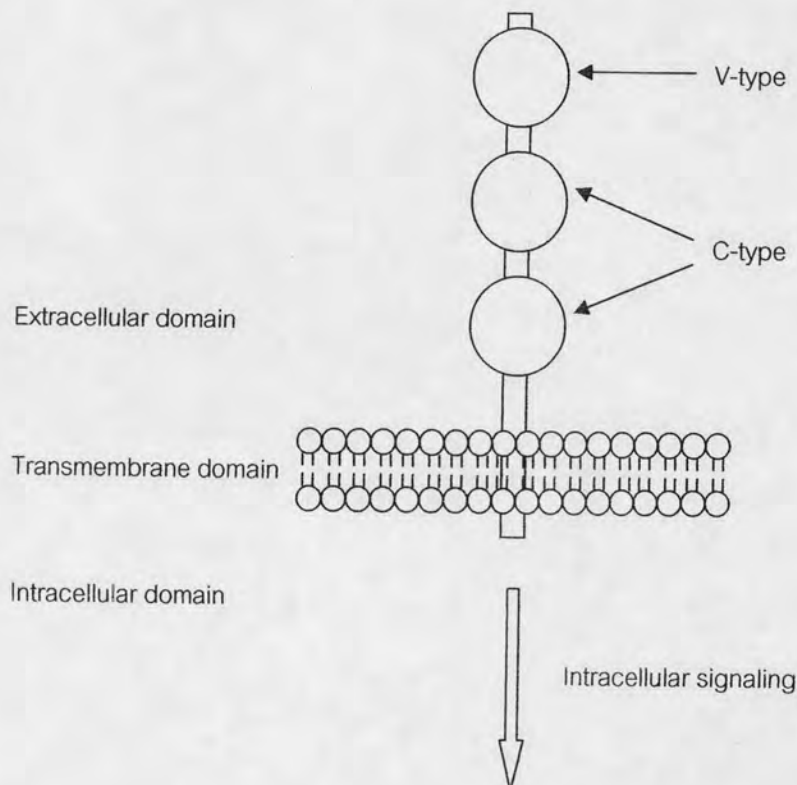
ในด้านของ quercetin นั้น เป็นสารในกลุ่มของโพลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant ที่สูงตัวหนึ่ง โดย quercetin ถูกพบว่าสามารถลดการแสดงออกของ p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็งเต้านม หยุด human leukemic T cell ในขั้นตอนของ G1 (Kasai et al., 2000) เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบว่า quercetin ในปริมาณที่สูงนั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ colon carcinoma cell line และใน mammary adenocarcinoma cell line แต่ในทางกลับกัน ปริมาณของ quercetin ในระดับต่ำ จะกลับกลายเป็นการกระตุ้นให้เพิ่ม

การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยจะมีการเพิ่มขึ้น 20% ในเซลล์มะเร็งตับ และมีการเพิ่มขึ้น 100% ในเซลล์มะเร็งทรวงอก (Van der Woude et al., 2003) อย่างไรก็ตาม quercetin ในระดับต่ำ (10  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง Mol-4 Human Leukemia และยัง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis ได้อีกด้วย (Mertens-Talcott et al., 2003)

แม้ว่าการศึกษาผลของแอปเปิ้ลในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง จะยังไม่เป็นที่แพร่หลายเท่ากับการศึกษาผลของสาร catechin ที่พบในชา แต่ได้มีการรายงานการเปรียบเทียบระหว่างผลที่ได้จากการดื่มชาและการได้รับ total catechin พบว่าการบริโภคทั้ง 2 อย่างนี้ไม่ส่งผลโดยตรงต่อมะเร็งปอด แต่ในทางกลับกัน การบริโภคแอปเปิ้ลกลับสามารถลดการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ (Arts et al., 2001) จากผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าลำพัง catechin เพียงตัวเดียวนั้นไม่สามารถส่งผลต่อมะเร็งปอดได้ (Boyer and Liu, 2004) ประกอบกับยังมีการศึกษาที่ได้รายงานถึงผลของการเปรียบเทียบประโยชน์ที่ได้ ระหว่างการรับประทานผักผลไม้กับการรับประทานสารสกัดบริสุทธิ์เพียงตัวใดตัวหนึ่ง พบว่าการรับประทานผักผลไม้เข้าไปโดยตรงนั้นจะส่งผลในเรื่องของสุขภาพ เช่น ผลทางด้าน antioxidant และการต้านมะเร็งได้ดีกว่าการรับประทานสารสกัดบริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูงกว่ามาก ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการที่สารประกอบต่างๆในผักผลไม้เหล่านั้น มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมกันโดยผ่านกระบวนการบางอย่างที่ก่อให้เกิดความสมดุล หรืออาจจะเป็นในเรื่องของกรรมวิธีก่อนที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารสกัดบริสุทธิ์เหล่านั้นออกมา ซึ่งอาจทำให้สูญเสียสารเคมีบางอย่างที่มีประโยชน์ไป (Liu et al., 2005) ด้วยเหตุผลตามที่กล่าวมาข้างต้น ประกอบกับจากหลายๆการศึกษาที่ผ่านมาที่ได้แสดงถึงสารเคมีที่มีประโยชน์หลายๆชนิดในแอปเปิ้ล ซึ่งเกือบทั้งหมดเป็นสารในจำพวกของโพลีฟีนอลนั่นเอง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ผู้ทำการวิจัยจึงคาดว่าสารสกัดจากแอปเปิ้ลน่าจะมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารบริสุทธิ์เพียงสารตัวเดียวนั่นเอง

## 2. RAGE

RAGE หรือ Receptor of Advanced Glycation Endproducts จัดเป็น multiligand receptor ตัวหนึ่งที่อยู่ในกลุ่ม immunoglobulin superfamily ของโมเลกุลบนผิวเซลล์ (Schmidt et al., 1992; Neeper et al., 1992) จากภาพที่ 6 ได้แสดงให้เห็นว่า RAGE ประกอบไปด้วย 3 ส่วนใหญ่ๆด้วยกันคือ ส่วนของ extracellular domain โดยในส่วนนี้จะประกอบไปด้วย V-type 1 ส่วน ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้จับกับ ligands และ C-type 2 ส่วน โดยทั้ง V-type และ C-type ต่างก็เป็นส่วนของ immunoglobulin เช่นกัน (Neeper et al., 1992; Kislinger et al., 1999; Hofman et al., 1999) ถัดจากส่วนของ extracellular domain แล้ว พบว่า RAGE ยังประกอบไปด้วยส่วนของ transmembrane domain ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น hydrophobic และส่วนของ intracellular domain ซึ่งเป็นส่วนที่มีประจุสูง และเป็นส่วนที่จำเป็นสำหรับการส่งสัญญาณต่างๆต่อไปภายในเซลล์อีกด้วย (Stern et al., 2002; Huttunen et al., 2004) โดยยีน RAGE จะอยู่ตรงตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 6 ใน major histocompatibility complex ระหว่างยีนใน class II และยีน class III (Sugaya et al., 1994)



ภาพที่ 6 : ภาพแสดงส่วนต่างๆของ RAGE ได้แก่ extracellular, transmembrane และ Intracellular domain

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามี การแสดงออกของ RAGE บนผิวเซลล์ที่หลากหลายแตกต่างกันออกไป ซึ่งเซลล์ที่มีการแสดงออกของ RAGE อยู่บนผิวเซลล์ ได้แก่ endothelial cell, smooth muscle cell, lymphocytes, monocytes และ neurons (Brett et al., 1993) เป็นต้น

