



ผลของโมนโอเลอินต่อการแสดงออกของโปรตีน Ki67 และการแสดงออก
ของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับการตายของเซลล์ในหนู nude
ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก

Effects of Monoolein on Ki67 Protein and Apoptosis-Related Biomarkers
Expression in Cervical Cancer Implanted Nude Mice

สุดารัตน์ รongpan¹, เทิดเกียรติ ตรงวงศา², เบญจมาส วงศ์สัตยมนนท์²
อัมพร จาริยะพงศ์สกุล^{2*}

Sudarat Rongpan¹, Therdkiat Trongwongsa², Benjamas Wongsatayanon²
Amporn Jariyapongsukul^{2*}

(Received: August 9, 2021; Revised: November 23, 2021; Accepted: December 13, 2021)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารโมนโอเลอิน (MO) สารลดแรงตึงผิวชนิดไกลโคลิพิดที่สกัดได้จากเชื้อ *Exophiala dermatitidis* ต่อการแสดงออกของโปรตีน Ki67 และการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับการตายของเซลล์มะเร็งด้วย TUNEL และ Caspase-3 ในหนู nude ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก นำเซลล์ HeLa มาฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังทางด้านขวาของหนู nude เพื่อสร้างก้อนเนื้ออกมะเร็ง หนูจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มหนูมะเร็งที่ไม่ได้รับการรักษา (HeLa group) และได้รับการรักษาด้วยสาร MO (HeLa-MO) ขนาดความเข้มข้น 200 มก./กก./น้ำหนักตัวหนู ทำการฉีดสาร MO เข้ารอบ ๆ ก้อนเนื้ออกมะเร็งทุกวัน เป็นเวลา 28 วัน เมื่อสิ้นสุดการรักษาก้อนเนื้ออกของหนูมะเร็งจะถูกเก็บรวบรวมสำหรับการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Ki67 และการตายแบบ apoptosis ด้วย TUNEL และ Caspase-3 ผลการศึกษาพบว่าหนูมะเร็งกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสาร MO (HeLa-MO) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Ki67 คิดเป็น 57.53% เมื่อเปรียบเทียบกับหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa

¹คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

¹Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

*Corresponding Author: ampornswu@gmail.com



(66.67 ± 6.78 และ 157 ± 10.54 cell/field) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นจากการย้อมขึ้นเนื้อมะเร็งด้วยโปรตีน TUNEL และ Caspase-3 อย่างชัดเจนในหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-MO (118.5 ± 6.53 และ 32.76 ± 4.51 cell/field) และ (130.7 ± 11.42 และ 34.2 ± 2.49 cell/field) เมื่อเทียบกับหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa ($p < 0.001$) ตามลำดับ

การศึกษานี้ผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่าการรักษาด้วยสารโมโนโอเลอินในหนูชนิดไม่ซีที่ได้รับ การปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูกสามารถลดการเจริญเติบโตของก้อนเนื้อองมะเร็งผ่านการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งและชักนำการตายแบบ apoptosis

คำสำคัญ : Monoolein, HeLa cell, Ki67, TUNEL, Caspase-3

Abstract

This study aimed to investigate the effect of monoolein (MO), a glycolipid surfactant purified from *Exophiala dermatitidis* on expression of cell proliferation; Ki67 and apoptosis biomarkers; TUNEL and Caspase-3 in cervical cancer xenograft in nude mouse model. HeLa cells were subcutaneously injected on the right dorsal of BALB/C nude mice to establish xenografted tumors. Mice were randomly divided into 2 groups, HeLa implanted mice (HeLa group) and HeLa implanted mice treated with MO (HeLa-MO group). Monoolein 200 mg/Kg/BW was injected subcutaneously around the tumor mass for 28 days. Tumor tissue mass of each mouse was collected for immunohistochemical examination of Ki67 and for examination of apoptosis by using TUNEL and Caspase-3 assays. The result showed that MO treatment in HeLa-MO group significantly reduced the Ki67 expression by 57.53% as compared to HeLa group (66.67 ± 6.78 and 157 ± 10.54 , cell/field, respectively). Furthermore, TUNEL and Caspase-3 staining were remarkably increased in HeLa-MO group (118.5 ± 6.53 and 32.76 ± 4.51 cell/field) and (130.7 ± 11.42 and 34.2 ± 2.49 cell/field) as compared to HeLa group, respectively ($p < 0.001$).

In conclusion, our finding demonstrated that treatment with monoolein in cervical cancer mouse model can reduced tumor growth via inhibition of tumor cell proliferation and apoptosis pathway.

Keywords: Monoolein, HeLa cell, Ki67, TUNEL, Caspase-3



บทนำ

จากการศึกษาและประมาณการ Incidence & Mortality ของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลกโดยใช้ฐานข้อมูลจาก International Agency for Research on Cancer (IARC) ของ WHO รายงานสถิติผู้ป่วยมะเร็งต่าง ๆ ทั่วโลกในปี พ.ศ. 2020 พบว่ามะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้หญิงทั่วโลก (Sung et al., 2021) ทั้งนี้มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 4 ของมะเร็งทั่วโลกและได้รับการยืนยันว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตของผู้หญิงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา (Bray et al., 2018)

จากรายงานของ Sung et al. (2021) คาดการณ์ว่าน่าจะพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ทั่วโลกเกิดขึ้นประมาณ 604,127 คน และประมาณ 341,831 คน อาจเสียชีวิตจากโรคมะเร็งนี้ สำหรับระบบวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในไทยพบมากเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านม และเมื่อพิจารณาถึงอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกพบว่าการมีพฤติกรรมทางเพศตั้งแต่อายุน้อย สีส่อนทางเพศ การคลอดบุตรหลายครั้ง การสูบบุหรี่และการใช้ยาคุมกำเนิดเป็นระยะเวลานานล้วนเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดโรค (Nakrukamphonphatn, Suwannakoo, & Natason, 2021) และจากการศึกษาจำนวนมากเป็นที่ยอมรับกันทั่วโลกว่าการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูง (High-risk HPV-16 and 18) จากการมีเพศสัมพันธ์แม้เพียงครั้งเดียวสามารถชักนำการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ (Shrestha, Neupane, Vedsted, & Kallestrup, 2018; Nakrukamphonphatn et al., 2021)

อนุพันธ์ของสารกลุ่มโมโนกลีเซอไรด์สายยาว (Long-chain monoglycerides, MGs) เป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีแบบ amphipathic molecules จัดเป็นสาร surfactant ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และการสังเคราะห์ขึ้นทางห้องปฏิบัติการ สารกลุ่มนี้พบว่ามีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมการเกษตร ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง และสิ่งที่น่าสนใจคือการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาโรค และเทคโนโลยีสมัยใหม่ อย่างเช่น นาโนเทคโนโลยี เทคโนโลยีชีวภาพ และงานพิมพ์อิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น (Wu et al., 2017; ElMasry & Hathout, 2018) สาร surfactant มีความเป็นพิษน้อย ย่อยสลายได้ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง และสามารถแทรกซึมผ่านทางผิวหนังได้ดี ด้วยเหตุนี้ MGs จึงได้รับการรับรองว่าเป็น Generally Recognized as Safe (GRAS) สามารถใช้เติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัยโดยที่ไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อจึงผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยา (United States Food and Drug Administration) (Rongpan, Phonnok, Boondireke, Tripinyopap, & Wongsatayanon, 2017; Kitaoka, Oka, & Goto, 2020)



Monoolein หรือ 1-monooleoyl-rac-glycerol (MO, C18:1) เป็นสารในกลุ่ม MGs จัดอยู่ในประเภท glycolipid surfactant มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต/น้ำตาลโดยเชื่อมต่อกับ long chain unsaturated fatty acid พบว่ามีคุณสมบัติทาง biological activities ที่หลากหลายจึงถูกนำมาใช้ผลิตเป็นยาต้านจุลชีพ (antibiotic, antiviral antifungal) และ นาโนเทคโนโลยี (Yoon, Jackman, Elba Valle-Gonzalez, & Cho, 2018; Kitaoka et al., 2020)

จากการศึกษาของ Yoon et al. (2018) พบว่าสารในกลุ่ม MGs (esterified adducts of a fatty acid and glycerol molecule, C18: 1) มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial lipid มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมลบและบวก (Gram-negative and Gram-positive bacteria) เช่น *Campylobacter jejuni* ที่มักเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนในอาหาร (foodborne) และมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* เชื้อก่อโรคซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ผิวหนัง กลไกสำคัญประการหนึ่งที่สาร MO มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น ยับยั้งการสร้าง glucosyltransferase (GTase) ซึ่งเป็น enzyme สำคัญในการเร่งการผลิต glucan ในเซลล์แบคทีเรีย ในขณะที่สารกลุ่ม saturated fatty acid มีผลเพียงเล็กน้อย และจากการศึกษาของ Rongpan, Trongwongsa, Wongsatayanon, & Jariyapongskul (2015) พบว่าสาร MO มีฤทธิ์กดการเจริญของก้อนเนื้องอกมะเร็งในหนูหนูชนิดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยลดการแสดงออกของจำนวน mitotic figure ในก้อนเนื้องอกมะเร็งจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา การศึกษาทางห้องปฏิบัติการพบมีฤทธิ์เป็น anticancer ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) แต่ไม่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ปกติ (Vero cells) โดยชักนำให้เกิด DNA fragmentation กลไกสำคัญในการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ในขณะที่การศึกษาของ Nawale, Dubey, Chaudhari, Sarkar, & Prabhune (2018) พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT 116) แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (HUVEC) สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ชักนำกระบวนการ depolarization บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรีย จึงมีผลกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง

อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่ามะเร็งปากมดลูกยังคงมีแนวโน้มของอัตราการเสียชีวิตและมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วยที่อายุน้อยเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จากการศึกษาที่ผ่านมาของข้าพเจ้าและคณะพบว่าสาร MO สามารถลดขนาดของก้อนเนื้องอกที่เกิดจากการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหนูหนูชนิดไมซ์ (Rongpan et al., 2015) ดังนั้นการศึกษารั้งนี้เป็นการศึกษาต่อยอกลไกการออกฤทธิ์ของสาร MO ในการยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็ง โดยผ่านการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งและการชักนำให้เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis



วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ monoolein ต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ประกอบด้วยโปรตีน Ki67, TUNEL และ Caspase-3 ในเนื้อเยื่อมะเร็งของหนูชนิดไม่ซ้ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้

Monoolein หรือ 1-monooleoyl-rac-glycerol (MO, C18:1, >99% purity), formalin, absolute ethanol, xylene, hydrogen peroxide, Tris-HCl, saline-sodium citrate (SSC) และ proteinase-K solution; บริษัท Sigma-Aldrich, USA. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum และ Penicillin-streptomycin; บริษัท GIBCO, USA. เซลล์มะเร็ง Human cervical carcinoma cell lines (HeLa, HPV-18 positive) จาก The American Type Culture Collection (ATCC). Specific monoclonal mouse antibody Ki-67, Specific monoclonal mouse anti-cleaved caspase 3, The terminal deoxynucleo-tidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) และ EnVision detection system/HRP; บริษัท Dako Cytomation, USA, Mayer's hematoxylin; บริษัท Merck Millipore, Burlington, MA, US.