## 2.1 Ligands ของ RAGE

RAGE สามารถจับกับ ligands ได้หลากหลาย อันได้แก่ S100/calgranulins, high-mobility group protein-1 (HMGB1 เช่น amphoterin) และ Amyloid  $\beta$  เป็นต้น (Rojasa and Morales, 2004) ซึ่งการจับกันระหว่าง RAGE กับ ligands เหล่านี้ จะก่อให้เกิดการกระตุ้นของกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (Bartling et al., 2005) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดกระบวนการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ ได้แก่  $p21^{ras}$ , MAP kinase, Nuclear factor (NF) -  $\kappa B$  และ cdc42/rac (Yan et al., 1994; Lander et al., 1997; Huttunen et al., 1999) เป็นต้น โดยสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

### 2.1.1 Amphoterin

Amphoterin เป็น 1 ใน ligand ของ RAGE จะพบการแสดงออกของ amphoterin สูงบนผิวของเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง และบนผิวเซลล์ malignant (Fages et al., 2000) เมื่อเกิดการจับกันกับ RAGE แล้ว จะก่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง การรุกรานเซลล์ข้างเคียง การแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย และก่อให้เกิดการสร้าง MMP ขึ้น ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Huang et al., 1999) จากการศึกษานี้พบว่าถ้ายับยั้งการจับกันระหว่าง RAGE และ amphoterin แล้ว จะสามารถลดการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Taguchi et al., 2000) โดยจะไปลดการกระตุ้นของ p44/p42, p38 และ SAP/JNK MAP kinase ซึ่งล้วนแต่มีส่วนในเรื่องของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การเกิดการรุกราน และการแสดงออกของ MMP ทั้งสิ้น (Brunet et al., 1999; Tsang and Crowe, 1999; Talarmin et al., 1999; Klemke et al., 1997; Montesano et al., 1999; Reddy et al., 1999; Aguirre-Ghiso et al., 1999; Esparza et al., 1999)

นอกจากนี้ยังมีอีกการศึกษาหนึ่งที่ยืนยันถึงบทบาทของ amphoterin ในเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่า เมื่อทำการ transfect antisense oligonucleotide เข้าสู่เซลล์แล้ว จะก่อให้เกิดการลดจำนวนลงในเรื่องการแสดงออกของ amphoterin ทั้งในส่วนของ mRNA และ โปรตีน ซึ่งการลดลงนี้ยังก่อให้เกิดผลที่แสดงให้เห็นถึงการถูกยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์อีกด้วย โดยการลดลงของ amphoterin mRNA นั้น จะไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อ  $\beta$ -actin mRNA แต่อย่างใด (Fages et al., 2000)

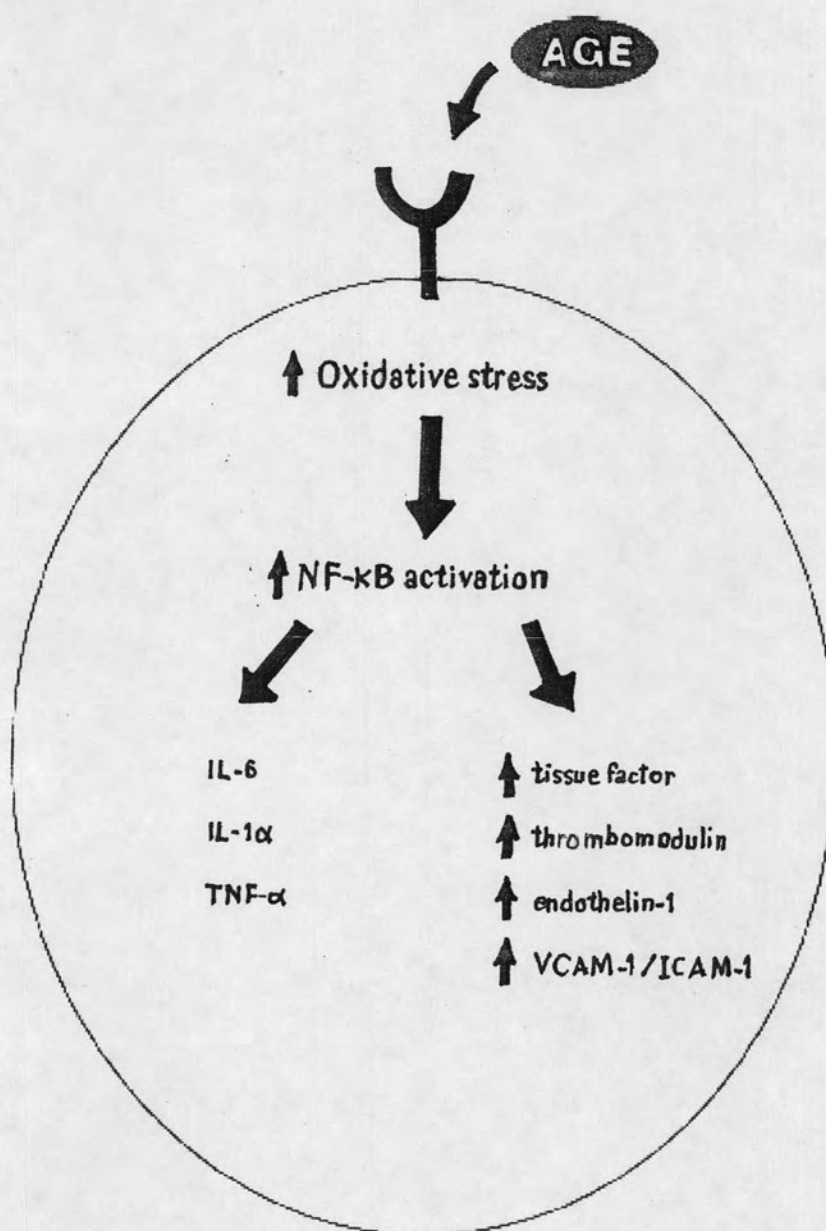
### 2.1.2 AGEs (Advanced Glycation Endproducts)

AGEs เป็นผลผลิตของกระบวนการ non-enzymatic glycation/oxidation จากโปรตีน/ไขมัน โดยจะมีการสะสมที่มากขึ้นตามช่วงอายุขัย และเป็นตัวที่ก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้น อันได้แก่ โรคเบาหวาน ไตวาย และโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Brownlee et al., 1988; Vlassara et al., 1988; Kirstein et al., 1990; Schmidt et al., 1994)

เมื่อทำการพิจารณาถึงกลไกการส่งสัญญาณที่เกิดขึ้นภายในเซลล์อันเนื่องมาจากการเกิดการจับกันระหว่าง AGE กับ RAGE นั้น จะเห็นได้ว่า RAGE สามารถกระตุ้นให้เกิด Reactive Oxygen Intermediates (ROIs) และเกิด NF- $\kappa$ B ขึ้น โดยผ่านทางกระตุ้นของ p21<sup>ras</sup> และ p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathway นอกจากนี้ยังก่อให้เกิด oxidative stress อีกด้วย (Yan et al., 1994; Ahmed , 2005; Lander et al., 1997; Wautier et al., 1994) โดย NF- $\kappa$ B เองนั้นเป็น transcription factor ของยีนเป้าหมายที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Dorai and Aggarwal, 2004) และในส่วน promoter ของยีน RAGE ยังมี binding site ของ NF- $\kappa$ B อยู่ถึง 2 แห่ง ดังนั้นนอกจาก RAGE จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NF- $\kappa$ B แล้ว ยังเป็นตัวการในการเพิ่มจำนวน NF- $\kappa$ B อีกทางหนึ่งด้วย (Rojasa and Morales, 2004) โดยมีการศึกษาในเซลล์ของ human melanoma พบว่า AGE นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งโดยผ่านกระบวนการจับกันระหว่าง RAGE นั้นเอง (Abe et al., 2004) นอกจากนี้ ยังมีอีกการศึกษาหนึ่งที่ได้แสดงให้เห็นว่า AGE นั้นเป็นตัวการหนึ่งที่ทำให้เกิดการแสดงออกของ Cyclooxygenase (COX)-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการเกิดการรุกรานของ

เซลล์มะเร็ง (Aggarwal and Shishodia, 2006) ทั้งในส่วนของ mRNA และโปรตีน (Shanmugam et al., 2003)

ในหลายๆการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าการเกิด ROIs และการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress นั้น จะเป็นปัจจัยหนึ่งในการก่อให้เกิด signal transduction และการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป โดยผลที่เกิดจากการจับกันระหว่าง RAGE และ AGE นั้น สามารถยับยั้งโดยสาร antioxidant ได้ ยกตัวอย่างเช่น N-acetylcysteine, probutol, pirrolidine dithiocarbamate และวิตามินอี เป็นต้น (Otero et al., 2001; Wautier et al., 1996; Schmidt, et al., 1995a; Schmidt, et al., 1995b; Schmidt et al., 1995c)



ภาพที่ 7 : ภาพแสดงการจับกันระหว่าง AGE กับ RAGE บน macrophage ก่อให้เกิด oxidative stress และการกระตุ้นการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ (Ahmed, 2005)



จากภาพที่ 7 ได้แสดงให้เห็นว่า การเกิดการจับกันระหว่าง RAGE และ AGE นั้น นอกจากจะก่อให้เกิด oxidative stress แล้ว oxidative stress ที่เกิดขึ้นนั้น จะก่อให้เกิด การกระตุ้นของ NF-KB ซึ่ง NF-KB นั้นถือเป็น oxidant-sensitive transcription factor (Yan et al., 1994) ตัวหนึ่งนั่นเอง โดย NF-KB นั้น อาจจะทำให้เกิดการพัฒนาระดับของ proinflammatory โดยการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่างๆ ซึ่ง 1 ในนั้นคือ ตัว ของ RAGE เอง (Li and Schmidt, 1997)

### 2.1.3 S100/calgranulins

S100 protein อยู่ใน multigenic family ของ calcium-binding protein ซึ่งการ เกิดการจับกันระหว่าง RAGE กับ S100/calgranulins นั้น จากการศึกษาพบว่ามี ความเกี่ยวข้องในเรื่องของกระบวนการเกิดการอักเสบของเส้นเลือด (Yan et al., 2003) และมีความเกี่ยวข้อง กับโรคมะเร็ง (Hudson et al., 2002) ปัจจุบันมีการค้นพบ S100 protein มากกว่า 20 แบบ แต่ละแบบก็จะมี การแสดงออกที่จำเพาะในแต่ละชนิดของเซลล์ หรือ เนื้อเยื่อนั้นๆ (Donato, 2001; Zimmer et al., 1995) ซึ่ง S100 protein หลายตัวเลย ที่เกี่ยวข้อง ยกตัวอย่างเช่น S100A8 และ S100A9 ที่มีส่วนร่วมในเรื่องของการพัฒนาและ ความก้าวหน้าของ tumor (Sherbet and Lakshmi, 1998; Gebhardt et al., 2002; Ott et al., 2003; Arai et al., 2004; Emberley et al., 2004) โดยทั้ง 2 ตัวนี้ จะมีความสามารถในการเหนี่ยวนำกระบวนการของ MAP kinase, NF-KB และเพิ่มการ เคลื่อนที่ของ prostatic epithelial cell (Hermania et al., 2006) แต่ในทางกลับกัน สมาชิกใน S100 family บางตัว เช่น S100A2 กลับพบว่ามีหน้าที่ในการเป็น tumor suppressor (Lee et al., 1991; Wicki et al., 1997; Feng et al., 2001; Nagy et al., 2001; Gupta et al., 2003) เช่นกัน

จากการศึกษาหนึ่ง ได้แสดงให้เห็นถึงการจับกันโดยตรงระหว่าง RAGE กับ S100 protein บางชนิด อันได้แก่ S100A12, S100B, S100A1 และ S100P (Hofman et al., 1999; Huttunen et al., 2000; Arumugam et al., 2004) ซึ่งเมื่อเกิดการจับกันกับ RAGE แล้ว จะก่อให้เกิดการส่งสัญญาณขึ้น ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของ p38 หรือ p44/42 (MAP) kinase, Cdc42/Rac (GTPase) และ NF-KB ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ล้วนมีผลกระทบในเรื่องของการอยู่รอดของเซลล์ การ

เคลื่อนที่ของเซลล์ และการตอบสนองต่อการอักเสบ (Hofman et al., 1999; Taguchi et al., 2000)

## 2.2 RAGE กับโรคมะเร็ง

นอกจากความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับ ligands ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว จากหลายๆ การศึกษาพบว่าความสามารถในการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั้น ยังมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ RAGE บนผิวเซลล์อีกทางหนึ่ง โดยมีการศึกษาในเซลล์มะเร็งของ human biliary พบว่ายิ่งเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ RAGE บนผิวเซลล์มากเท่าไร เซลล์มะเร็งนั้นยิ่งมีความสามารถในการรุกรานสูงมากขึ้นตามไปด้วย (Hirata et al., 2003) นอกจากนี้ในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าการแสดงออกของ RAGE ที่สูงขึ้น จะมีความเชื่อมโยงกับการรุกรานของ tumor เช่นกัน (Kuniyasu et al., 2003) และมีการค้นพบว่า หากมีการขัดขวาง RAGE แล้ว การเจริญเติบโตและการรุกรานของ tumor ในหนูทดลองนั้น จะมีการลดลงอีกด้วย (Taguchi et al., 2000) ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นทั้งหมด จะเห็นได้ว่าล้วนแต่สนับสนุนแนวความคิดที่ RAGE นั้นส่งผลกระทบต่อการประพัตตัวของเซลล์ในเรื่องของการรุกรานหรือการเคลื่อนที่นั่นเอง ปัจจุบัน RAGE ยังเป็นที่รู้กันว่า มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของตัวมันเอง โดยผ่านทางกระบวนการที่ขึ้นอยู่กับการกระตุ้นของ NF- $\kappa$ B อีกด้วย (Li and Schmidt, 1997)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน RAGE กับ MMP-9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งตับอ่อนทั้ง 3 ชนิด อันได้แก่ PANC-1, MIA PaCa-2 และ BxPC-3 พบว่าเซลล์มะเร็ง PANC-1 ที่มีการแสดงออกของยีน RAGE สูงที่สุดในบรรดาเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดนั้น จะมีการแสดงออกของ MMP-9 ที่สูงตามไปด้วย แต่ในทางกลับกัน เซลล์มะเร็ง BxPC-3 ที่มีการแสดงออกของยีน RAGE น้อยที่สุดนั้น จะมีการแสดงออกของ MMP-9 ที่น้อยที่สุดเช่นกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ในเซลล์มะเร็งตับอ่อนนั้น จะมีการแสดงออกของ MMP-9 เป็นไปในทางเดียวกันกับการแสดงออกของยีน RAGE นั่นเอง ซึ่งผลการศึกษานี้ได้ทำการสนับสนุนแนวคิดในเรื่องของแนวทางการรักษามะเร็งที่ว่า RAGE จะกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (Takada et al., 2004)

ในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับ MMP นั้น เป็นที่น่าสนใจว่าถ้ามีการแสดงออกของ RAGE ที่มากกว่าปกติแล้ว จะพบว่าการอักเสบที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อันเนื่องมาจากความไม่คงตัวของ plague โดยการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ metalloproteinase นั้นเอง (Cipollone et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่า RAGE นั้นจะช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ โดยผ่านทาง การแสดงออกของ anti-apoptotic protein ที่มีชื่อว่า Bcl-2 (Huttunen et al., 2000) นอกจากนี้ การกระตุ้น RAGE นั้นอาจส่งเสริมให้เกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่เพิ่มขึ้น อันเนื่องมาจากการส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ ซึ่งความสัมพันธ์นี้เป็นแบบผกผันกันระหว่าง apoptotic กับการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั่นเอง (Wong et al., 2001)