2. การเพาะเลี้ยง Human cervical carcinoma cell lines (HeLa, HPV-18 positive)

เซลล์ HeLa จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% ของยาปฏิชีวนะ (penicillin G) 100 ยูนิต/มล. ผสมกับ สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 100 มก./มล. ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เซลล์ HeLa จะถูกทำการ subculture 2 ถึง 3 ครั้งก่อนการทดสอบ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และเพื่อให้เซลล์อยู่ในระยะ logarithmic growth phase

3. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Cells Implantation)

เซลล์มะเร็งจำนวน 2×10^7 cells ในปริมาตร 0.5 ml นำมาฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณหลังของหนูชนิดไม่ซ้ (nude mice) เพศผู้ น้ำหนัก 20-22 กรัม อายุ 6-7 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล โดยการทดลองนี้จะแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 กลุ่มหนูมะเร็งที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa-Gr) ที่ฉีดด้วย 0.05% ethanol และกลุ่มที่ 2 กลุ่มหนูมะเร็งที่ได้รับการฉีดด้วยสาร 1-monooleoyl-rac-glycerol (HeLa-MO) ที่ความเข้มข้น 200 มก./กก. ต่อน้ำหนักตัวหนู ทั้งนี้ MO จะถูกละลายใน



absolute ethanol เก็บไว้เป็น stock และก่อนการทดสอบจะถูกนำมาเจือจางด้วย normal saline (NSS) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MO 200 มก./กก. ใน 0.05% ethanol และจะถูก sonicated ก่อนการใช้จริงทุกครั้ง นำมาฉีดเข้าทางผิวหนังบริเวณก่อนเนื้องอกทุกวันเป็นระยะเวลา 28 วัน (Rongpan et al., 2015) (งานวิจัยนี้ได้รับการตรวจสอบและได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการควบคุมจริยธรรมในสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; EC 8/2556 SWU-MED)

4. การศึกษาผลด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry study: IHC)

เมื่อสิ้นสุดการศึกษาทำการตัดแยกก้อนเนื้องอกมะเร็ง และนำก้อนเนื้องอกมะเร็งมาผ่านกระบวนการตรึง (Fixation) โดยนำมาแช่ใน buffered neutral formalin ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเน่าเปื่อย จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงมาผ่านขั้นตอน dehydration และ embedding โดยนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงสภาพแล้วมาแช่ใน ethyl alcohol ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากนั้นทำการ dehydration และ แช่ชิ้นเนื้อใน xylene ได้ paraffin block นำ block ตัดด้วยเครื่อง microtome ความหนา 5 ไมครอน

ก่อนการย้อม antibody ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี อบสไลด์ให้แห้งและละลาย paraffin ด้วย xylene จากนั้นนำผ่าน alcohol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสูงไปต่ำ (100%, 95%, 90%, 80% และ 70%) ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2±7.4) จากนั้นทำการ block ปฏิกริยา endogenous peroxidase โดยใช้ 3% ของ hydrogen peroxide ที่ละลายใน absolute methanol และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

เพื่อประเมินสถานะการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Cell proliferation) นำ tissue sections มาบ่มด้วย specific monoclonal mouse antibody Ki-67 โปรตีน (Dako Cytomation, USA) ที่เจือจาง 1:500 ใน 0.05 M Tris-HCl เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ 4 °C (Thammasiri, Navanukraw, Nutthakornkul, Guntaprom & Khanthusaeng, 2017)

สำหรับการประเมินการเหนี่ยวนำกระบวนการตายแบบ apoptosis นำ tissue sections มาบ่มด้วย specific monoclonal mouse anti-cleaved caspase 3 (Dako Cytomation, USA) ที่เจือจาง 1:500 ใน 0.05 M Tris-HCl บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 °C หลังจากนั้นนำ tissue sections แต่ละสไลด์ที่ผ่านการบ่มด้วย primary monoclonal antibody มาล้างด้วย Wash Buffer นาน 5 นาที การแปลผลใช้ EnVision detection system/HRP (Dako Cytomation, USA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย Wash Buffer และเติม Substrate – Chromogen Detection (DAB) บ่มที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที (เพื่อหยุดปฏิกิริยา DAB) จากนั้น counterstains ด้วย Mayer's hematoxylin



(Merck) เพื่อให้ให้เห็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อได้ชัดเจนและเปรียบเทียบกับส่วนที่ติดสีข้ามจากปฏิกิริยา IHC (Tang et al., 2020)

การประเมินสภาวะการแตกหักของ DNA ใน tissue sections จะใช้วิธี The terminal deoxynucleo-tidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay (Amersham, Dako, Roche) โดยนำ tissues sections ที่ผ่านขั้นตอน embedding process มาละลาย paraffin ด้วย xylene จากนั้นนำผ่าน alcohol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสูงไปต่ำ (100%, 95%, 90%, 80% และ 70%) และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการบ่ม tissues slides ด้วย 200 μ L ของ proteinase-K solution (20 μ g/ml) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย PBS จากนั้นนำ tissues slides บ่มใน 2% ของ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการ block ปฏิกิริยา endogenous peroxidase และ tissues slides จะถูกล้างด้วย PBS อีกครั้งนาน 4 นาที แล้วเติม Permeabilization solution ที่ประกอบด้วย 0.1% ของ Triton X-100 และ 0.1% ของ sodium citrate และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที ล้างด้วย PBS นาน 3 นาที จากนั้นเติม Terminal deoxynucleotidyl transferase catalyzes (TUNEL Label and TdT reaction enzyme) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที และเติม saline-sodium citrate (SSC) buffer (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate) เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นล้างด้วย PBS นาน 3 นาที การแปลผลใช้ Substrate – Chromogen Detection (DAB) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที จากนั้น counterstains ด้วย Mayer's hematoxylin (Merck) (Tang et al., 2020)

5. การประเมินทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Positive cells evaluation)

ทำการนับเซลล์ในสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus DP12 microscope digital camera system, Japan) ที่กำลังขยาย 40 เท่า (40x) การเลือกพื้นที่ของการนับ positive nuclei ประกอบด้วยพื้นที่ 3 ตำแหน่ง; (1) ตรงกลางของก้อนเนื้อออก; (2) ขอบด้านบนของก้อนเนื้อออก และ (3) ขอบล่างของก้อนเนื้อออก ซึ่งลักษณะของ positive nuclei ที่ถูกนับจะมองเห็นได้ชัดเจนด้วยการย้อมติดสีน้ำตาลเข้มของนิวเคลียส โดยแสดงให้เห็นถึงภาวะการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและแสดงความเสียหายของ DNA (DNA Fragmentation) การรายงานผลอยู่ในรูปของ positive nuclei staining (cell/field) (Thammasiri et al., 2017; Tang et al., 2020)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำเสนอเป็นค่า mean $\pm$ standard error of mean (Mean $\pm$ SEM) วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองโดยใช้ Mann-Whitney U-test กำหนดค่าความน่าจะเป็นที่ $p < 0.05$ หาค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) และการวิเคราะห์ผลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS IBM Singapore Pte Ltd.



ผลการวิจัย

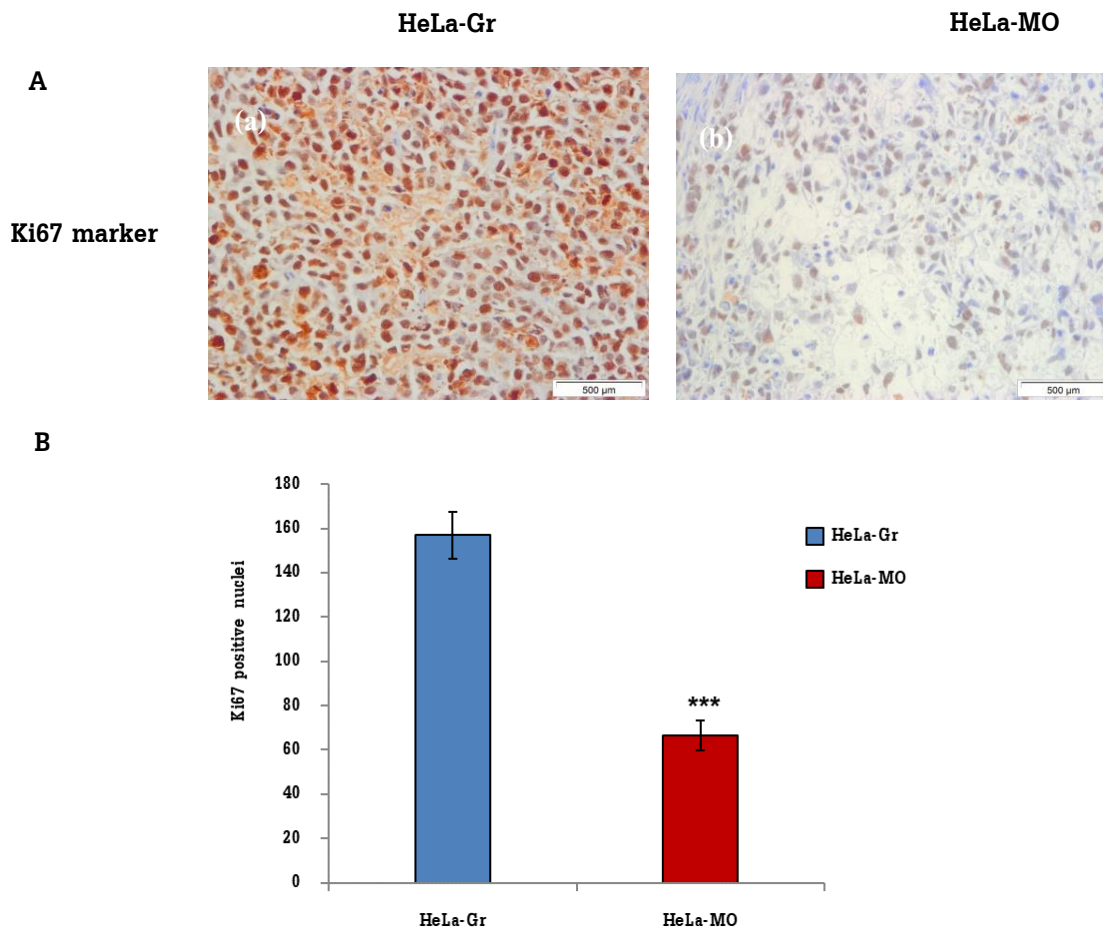
ผลของสาร 1-monooleoyl-rac-glycerol (MO) ต่อการยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกมะเร็ง

การศึกษาก่อนนี้พบว่าสาร monoolein หรือ 1-monooleoyl-rac-glycerol (MO, C18:1) ขนาดความเข้มข้น 200 มก./กก. ต่อน้ำหนักตัวหนู มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกมะเร็งในหนูชนิดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ส่งผลให้ก้อนเนื้องอกมะเร็งมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ (delay growth) โดยพบอัตราการยับยั้งการเจริญคิดเป็นร้อยละ 59.20 ± 0.05 และการศึกษาทางพยาธิวิทยาเบื้องต้นพบจำนวนเซลล์ mitotic figure ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มมะเร็งที่ไม่ได้รับการรักษา (Rongpan et al., 2015)

อย่างไรก็ตามการศึกษากลับนี้เป็นการศึกษาต่อยอดเพื่อประเมินฤทธิ์ของสารดังกล่าวต่อการยับยั้งการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในก้อนเนื้องอกมะเร็งกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย MO (HeLa-MO) เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มมะเร็งที่ไม่ได้รับการรักษา (HeLa-Gr) โดยก้อนเนื้องอกมะเร็งของหนูทั้ง 2 กลุ่ม จะถูกนำมาประเมินการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาด้วยวิธี immunohistochemistry โดยการตรวจนับเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีน Ki-67 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ตรวจวัดดัชนีการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (proliferation index, PI)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างที่เกิดขึ้นภายใน tissues section ระหว่างหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-Gr ที่มีการเจริญอัดตัวกันอย่างหนาแน่นของเซลล์มะเร็ง บ่งบอกว่าการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นผิดปกติ (atypical mitosis) เมื่อพิจารณาคุณลักษณะของเซลล์พบว่านิวเคลียสมีขนาดใหญ่ โครมาตินติดสีเข้มและไม่สม่ำเสมอแตกต่างจากกลุ่ม HeLa-MO ภายในเนื้อเยื่อมีการจัดเรียงตัวของเซลล์มะเร็งแบบไม่แน่นอนหนา ช่องว่างระหว่างเซลล์มีมากกว่า ทั้งนี้พบว่าหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-Gr มีค่าเฉลี่ยเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีน Ki-67 คิดเป็น 157 ± 10.54 cell/field ขณะที่หนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-MO พบค่าเฉลี่ยเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีน Ki-67 คิดเป็น 66.67 ± 6.78 cell/field (ภาพที่ 1B) และการแสดงออกของเซลล์ที่ย้อมติด Ki67 ในกลุ่ม HeLa-MO ลดลงมากกว่า 57% เมื่อเทียบกับกลุ่ม HeLa-Gr