ถึงแม้ว่าระดับการแสดงออกของ RAGE จะมีความสัมพันธ์โดยตรงไปตรงกับความความสามารถในการเกิดการรุกรานของมะเร็งนั้น แต่บางการศึกษาที่ได้แสดงถึงข้อขัดแย้งเกี่ยวกับบทบาทของ RAGE ที่มีต่อมะเร็ง ได้แสดงให้เห็นว่าการจับกันระหว่าง RAGE และ amphoterin ตรงตำแหน่ง C-terminal motif นั้น จะก่อให้เกิดการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง neuroblastoma และ melanoma (Huttunen et al., 2002) นอกจากนี้ ยังพบว่ายังมีการแสดงออกของ RAGE สูงมากในเนื้อเยื่อปกติอีกด้วย โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อปอด (Brett et al., 1993)

### 3. ทฤษฎีและหลักการที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.1 หลักการทำงานของเครื่อง Lyophilizer (Savant, USA)

เป็นการเตรียมสารให้แห้ง โดยใช้ความเย็นแบบสุญญากาศ (freeze Dryer/lyophilizer) โดยใช้หลักการทำแห้งสารละลายด้วยวิธีการระเหิด (sublimation) โดยการนำสารตัวอย่างไปแช่แข็ง (pre-freeze) ก่อนนำมาเข้าเครื่อง lyophilizer ซึ่งเครื่องนี้จะมีการต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ เพื่อลดความดันบรรยากาศให้อยู่ในสภาพสุญญากาศ ทำให้ระเหิดส่วนที่เป็นน้ำแข็ง ออกจากส่วนที่เป็นเนื้อสารตัวอย่าง (solute) ทำให้สารตัวอย่างไม่เสียคุณสมบัติ เหมาะสำหรับการเก็บชีวสารให้คงสภาพเดิมได้ยาวนาน โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังต่อไปนี้ pre-freeze, freezing ในการเตรียมสารก่อนทำการ freeze dry, primary drying เพื่อทำการระเหิดน้ำออกจากตัวอย่าง และ

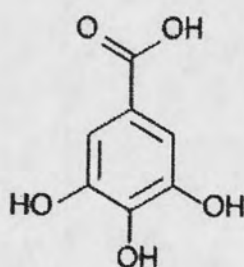
ขั้นตอนสุดท้ายคือ ขั้นตอนของ secondary drying เพื่อทำการกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่ให้หมดไป เพื่อให้ได้สารที่แห้ง

### 3.2 หลักการทำงานของเครื่อง High Intensity Ultrasonic Processor

เครื่อง ultrasonic power supply จะเปลี่ยนจาก 50/60 Hz line voltage ให้กลายเป็นพลังงานไฟฟ้าที่มีคลื่นความถี่สูง 20 kHz (20,000 รอบต่อวินาที) โดยพลังงานไฟฟ้าที่มีคลื่นความถี่สูงนี้ จะถูกส่งไปยัง piezoelectric transducer ที่อยู่ในตัว converter ซึ่งตัวของ converter จะเป็นตัวเปลี่ยนให้พลังงานไฟฟ้ากลายเป็นการสั่นเชิงกล (mechanical vibration) การสั่นที่เกิดจาก converter นี้ จะถูกทำให้รุนแรงขึ้นโดย probe ก่อให้เกิดการสร้างคลื่นความดันในของเหลว จากปรากฏการณ์นี้เองที่เป็นตัวสร้างฟอง microscopic เป็นล้านๆฟอง (cavities) โดยฟองจะเกิดการขยายตัวระหว่าง negative pressure excursion และเกิดการระเบิดเข้าข้างใน (implode) ระหว่าง positive excursion โดยปรากฏการณ์นี้ เรียกว่า cavitation ซึ่งจะเป็นตัวสร้าง shearing action ที่มีพลัง ให้เกิดขึ้นที่ probe tip และเป็นสาเหตุที่ทำให้โมเลกุลในของเหลวเกิดการกระเพื่อมอย่างรุนแรง

### 3.3 หลักการวัดค่าโพลีฟีนอลโดยใช้หลักการของ Folin-Ciocalteu (ALNICOLSA del Perú S.A.C., 2007)

น้ำยา Folin-Ciocalteu เป็นสารละลายที่อยู่ในรูปของ complex polymeric ions formed ที่มาจาก phosphomolybdic กับ phosphotungstic heteropoly acids โดยจะไปทำการ oxidise phenolates และเกิดการ reducing heteropoly acids ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ blue molybdenum-tungsten (wolfram) ที่มีสีฟ้า

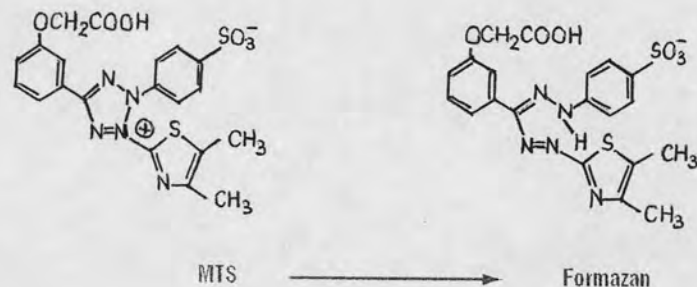


ภาพที่ 8 : ภาพแสดงโครงสร้างของกรดแกลลิก

ส่วนสาเหตุที่ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการวัดค่าของโพลีฟีนอลโดยรวมนั้น กรดแกลลิกแม้จะไม่ใช่ประเภทของโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในแอปเปิ้ลก็ตามที แต่เป็นสารที่ง่ายต่อการนำมาใช้ และยังมีความคงตัวมากกว่าสารมาตรฐานตัวเลือกอื่น เช่น epicatechin นอกจากนี้ค่าที่ตอบสนองต่อปริมาณกรัม (response per gram) ที่ใช้นั้น ยังมีความใกล้เคียงกับค่าของโพลีฟีนอลที่พบในแอปเปิ้ลอีกด้วย โดยโครงสร้างของกรดแกลลิกได้แสดงไว้ตามภาพที่ 8

### 3.4 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยใช้ MTS assay (Promega)

CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ใช้หลักการของ colorimetric method ที่ใช้ในการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ในขั้นตอนการทำ proliferation หรือ cytotoxicity assay ซึ่งในชุดน้ำยา CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution นี้จะประกอบไปด้วยสารประกอบ tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS] และน้ำยาที่เป็น electron coupling (phenazine ethosulfate, PES) โดย PES นี้จะเป็นตัวเพิ่มความเสถียรทางเคมี โดยเมื่อเกิดการจับกันกับ MTS แล้วจะก่อให้เกิดสารละลายที่มีความคงตัวขึ้น



ภาพที่ 9 : โครงสร้างของ MTS tetrazolium และ formazan product (Promega, 2005)

จากภาพที่ 9 สารประกอบ MTS tetrazolium (Owen's reagent) จะถูกรีดิวซ์โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิต ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่งเป็นสารมีสีที่สามารถละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นจากการสร้าง Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) หรือ Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) ขึ้น ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ dehydrogenase ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตนั่นเอง (Berridge and Tan, 1993) โดยปริมาณของผลิตภัณฑ์ formazan ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 490 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนั่นเอง