ดังนั้นจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสาร MO มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในเนื้อเยื่อมะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, ภาพที่ 1B) โดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Ki-67 จึงมีผลทำให้ก้อนเนื้องอกมะเร็งในหนูชนิดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกถูกยับยั้งการเจริญ



ภาพที่ 1 A) Immunohistochemistry ของ Ki67 staining ใน tissue sections ที่กำลังขยาย 400 เท่า; (a) กลุ่ม HeLa-Gr และ (b) กลุ่ม HeLa-MO

B) แสดงจำนวน Ki67 positive cells ใน tissue sections ของหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-Gr (■) และ กลุ่ม HeLa-MO (■)

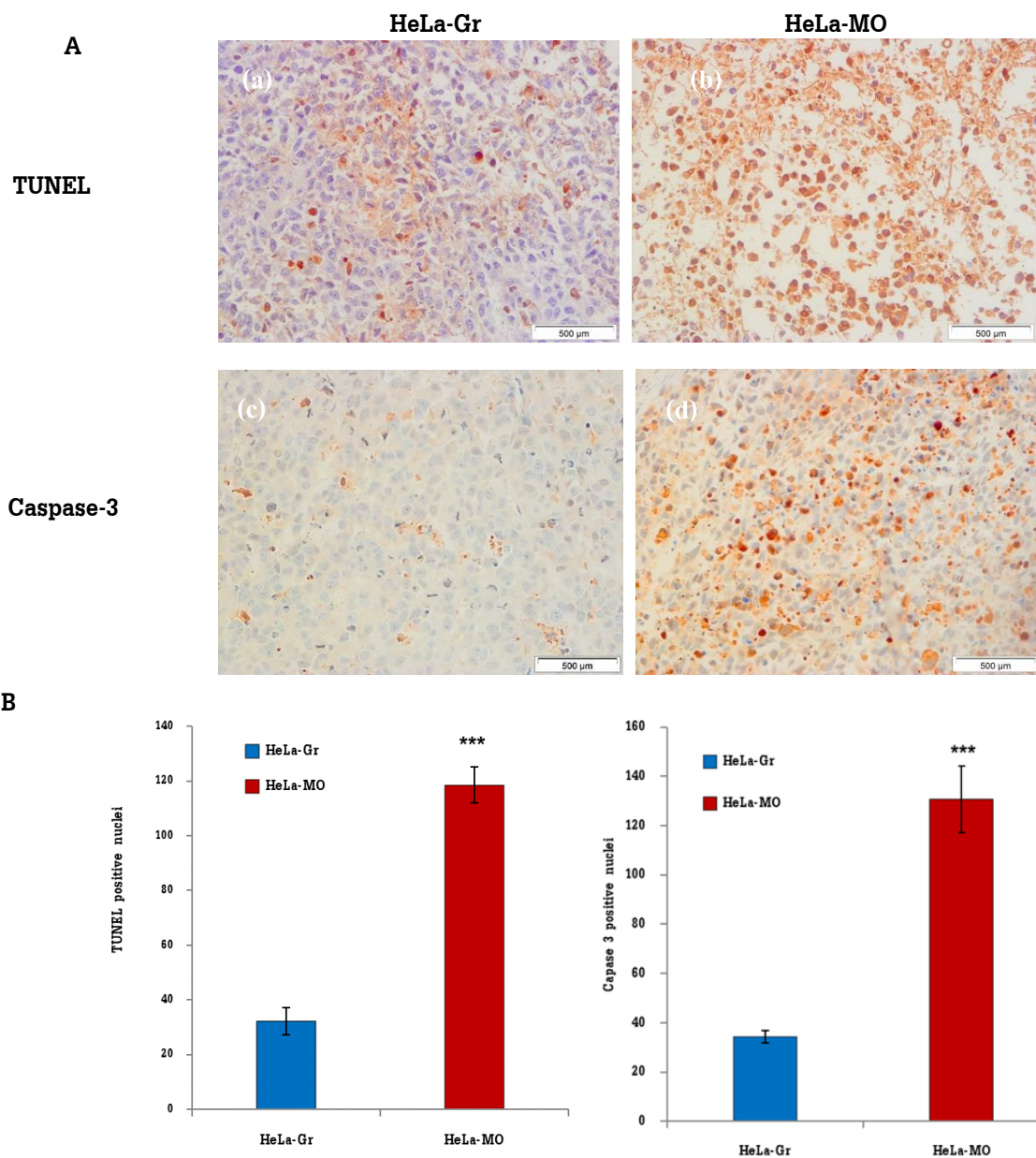
ข้อมูลในกราฟแสดงค่า Mean ± SEM *** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HeLa-Gr ที่ $p < 0.001$



ผลของสาร Monoolein (MO) ต่อการชักนำกระบวนการ apoptosis ในเนื้อเยื่อมะเร็ง

เพื่อยืนยันผลของสาร MO ต่อการยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในก้อนเนื้อของมะเร็งจะประเมินด้วยวิธีตรวจหา DNA fragmentation ใน ชิ้นเนื้อจากก้อนมะเร็ง โดยใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ DNA fragmentation ได้แก่การตรวจที่เรียกว่า Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) Assay โดยการใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) คู่กับ X-dUTP (X-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate) เข้าไปเป็น X-dU ที่ terminal end ของสาย DNA จากนั้นก็ย้อมสีเซลล์เพื่อตรวจหาร่องรอยของการเกิด single strand breaks ที่ terminal end (Tang et al., 2020)