### 3.5 การวัดการรุกรานของเซลล์มะเร็งโดยใช้ matrigel assay (Becton Dickinson)

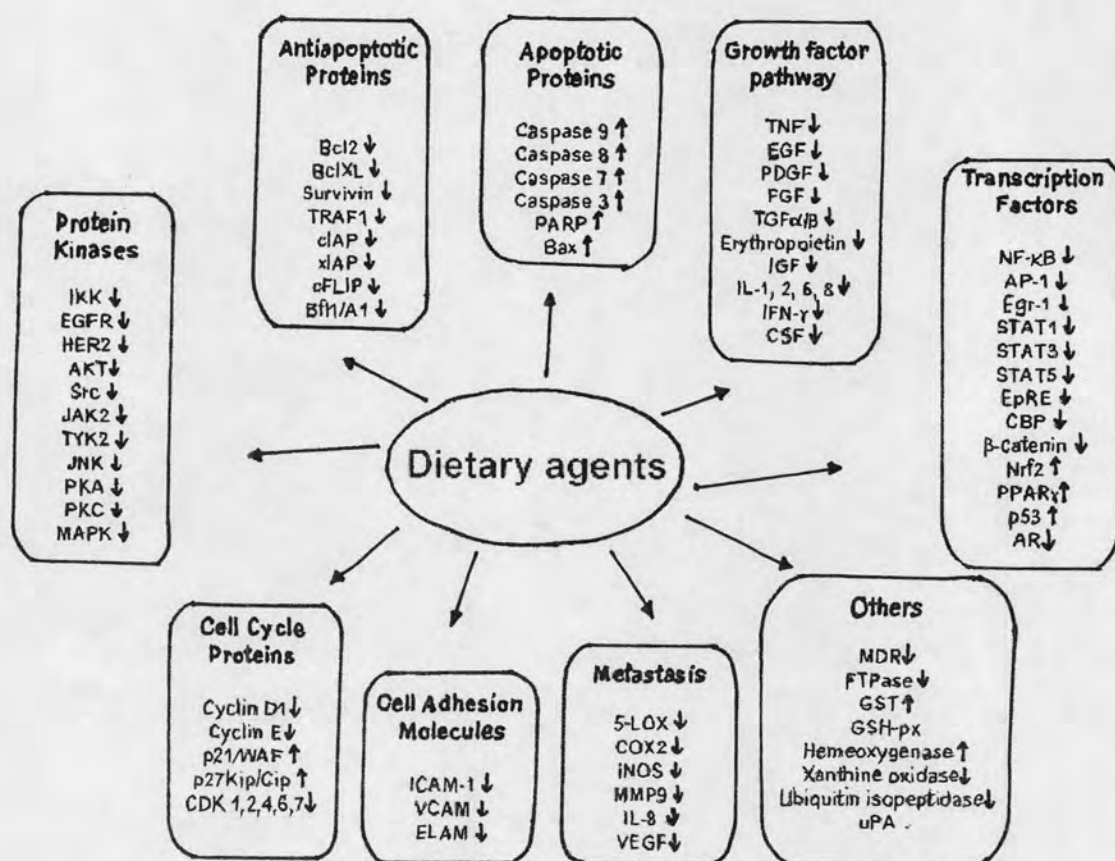
Matrigel Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson) เป็น solubilized basement membrane ที่สกัดมาจาก Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma ซึ่งเป็น tumor ชนิดหนึ่ง ที่อุดมไปด้วย extracellular matrix proteins โดยส่วนประกอบหลักนั้นคือ laminin ตามมาด้วยส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ collagen IV, heparan sulfate proteoglycans, entactin และ nidogen นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย TGF-beta, fibroblast growth factor, tissue plasminogen activator และ growth factors ตัวอื่นๆ ที่สามารถพบได้เป็นปกติใน EHS tumor

Matrigel Basement Membrane Matrix ใช้เป็นตัวแทนของ basement membrane ใน *in vitro* โดยที่อุณหภูมิห้อง Becton Dickinson (BD) Matrigel™ Matrix จะเกิดการ polymerization ขึ้น ก่อให้เกิด biologically active matrix material ที่เปรียบเสมือน mammalian cellular basement membrane ทำให้เซลล์ประพฤติตัวเหมือนกับอยู่ใน *in vivo* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บน BD Matrigel™ Matrix โดย matrix จะเป็นตัวจัดสภาพแวดล้อมทางกายภาพให้สำหรับการศึกษาในเรื่องของรูปร่างเซลล์ หน้าที่ทางชีวเคมี การเคลื่อนที่ หรือ การรุกราน และการแสดงออกของยีน

สำหรับการศึกษาในเรื่องของการรุกรานนั้น matrix จะเป็นเสมือน barrier ที่กั้นเซลล์ที่ไม่สามารถเกิดการรุกรานได้ ในทางกลับกัน matrix จะมีโครงสร้างทางโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ที่สามารถเกิดการรุกราน โดยเซลล์ที่มีความสามารถในการรุกรานนั้น จะสามารถย่อย BD Matrigel™ Matrix ที่ทำการเคลือบอยู่บน membrane ก่อนที่เซลล์จะเคลื่อนตัวผ่าน membrane ผ่านทาง 8  $\mu\text{m}$  ของ PET membrane ลงไปยังด้านล่างของ membrane ได้ในที่สุด

4. เป้าหมายทางโมเลกุล (Molecular target) ที่นำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง

ปัจจุบันได้มีหลายๆการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึง molecular target ต่างๆที่ไม่เพียงแต่สามารถนำมาใช้ในการป้องกันโรคมะเร็งเท่านั้น แต่ยังสามารถนำมาใช้ในการรักษาได้อีกด้วย โดยสารเคมีที่มีประโยชน์ในผักและผลไม้ จากหลายๆการศึกษาพบว่า สารเคมีที่มีประโยชน์เหล่านี้สามารถที่จะเข้าไปรบกวน และส่งผลกระทบต่อ cell signaling pathway หลายๆด้าน ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของ cell cycle proteins, protein kinases, antiapoptotic proteins, growth factor pathway, transcription factors, metastasis และ cell adhesion molecules เป็นต้น



ภาพที่ 10 : molecular target ของ dietary agent (Aggarwal and Shishodia, 2006)



ในที่นี้จะขอยกตัวอย่าง molecular target ที่ผู้คนนิยมให้ความสนใจในเรื่องของการเป็นเป้าหมายในการป้องกัน และรักษาโรคมะเร็งอย่างคร่าวๆดังต่อไปนี้

#### 4.1 nuclear factor-kappa B (NF-KB)

NF-KB เป็นหนึ่งใน family ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ protein dimers ที่จับกับ common sequence motif ในดีเอ็นเอที่เรียกว่า KB site (Aggarwal, 2004) ซึ่งหลักฐานที่ได้แสดงให้เห็นว่า p50 subunit (v-REL) ของ NF-KB นั้น เป็นหนึ่งในสมาชิกของ reticuloendotheliosis (REL) family ของไวรัส ได้กลายเป็นตัวที่ชี้ให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า NF-KB นี้มีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง โดยในสภาวะ resting นั้น NF-KB dimers จะอยู่ในส่วนของ cytoplasm แต่ถ้า NF-KB ถูกกระตุ้น โดยสิ่งต่างๆ ได้แก่ free radicals, inflammatory stimuli, cytokines, carcinogens, tumor promoters, endotoxins,  $\gamma$ -radiation, ultraviolet (UV) light และ X-rays NF-KB จะเกิดการย้ายตำแหน่งไปยังนิวเคลียส ซึ่งเป็นที่ที่ NF-KB เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนมากกว่า 200 ยีน ทำให้เกิดการลดลงของ apoptosis และเหนี่ยวนำทำให้เกิด cellular transformation, proliferation, invasion, metastasis, chemo-resistance, radio-resistance และ inflammation ในหลายๆยีนเป้าหมายเลยทีเดียวที่ถูกกระตุ้นแล้วจะกลายเป็นจุดวิกฤตที่เป็นตัวการก่อให้เกิด early และ late stages ของโรคมะเร็งที่มีความร้ายแรงได้ ซึ่งก็รวมไปถึง การแสดงออกของ cyclin D1, apoptosis suppressor proteins อันได้แก่ Bcl-2 และ Bcl-xl ด้วย ซึ่งสิ่งเหล่านี้ล้วนจำเป็นต่อการเกิด metastasis และ angiogenesis เช่น เอนไซม์ MMP และ vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นต้น (Aggarwal and Shishodia, 2006) ซึ่งสารเคมีที่พบในผักและผลไม้ นั่น ursolic acid ที่พบในแอปเปิ้ลนั้น (Aggarwal and Shishodia, 2006) เป็นสารเคมีตามธรรมชาติที่พบว่าสามารถยับยั้ง NF-KB ได้ โดยจะไปปิดกั้นขั้นตอนใน NF-KB signaling pathway เช่น signals ที่ใช้ในการกระตุ้น NF-KB signaling cascade การเกิด translocation ของ NF-KB เข้าสู่ นิวเคลียส การเกิด DNA binding ของ dimer หรือจะเป็นการเกิด interactions กับ basal transcriptional machinery (Shishodia et al., 2003)