จากผลการศึกษาพบว่าหนูมะเร็งกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย MO (HeLa-MO) มีค่าเฉลี่ยเซลล์ที่ย้อมติด TUNEL (TUNEL-positive nuclei) มากกว่าหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa คิดเป็น 118.5 ± 6.53 และ 32.76 ± 4.51 cell/Field) ตามลำดับ (ภาพที่ 2B) นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสาร MO ต่อการชักนำกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งด้วย Caspase-3 antibodies โดย Caspase-3 หรือ cysteine-dependent aspartate specific proteases เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน cysteine residue ตรงตำแหน่ง active site ที่จะตัดพันธะเปปไทด์ของ aspartic acid ในกระบวนการ apoptotic cascade ทั้งนี้ caspase-3 จัดเป็น marker สำหรับประเมินการตายแบบ apoptosis pathway และจากการศึกษาพบการแสดงออกของ Caspase-3 positive nuclei ในหนูมะเร็งกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสาร MO คิดเป็น 130.7 ± 11.42 cell/Field มากกว่าหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa โดยพบการย้อมติด Caspase-3 positive nuclei คิดเป็น 34.2 ± 2.49 cell/Field จากการศึกษาพบว่าสัดส่วนของ apoptotic-positive nuclei ระหว่างหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-MO และหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-Gr การแสดงออกของทั้ง TUNEL (118.5 ± 6.53 และ 32.76 ± 4.51 cell/Field) และการแสดงออกของ caspase-3 antibodies (130.7 ± 11.42 และ 34.2 ± 2.49 cell/Field) มีความสัมพันธ์กันและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (ภาพที่ 2A และ 2B) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-Gr



ภาพที่ 2 A) Immunohistochemistry ของ TUNEL และ Caspase-3 staining ใน tissue sections ที่กำลังขยาย 40x; (a) กลุ่ม HeLa-Gr และ (b) กลุ่ม HeLa-MO จาก TUNEL-positive nuclei staining. (c) กลุ่ม HeLa-Gr และ (d) กลุ่ม HeLa-MO จาก Caspase-3 positive nuclei staining, ตามลำดับ

B) แสดงจำนวน TUNEL-positive nuclei และ Caspase-3 positive nuclei ใน tissue sections ของหนูเมะเร็ง กลุ่ม HeLa-Gr (■) และกลุ่ม HeLa-MO (■) ข้อมูลในกราฟแสดงค่า Mean±SEM

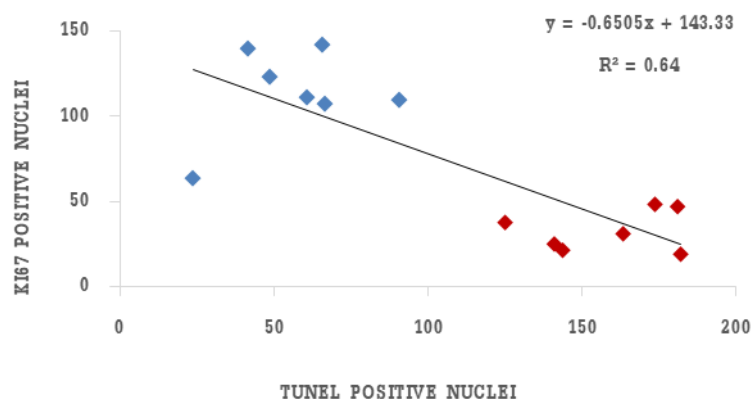
*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HeLa-Gr ที่ $p < 0.001$



ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างโปรตีน Ki67 และ TUNEL

จากผลการศึกษาข้างต้นทางผู้วิจัยได้ทำการประเมินเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Ki67 และ TUNEL -positive nuclei พบว่ากราฟแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร บ่งชี้ให้เห็นว่าเนื้อเยื่อมะเร็งในหนูกลุ่ม HeLa-MO นั้นมีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ที่ลดลง โดยมีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis ที่เพิ่มขึ้นจากการแสดงออกของโปรตีน TUNEL-positive nuclei ($R^2 = 0.64$) (ภาพที่ 3A) ซึ่งการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีน Ki67 และการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ apoptosis marker น่าจะมีผลทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งถูกยับยั้งการเจริญ

A



ภาพที่ 3 A) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Ki67 กับ TUNEL-positive nuclei กลุ่ม HeLa-Gr (◆) และกลุ่ม HeLa-MO (◆), ค่า R หมายถึง correlation coefficient ระหว่างแกน X และ Y

อภิปรายผล

การศึกษานี้ทำการศึกษาเพื่อประเมินฤทธิ์ของสาร monoolein หรือ 1-monooleoyl-rac-glycerol (MO, C18:1) ต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในหนูชนิดไม่ชี้ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HPV-18 positive, HeLa cell) ด้วยวิธีทางอิมมูโนโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry, IHC) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากอาศัยหลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจึงสามารถตรวจลักษณะการแสดงออกของอินหรือโปรตีนในเนื้อเยื่อได้โดยตรง (Sukpanichnant, 2018)

จากผลการศึกษาพบว่าสาร MO มีฤทธิ์ต้านกลไกการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Ki67 หรือที่เรียกว่า MKI67 gene จัดเป็นดัชนีวัดการเพิ่มจำนวนหรือการแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation index, PI) ใช้หลักการตรวจหาแอนติเจน



ของนิวเคลียสที่อยู่ในระยะ G, S, G, และ M ของ cell cycle ซึ่งโปรตีน Ki67 จะตรวจพบในทุกๆ ระยะของ cell cycle ยกเว้นระยะพัก (G0) จากการศึกษาพบว่าปริมาณของโปรตีน Ki67 จะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะ S phase ดังนั้นเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 สูงจะพบว่าเซลล์มะเร็งอยู่ในระยะของการแบ่งตัว ตรงข้ามกับเซลล์ที่มีค่าโปรตีน Ki67 ต่ำกว่าแสดงว่าเซลล์อยู่ในระยะพักมากกว่า (Thammasiri et al., 2017; Sukpanichnant, 2018) จากผลการศึกษาทาง IHC ของงานวิจัยนี้พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งของหนูชนิดที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย MO มีการแสดงออกของเซลล์ที่ข้อมติโปรตีน Ki67 ในนิวเคลียสลดลงมากกว่า 57% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (HeLa) และจากการศึกษาชิ้นเนื้อความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ที่เพิ่มขึ้นกับอัตราการเจริญแบ่งตัวกันอย่างหนาแน่นของเซลล์มะเร็ง (ภาพที่ 1A) สัมพันธ์กับการศึกษาของ Rongpan et al. (2015) พบว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้อของมะเร็งชนิดเป็นรื้อยละ 59.20 ± 0.05 และการศึกษาทางพยาธิวิทยาเบื้องต้นโดยการย้อมชิ้นเนื้อด้วย Hematoxylin and Eosin (H&E) พบจำนวนเซลล์ในระยะ mitosis (mitotic figure) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มมะเร็งที่ไม่ได้รับการรักษา