## 4.2 Activator protein-1 (AP-1)

AP-1 ถูกค้นพบในช่วงแรก โดยการจับกับ DNA sequence ใน SV40 enhancer (Bohmann et al., 1987) ซึ่ง complex นี้จะประกอบไปด้วย homo- หรือ heterodimers ของสมาชิกใน JUN และ FOS family ของโปรตีน สิ่งกระตุ้นต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น growth factor และ oncoproteins นั้น จะเป็นตัวเหนี่ยวนำที่มีพลังของ AP-1 activity นอกจากนี้ AP-1 ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดย TNF และ Interleukin 1 (IL-1) หรือ ความตึงเครียดจากสภาพแวดล้อม อันได้แก่ UV radiation ได้อีกทางหนึ่งด้วยเช่นกัน (Eferl and Wagner, 2003) การกระตุ้น AP-1 ที่เกิดขึ้นนั้น จะมีความเกี่ยวข้องในเรื่องของ growth regulation, cell transformation, inflammation และ innate immune response นอกจากนี้ AP-1 ยังมีส่วนร่วมในการควบคุมยีนที่มีความเกี่ยวพันในเรื่องของการเกิด apoptosis และ proliferation และยังอาจช่วยส่งเสริม cell proliferation โดยผ่านทางกระตุ้น ยีน cyclin D1 และลดการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เป็น tumor-suppressor เช่น p53, p21cip1/waf1 และ p16 เป็นต้น (Aggarwal and Shishodia, 2006) ที่สำคัญที่สุดคือ AP-1 จะส่งเสริมการเกิด transition ของ tumor cell จากรูปร่าง epithelial ให้กลายเป็นรูปร่าง mesenchymal ซึ่งเป็นหนึ่งในขั้นตอนง่ายๆ ของการเกิด tumor metastasis โดยการแสดงออกของยีนบางยีน เช่น MMP และ uPa นั้น จะช่วยส่งเสริมการเกิด angiogenesis และ invasive growth ของเซลล์มะเร็งเป็นพิเศษ โดยคุณสมบัติทาง oncogenic เหล่านี้ของ AP-1 นั้น จะถูกบงการในขั้นต้น ด้วย dimer composition ของ AP-1 family proteins และ post-transcriptional และ translational modification ของ AP-1 (Eferl and Wagner, 2003) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า quercetin สามารถที่จะลดขั้นตอนของการกระตุ้น AP-1 ได้ (Lagarrigue et al., 1995) จากการศึกษาของ Lagarrigue และคณะ พบว่า quercetin ซึ่งเป็นสารเคมีตัวหนึ่งในกลุ่มของ flavonoid นั้น สามารถยับยั้งการเกิด transformation ของ rat liver epithelial cell line overexpressing c-Fos ได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การควบคุม c-Fos/AP-1 complexes นั้นอาจจะมีความเกี่ยวพันในเรื่องของกลไกการเกิด antitransformation ของ quercetin มีการพบว่าการ pretreat RAW 264.7 macrophages กับ quercetin จะไปปิดกั้นการเกิด LPS-induced TNF transcription ซึ่งผลของ quercetin นี้ เกิดจากการยับยั้งการเกิด phosphorylation และการกระตุ้น activation ของ JNK/stress-activated protein kinase โดยไป suppress การเกิด AP-1 DNA binding และไปทำการ down-regulating TNF transcription (Wadsworth et al., 2001)

### 4.3 Cell cycle

มีโปรตีนหลายๆตัวที่เป็นที่รู้จักว่า สามารถควบคุมเวลาของการเกิดเหตุการณ์ต่างๆ ใน cell cycle ได้ โดยการสูญเสียการควบคุมเหล่านี้ จะถือเป็น hallmark ของการเกิดโรคมะเร็ง ซึ่ง คุมควบคุมหลักใน cell cycle คือ cyclins และ cyclin-dependent kinases โดย cyclin D1 ซึ่งเป็น component subunit ของ cyclin-dependent kinase (Cdk)-4 และ Cdk-6 นั้น จะเป็น rate-limiting factor ในความก้าวหน้า (progression) ของเซลล์ ผ่านทาง the first gap (G1) phase of the cell cycle (Baldin et al., 1993) การเกิดการควบคุมที่ผิดปกติไปของ cell cycle check points และการเกิดการแสดงออกที่มากเกินไปของ growth-promoting cell cycle factors เช่น cyclin D1 และ cyclin-dependent kinases (CDK) นี้ จะมีความสัมพันธ์ในเรื่องของการเกิด tumor เช่นกัน (Diehl, 2002)

### 4.4 Apoptosis

การเกิด apoptosis นั้น จะช่วยในการควบคุมให้เกิดความสมดุลทางธรรมชาติระหว่าง เซลล์ตาย และเซลล์ที่เกิดขึ้นมาใหม่ในสัตว์ที่มีการเติบโตแล้ว โดยการทำลายเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้น มากผิดปกติ เซลล์ที่เกิดความเสียหาย หรือแม้กระทั่งเซลล์ที่มีความผิดปกติ แต่อย่างไรก็ตาม สมดุลระหว่างการอยู่รอด กับการเกิด apoptosis นั้นมักเป็นประเด็นที่มีการกล่าวถึงเสมอในเรื่อง ของเซลล์มะเร็ง ในหลายๆการศึกษาได้รายงานให้เห็นว่า การกระตุ้นของ NF-KB นั้น จะส่งเสริม การอยู่รอดของเซลล์ และการเกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เมื่อมีการ down-regulate ของ NF-KB ขึ้น จะเกิดการ sensitize เซลล์ เห็นยวนำให้เกิด apoptosis ขึ้น (Aggarwal, 2004) ส่วน การแสดงออกของยีนหลายๆยีน ที่ถูกควบคุมโดย NF-KB (NF-KB-regulated gene) ซึ่งรวมไปถึง Bcl-2, Bcl-XL, cIAP, survivin, TRAF1 และ TRAF2 นั้น มีการรายงานว่ามีหน้าที่เบื้องต้น โดยการไปกั้น apoptosis pathway (Aggarwal, 2004) มีหลายๆสารเคมีที่มีประโยชน์ (phytochemical) เลยทีเดียว ที่เป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถยับยั้ง NF-KB หรือการกระตุ้น AP-1 ได้ โดยพบว่าสามารถลดการเกิด cell proliferation และ sensitize เซลล์ ให้เห็นยวนำเกิดการ apoptosis (apoptosis induction) ขึ้น (Surh, 2003; Bharti and Aggarwal, 2002) ซึ่ง ursolic acid เป็นสารเคมีที่ทราบกันดีว่า สามารถทำให้เกิดการ down-regulate การแสดงออกของ apoptosis suppressor proteins เช่น Bcl-2 และ Bcl-X<sub>L</sub> ในเซลล์มะเร็งหลาย cell line ได้ (Aggarwal and Shishodia, 2006)

#### 4.5 Cell survival kinase Akt

Serine/threonine protein kinase Akt/PKB เป็น cellular homologue ของ viral oncogene v-Akt และสามารถถูกกระตุ้นด้วย growth factors และ survival factors หลายชนิดด้วยกัน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม isoform ของ Akt kinase ที่เป็นที่ยอมรับกันดี มี 3 isoforms ด้วยกัน คือ Akt1, Akt2 และ Akt3 ซึ่ง Akt นี้จะถูกกระตุ้นด้วย phospholipids binding และ phosphorylation ที่ Thr308 โดย PDK1 หรือที่ ser473 โดย PDK2 (Alessi et al., 1996) Akt มีบทบาทที่สำคัญใน mammalian cell survival signaling และถูกกระตุ้นในมะเร็งหลายชนิด (Clarke, 2003; Chang et al., 2003) Akt ที่ถูกกระตุ้นนั้น จะส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ โดยการกระตุ้นผ่านทาง NF-KB signaling pathway (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999) และยับยั้งการเกิด apoptosis โดยผ่านทาง การหยุดยั้งของ proapoptotic factor หลายๆ ตัวด้วยกัน ซึ่งรวมไปถึง Bad, Forkhead transcription factors และ caspase-9 (Brunet et al., 1999; Cardone et al., 1998; Rommel et al., 1999)

#### 4.6 Tumor-suppressor gene p53

p53 เป็น tumor-suppressor และ transcription factor ตัวหนึ่ง เป็นตัวควบคุมที่สำคัญในหลายๆกระบวนการที่เกิดขึ้นในเซลล์ รวมไปถึง cell signal transduction, การตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อ DNA-damage, genomic stability, cell cycle control และ apoptosis โปรตีนจะเป็นตัวไปกระตุ้นการเกิด transcription ของ downstream gene เช่น p21WAF1 และ Bax ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำกระบวนการเกิด apoptosis ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มี DNA ที่เสียหายอยู่ หรือเซลล์มะเร็ง (el-Deiry et al., 1993; Vogelstein and Kinzler, 1992) p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์จะสูญเสียความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลที่ตามมาคือ โปรตีน p21 จะไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ (cell division) ได้โดยง่าย เมื่อการแบ่งตัวของเซลล์ไม่สามารถควบคุมได้ ก็จะก่อให้เกิดเป็น tumor นั้นเอง (Aggarwal and Shishodia, 2006)

#### 4.7 Growth factors signaling pathways

Growth factors คือโปรตีนที่จับกับ receptor บนผิวเซลล์ โดยส่งผลเบื้องต้นคือ กระตุ้นการ proliferation และ/หรือ differentiation โดย growth factor บางชนิดที่มีส่วนร่วมในการเกิดมะเร็งนั้น คือ epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factors (FGFs), transforming growth factors (TGF)- $\alpha$  และ - $\beta$ , erythropoietin (Epo), insulin-like growth factor (IGF), interleukin (IL)-1, 2, 6, 8, tumor necrosis factor (TNF), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) และ colony-stimulating factors (CSFs) โดย cell proliferation signal ที่ทรงพลังนั้น จะถูกสร้างขึ้นจาก growth factor receptors หลากชนิด เช่น EGF receptor, IGF-1 receptor และ VEGF-receptor networks นี้เอง จะถูกประกอบขึ้นเป็นรากฐานสำหรับ receptor-driven tumorigenicity ในขั้นตอนความก้าวหน้าของมะเร็งหลายชนิด (Aggarwal and Shishodia, 2006) โดย catechin ถือเป็นหนึ่งในตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพในหลายๆ growth factor signaling pathway (Aggarwal and Shishodia, 2006)

#### 4.8 Chemokines และ metastasis

Chemokines คือ chemotactic cytokine เล็กๆ ที่จะก่อให้เกิดการ migration ของ leukocytes ได้โดยตรง กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบ และมีส่วนร่วมในการควบคุมการเจริญเติบโตของ tumor ซึ่ง chemokine ส่วนใหญ่จะเกิดการแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อสิ่งที่เข้ามากระตุ้น แต่สำหรับ chemokine บางชนิดนั้นจะมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่จำเพาะ chemokine (tissue-specific manner) chemokine จะแสดงคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการเกิด migration บน lymphocyte ผ่านทางการจับกับ chemokine receptor โดย interleukin 8 (IL-8/CXCL8) เป็น chemokine ตัวแรกที่ถูกค้นพบว่า สามารถกระตุ้น endothelial cell chemotaxis, proliferation และ angiogenesis ใน in vivo ได้ (Koch et al., 1992) นอกจากนี้ ระดับที่สูงขึ้นของ angiogenic CXC chemokine IL-8 นั้น จะสามารถตรวจพบได้ใน tumor หลากชนิดอีกด้วย (Aggarwal and Shishodia, 2006) ซึ่ง chemokines นั้นยังเป็น target ตัวหนึ่งของ quercetin อีกด้วย โดย quercetin จะไปยับยั้ง IL-1 induced transcriptional expression ของ MCP-1 ใน glomerular cell ผ่านทางการ suppression ของ NF-KB (Ishikawa et al., 1999)

#### 4.9 Tumor necrosis factor (TNF)

Tumor necrosis factor (TNF) ในช่วงแรกถูกค้นพบในฐานะที่เป็นผลของการมีฤทธิ์เป็น antitumor ปัจจุบันได้ถูกแสดงให้เห็นว่า เป็นสื่อในการเกิด tumor initiation, promotion, and metastasis (Aggarwal, 2003) จากหลายๆการทดลองพบว่า หนูที่ไม่มี TNF นั้น พบว่าสามารถทนต่อ skin carcinogenesis (Moore et al., 1999) ซึ่งการเหนี่ยวนำของ proinflammatory genes โดย TNF มีความเกี่ยวข้องกับโรคเป็นส่วนใหญ่ ผลทางด้าน proinflammatory ของ TNF นั้น เนื่องมาจากความสามารถในการกระตุ้น NF-KB ในเซลล์ส่วนใหญ่เมื่อเกิดการ expose กับ TNF จะกระตุ้น NF-KB และนำไปสู่การแสดงออกของ inflammatory genes ซึ่งรวมไปถึง cyclooxygenase-2 (COX-2), lipoxygenase-2 (LOX-2), cell-adhesion molecules, inflammatory cytokines, chemokines และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ด้วย TNF ถูกพบว่าเป็น growth factor สำหรับ tumor cells ส่วนใหญ่ (Sugarman et al., 1985) ซึ่งในที่นี้รวมไปถึง ovarian cancer cells, cutaneous T cell lymphoma (Giri and Aggarwal, 1998), glioblastoma (Aggarwal et al., 1996), acute myelogenous leukemia (Tucker et al., 2004), B cell lymphoma (Estrov et al., 1993), breast carcinoma (Sugarman et al., 1987), renal cell carcinoma (Chapekar et al., 1989), multiple myeloma (Borset et al., 1994) และ Hodgkin's lymphoma (Hsu and Hsu, 1990) fibroblasts ชนิดต่างๆ อันได้แก่ normal human fibroblasts, scleroderma fibroblasts, synovial fibroblasts และ periodontal fibroblasts จะเกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในการตอบสนองต่อ TNF ซึ่ง flavonoids ถูกรายงานว่ามีคุณสมบัติในการลดการเกิด inflammation และ oxidative stress ซึ่งจะมีประโยชน์มากในเรื่องของเซลล์มะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคอักเสบแบบเรื้อรัง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการรับประทานผักและผลไม้ นั้น จะสามารถป้องกันโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ โดยผ่านทาง การ suppression ของ TNF นั้นเอง (Aggarwal and Shishodia, 2006)