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการวิเคราะห์และประเมินตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอื่นรวมด้วย เพื่อยืนยันฤทธิ์ของสารดังกล่าวต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีการตรวจหา DNA fragmentation ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ผ่านกระบวนการชักนำให้เกิดตายแบบ apoptosis หรือ programmed cell death ซึ่งเป็นแบบแผนการตายของเซลล์ที่ถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะสมดุลของเซลล์ปกติในร่างกายมนุษย์ (Punjaruk, 2015) จากการศึกษาจำนวนมากพบว่าเมื่อไรก็ตามที่กลไกในการควบคุมการตายแบบ apoptosis ผิดปกติจะมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ ซึ่งจัดเป็นคุณลักษณะเด่นของเซลล์มะเร็งเนื่องจากสามารถหลบหลีกจากกระบวนการ apoptosis ได้ (Evading apoptosis) การตายของเซลล์แบบ apoptosis สามารถแบ่งแยกรูปแบบการตายโดยดูจากสัญญาณวิทยาที่ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ จึงทำให้เซลล์ค่อย ๆ มีขนาดเล็กลง นิวเคลียสรวมตัวกันแน่นและนำไปสู่การเกาะกลุ่มกันของโครมาติน จากนั้น DNA จะถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยอาศัยเอนไซม์ caspase หรือ cysteine-dependent aspartate specific proteases ต่อการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis การทำงานของเอนไซม์ caspase จะทำให้เซลล์เกิดการสลายของ cytoskeleton protein เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส และพบ DNA ภายใน nucleus ถูกย่อยกลายเป็น apoptotic bodies (Chung, 2018; Ruangpratheep, 2019) ทั้งนี้แนวคิดในการรักษามะเร็งทางคลินิกตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันยอมรับกันอย่างกว้างขวางหากชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของก้อนเนื้อของมะเร็งฝ่อเล็กลง ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงนำไปสู่การ



พัฒนาการรักษามะเร็งเป็นจำนวนมากเพื่อกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis (Punjaruk, 2015; Ruangpratheep, 2019) ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งและลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดจากกระบวนการอักเสบได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการประเมินและวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Caspase-3 ต่อความสามารถในการชักนำกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยย้อมขึ้นเนื้อมะเร็งด้วย Caspase-3 antibodies ซึ่งทำหน้าที่เป็น biomarker ในการตรวจสอบการเหนี่ยวนำกระบวนการ apoptosis การแสดงออกของโปรตีน Caspase-3 ที่เพิ่มขึ้นจะเป็นตัวบ่งบอกความสามารถของสารที่ทดสอบในการย่อยสลาย DNA ทำให้ nucleus แตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เชื่อมโยงกับการทำลายโครงสร้างของเซลล์จนเกิดความเสียหายซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด และผลการศึกษาที่พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งกลุ่ม HeLa-MO มีค่าเฉลี่ยเซลล์ที่ย้อมติด Caspase-3 positive nuclei คิดเป็น 130.7 ± 11.42 cell/Field มากกว่าหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa สำหรับการแตกหักของ DNA ใน apoptosis cell ซึ่งเกิดในช่วงท้ายของกระบวนการดังกล่าวผู้วิจัยได้ทำการยืนยันผลโดยการวิเคราะห์การเกิด DNA fragmentation แบบ in situ ด้วยวิธี TUNEL assay จากผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งกลุ่ม HeLa-MO มีค่าเฉลี่ยเซลล์ที่ย้อมติด TUNEL-positive nuclei มากกว่าหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa คิดเป็น 118.5 ± 6.53 และ 32.76 ± 4.51 cell/Field ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสาร MO สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยชักนำการเกิด DNA fragmentation นำไปสู่การตายแบบ apoptosis (ภาพที่ 2B) และจากการศึกษาพบว่าสัดส่วนของ apoptotic-positive nuclei ระหว่างหนูมะเร็งทั้ง 2 กลุ่ม มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Rongpan et al. (2017) ทำการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro study) พบว่าสารดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติผ่านกระบวนการตายแบบ apoptosis ซึ่งวิเคราะห์จากการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยวิธี ELISA และยืนยันผลการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี DNA ladder assay แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ก็กลับพบข้อมูลเพิ่มขึ้นที่แสดงให้เห็นว่า MO นอกจากมีฤทธิ์ชักนำกระบวนการ apoptosis แล้วนั้นยังมีความสัมพันธ์กับ cell cycle arrest โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Ki67 นอกจากนี้การศึกษายังค้นพบยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Nawale et al. (2018) พบว่าสารกลุ่ม glycolipid มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT 116) แต่ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติ (HUVEC) มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ชักนำกระบวนการ depolarization บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรีย และเพิ่มการแสดงออกของ Caspase-3, -8 และ -9 activity จึงมีผลกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง



Monoolein หรือ 1-Monooleoyl-rac-glycerol (MO, C18:1) จัดเป็น glycolipid surfactants ที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีแบบ amphipathic molecules จึงมีบทบาทสำคัญต่อการทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาฤทธิ์ของ MO ต่อการต้านการเจริญของ *S. aureus* ด้วยวิธี polarized fluorimetry สามารถรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ไม่เสถียร เกิดรูพรุน เพิ่มการซึมผ่านของสารนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์ (Rongpan et al., 2017; Yoon et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีผลว่าสารกลุ่มนี้มีศักยภาพในการขัดขวางกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนโดยจับกับ electron carriers ลดความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ พร้อมทั้งรบกวนการเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation กระตุ้นการหลั่งของ Ca^{2+} และสามารถยับยั้งเอนไซม์ glucosyltransferase ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง (Yoon et al., 2018) สาร MO เป็นสารประกอบที่ไม่เป็นพิษและย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้อุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง นาโนเทคโนโลยีและใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น จากรายงานของ ElMasry & Hathout (2018) พบว่าการนำสารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอนุภาคนาโน (nanoparticles) สำหรับขนส่งและปลดปล่อยสาร Sesamol ที่มีฤทธิ์เป็น anticancer drug สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการเจริญของมะเร็งเต้านม (MCF-7) ใน *in vitro* study และจากการศึกษาของ Kitaoka et al. (2020) พบว่า MO มีคุณสมบัติเป็น skin penetration enhancer สามารถทำปฏิกิริยากับ lipid bilayer ช่วยกำจัด skin ceramides และเพิ่มการสลายของไขมันในชั้นผิว stratum corneum จึงช่วยนำพายาโดยเฉพาะ peptides หรือ protein vaccine เข้าไปออกฤทธิ์ภายในชั้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาร MO นอกจากมีคุณสมบัติเป็น detergent effect, antimicrobial, nanotechnology และ penetration enhancer ยังพบคุณสมบัติเป็น anticancer activity ด้านกลไกการรอดชีวิตใน *in vivo* study จากการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis ผ่านการแสดงออกของโปรตีน TUNEL และ Caspase-3 จึงชักนำ DNA fragmentation และมีความสัมพันธ์กับ cell cycle arrest โดยลดการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ฤทธิ์ดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้ออกมะเร็ง



ข้อเสนอแนะ

ทางกระทรวงสาธารณสุขมีการณรงค์และให้ความรู้ด้านสุขภาพเพื่อป้องกันการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากพบว่าผู้ป่วยอายุน้อยเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยมีการแนะนำให้ผู้หญิงที่มีเพศสัมพันธ์แล้วเข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก และผู้หญิงที่ยังไม่มีเพศสัมพันธ์ควรฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันก่อนมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าผู้หญิงส่วนใหญ่ไม่ได้ให้ความสำคัญกับโรคดังกล่าวมากนักจึงยังคงพบอุบัติการณ์ของการเสียชีวิตเฉลี่ยสูงขึ้น จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า MO มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสาร MO และน่าจะมียุทธศาสตร์ทางคลินิกในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกต่อไป ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอื่น ๆ ทั้งนี้จากผลการวิจัยข้างต้นสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสร้างระบบยา (drug system) เพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพต่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย และภาควิชาสรีรวิทยา สำหรับสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

รายการอ้างอิง (References)

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Chung, C. (2018). Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 75(13), 945-952.
- ElMasrya, S.R., & Hathout R.M., (2018). In Vitro transdermal delivery of sesamol using oleic acid chemically-modified gelatin nanoparticles as a potential breast cancer medication, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48, 30-39.
- Kitaoka, M., Oka, A., & Goto, M., (2020). Monoolein Assisted Oil-Based Transdermal Delivery of Powder Vaccine, *Pharmaceutics*, 12(814), 1-13.



- Nakrukamphonphatn, S., Suwannakoo, N., & Natason, A., (2021). Primary Prevention Behavior for Cervical Cancer among Husbands, *Regional Health Promotion Center 9 Journal*, 15(38), 484-496.
- Nawale, L., Dubey, P., Chaudhari, B., Sarkar, D., & Prabhune, A. (2018). Anti-proliferative effect of novel primary cetyl alcohol derived sophorolipids against human cervical cancer cells HeLa, *PLOS ONE*, 1-14.
- Punjaruk W. (2015). Physiology of Cancer: Prospective Aspects Beyond the 21st Century, *Srinagarind Medical Journal*, 30(2), 175-183.
- Rongpan, S., Trongwongsa, T., Wongsatayanon, B., & Jariyapongskul, A. (2015). Effect of monoolein on inhibition of tumor growth in cervical cancer xenografts in nude mice, *Journal of Medicine and Health Sciences*, 22(3), 41-52.
- Rongpan, S., Phonnok, S., Boondireke, S., Tripinyopap, N., & Wongsatayanon, B. (2017). Anti-Proliferative Effect of Long-Chain Monoglyceride Derivatives on Human Cervical Carcinoma Cell Line, *Journal of the Medical Association of Thailand*, 100(Suppl. 8), S165-S172.
- Ruangpratheep, C. (2019). The basic concepts of apoptosis, *Royal Thai Army Medical Journal*, 72(2), 137-143.
- Shrestha, A.D., Neupane, D., Vedsted, P., & Kallestrup, P. (2018). Cervical Cancer Prevalence, Incidence and Mortality in Low and Middle Income Countries: A Systematic Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(2), 319-324.
- Sukpanichnant, S. (2018). Myeloma Pathology 2017. *Journal of Hematology and Transfusion Medicine*, 28(1), 71-81.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–24.
- Tang, X., Tao, F., Xiang, W., Zhao, Y., Jin, L., & Tao, H. (2020). Anticancer effects and the mechanism underlying 2-methoxyestradiol in human osteosarcoma in vitro and in vivo. *Oncology Letters*, 20(64), 1-9.
- Thammasiri, J., Navanukraw, C., Nutthakornkul, J., Guntaprom, S., & Khanthusaeng, V. (2017). Evaluation of growth and development of corpus luteum in goats using proliferating cell



nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 as markers of cell proliferation, *Khon Kaen Agriculyural Journal*, 45, 1746-752.

Wu, Y.S., Ngai, S.C., Goh, B.H., Chan, K.G., Lee, L.H., & Chuah, L.H. (2017). Anticancer Activities of Surfactin and Potential Application of Nanotechnology Assisted Surfactin Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 8(761), 1-22.

Yoon, B.K., Jackman, J.A., Elba Valle-Gonzalez, R., & Cho, N.J. (2018). Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1114), 1-40.