#### 4.10 Signal transducer and activator of transcription (STAT)

STAT proteins คือ signaling molecules ที่ถูกค้นพบ ในระหว่างการศึกษา interferon (IFN)- $\gamma$ -dependent gene expression (Darnell et al., 1994) mammalian STAT family members ทั้ง 7 ตัวนั้น สามารถถูกกระตุ้นโดย phosphorylation ผ่านทาง Janus kinase (JAK) หรือ cytokine receptors, G-protein-coupled receptors หรือ growth factor receptors (เช่น

EGFR) โดย platelet-derived growth factor receptors ที่มี tyrosine kinase activity อยู่ หรือ โดย intracellular non-receptor tyrosine kinase recruitment (Yu et al., 1995; Bromberg et al., 1998) STAT proteins เหล่านี้พบว่า มีส่วนช่วยในเรื่องของการอยู่รอดของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการป้องกันการเกิด apoptosis ผ่านทางการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2 และ Bcl-XL เมื่อไม่นานมานี้ STAT3 ถูกพบว่าเป็นตัวกระตุ้นโดยตรงของ VEGF gene ที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการเกิด angiogenesis ซึ่ง STAT3 activity ที่เพิ่มขึ้นนั้น จะสามารถพบได้ใน head squamous cell carcinoma, neck squamous cell carcinoma (Grandis et al., 1998), leukemias (Carlesso et al., 1996), lymphomas (Weber-Nordt et al., 1996) และ multiple myeloma (Bharti et al., 2003)

#### 4.11 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Cyclooxygenases คือ prostaglandin H synthase ที่เปลี่ยน arachidonic acid ที่ถูกปล่อยออกมาโดย membrane phospholipids เข้าสู่ prostaglandins isoforms โดย isoform ทั้ง 2 ชนิดของ prostaglandin H synthase คือ COX-1 และ COX-2 ซึ่ง COX-1 มีการแสดงออกในหลายๆเนื้อเยื่อ แต่ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่า การแสดงออกของ COX-2 นั้นถูกควบคุมโดย mitogen, tumor promoters, cytokines และ growth factors นอกจากนี้พบว่า COX-2 จะมีการแสดงออกที่สูงเกินกว่าระดับปกติในทุกๆ premalignant และ malignant condition ที่มีความเกี่ยวข้องกับ ลำไส้ใหญ่, ตับ, ตับอ่อน, หน้าอก, ปอด, ถุงน้ำดี, ผิวหนัง, ท้อง, ศีรษะ กับ คอ และ หลอดอาหาร (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003) ทั้งนี้ในหลายๆ transcription factor ซึ่งรวมไปถึง AP-1, NFIL-6 และ NF-KB สามารถกระตุ้นการเกิด transcription ของ COX-2 ได้ (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003) ดังนั้นถ้าสามารถยับยั้ง transcription factor เหล่านี้ได้แล้ว ก็จะสามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ได้ตามไปด้วย

#### 4.12 Mitogen-activated protein (MAP) kinases

นอกเหนือจาก NF-KB และ Akt pathway แล้ว MAPK pathway ยังได้รับความสนใจในด้านของการเป็น molecular target ในการป้องกัน และรักษาโรคมะเร็งอีกทางหนึ่งเช่นกัน โดย MAPK cascade จะหมายความรวมถึง extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs), c-Jun Nterminal kinases/stress-activated protein kinases (JNKs/SAPKs) และ p38

kinases ด้วย ERK ถูกเชื่อว่าจะมีบทบาทสำคัญในเรื่องของ transmitting signals ที่ริเริ่มโดย growth-inducing tumor promoters อันได้แก่ 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), epidermal growth factor (EGF) และ platelet-derived growth factor (PDGF) (Cowley et al., 1994; Minden et al., 1994) หรือในอีกนัยหนึ่งคือ stress-related tumor promoters อันได้แก่ ultraviolet (UV) irradiation และ arsenic ซึ่งจะไปกระตุ้น JNKs/SAPKs และ p38 kinases นั้นเอง (Bode and Dong, 2000; Bode and Dong 2003; Kallunki et al., 1994) MAPK pathway จะประกอบไปด้วย cascade คือ MAP3K จะไปกระตุ้น MAP2K แล้ว MAP2K ก็จะไปกระตุ้น MAPK (ERK, JNK, และ p38) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น NF-KB การเจริญเติบโตของเซลล์ และการอยู่รอดของเซลล์ขึ้น (Seger and Krebs, 1995)

#### 4.13 DNA methylation

DNA methylation คือ ผลของ covalent modification ในการเติมหมู่ methyl ลงใน cytosine ring การเกิด Hypermethylation นี้จะนำไปสู่การเกิด gene silencing ขึ้น โดยผ่านทาง การ suppression ของกระบวนการ transcription ซึ่ง DNA methylation นี้ จะเกิดโดยกลุ่มของเอนไซม์ที่รู้จักกันในชื่อของ DNA methyltransferases (DNMT) มียีนเป็นจำนวนมากที่พบว่า เกิด hypermethylation ขึ้นในโรคมะเร็ง (Das and Singal, 2004) ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกันในเรื่องของการควบคุม cell cycle ( $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4a}$ , Rb และ  $p14^{ARF}$ ) ก็ดี ยีนที่มีความเกี่ยวข้องในเรื่องของการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (BRCA1 และ MGMT) การเกิด apoptosis การดีออกซา การ detoxification การเกิด angiogenesis และ metastasis นั้น พบว่าล้วนแล้วแต่ไวต่อการเกิด hypermethylation ทั้งสิ้น โดยสารในกลุ่มของ bioflavonoids เช่น quercetin นั้น พบว่าสามารถยับยั้ง DNMT-mediated DNA methylation ใน concentration-dependent manner ได้ (Lee et al., 2005)

#### 4.14 Angiogenesis

Tumor angiogenesis คือการสร้างเครือข่ายเส้นเลือดที่แทรกแซงไปยังที่ที่มีการเจริญของมะเร็ง เพื่อใช้เป็นทางในการนำพาสารอาหาร ออกซิเจน และใช้เป็นทางในการนำพาของเสียออกไปทิ้ง ซึ่งการเกิด tumor angiogenesis นั้น จะเริ่มต้นจากการที่ tumor cell ปลั่งยโมเลกุลบางอย่าง เข้าไปส่งสัญญาณให้แก่เนื้อเยื่อปกติที่อยู่โดยรอบ ซึ่งการส่งสัญญาณนี้จะไปกระตุ้นยีน



ที่จำเพาะใน host ก่อให้เกิดโปรตีนไปส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตของเส้นเลือดใหม่ จากที่กล่าวมาข้างต้น ถือเป็นตัวอย่างที่ดีที่ใช้อธิบายว่า tumor สามารถควบคุมกระบวนการต่างๆเหล่านี้เพื่อผลประโยชน์ของตัวเองได้อย่างไร มีโปรตีนหลายชนิด (เช่น FGF, EGF, GC-SF, IL-8, PDEGF, TGF $\alpha$ , TNF และ VEGF) เช่นเดียวกับ หลายๆโมเลกุลที่เล็กกว่า (เช่น adenosine และ PGE) ที่จัดว่าเป็น angiogenic factors ที่ถูกหลั่งออกมาโดย tumor ในฐานะที่เป็น signal ของการเกิด angiogenesis ซึ่งในบรรดาโมเลกุลเหล่านั้น พบว่า VEGF และ bFGF เป็นตัวที่สำคัญที่สุดในเรื่องของความเป็นตัวสนับสนุนการเจริญเติบโตของ tumor โดยมีการพบว่า VEGF และ bFGF นั้นจะสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด และยังสามารถพบได้ในเซลล์ที่ปกติบางชนิดอีกด้วย (Aggarwal and Shishodia, 2006)