วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL

ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม-กันยายน 2552

- การประเมินศักยภาพของสารสกัดจากรากของสบู่ดำต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม
- การเปรียบเทียบปริมาณ Aflatoxin–Albumin Adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนที่มีภูมิลำเนาอยู่ในเขตกรุงเทพฯ และชนบท
- ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับไวรัสตับอักเสบบี อายุและเพศของผู้ที่มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
- ความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* Gene Polymorphism กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในจังหวัดสุราษฎร์ธานี
- Plant-Derived Phenolic Antioxidants and Cancer Prevention

Vol. 29 No. 3
July-September 2009

ISSN 0125-2038

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL

ISSN 0125-2038

มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

บรรณาธิการ

ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

วิโรจน์ เหล่าสุนทรศิริ | นงพงา สุวัฒนานันท์ | เพ็ญศรี แซ่หลี
ศุลีพร แสงกระจ่าง | สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์

คณะบรรณาธิการ

กนกพร ใจสถาพร | กิติ จินดาวิจักษณ์ | กวิญ ลีละวัฒน์
ดนัย ทิวาเวช | ฉันทนา หมอกเจริญพงศ์ | ผ่องพรรณ ศิริพงษ์
เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล | ธิดา ปัญจพันธ์พงศ์ | วีรวุฒิ อิ่มสำราญ
วิชิต อาภรณ์วิรัตน์ | ชนินทร์ อภิวาณิชย์ | วุฒิ สุเมธโชติเมธา
วสันต์ ลีนะสมิต | วรรณเพ็ญ เบ็ญจชัย | สมจินต์ จินดาวิจักษณ์
สายพิน ตั้งครัชต์ | สุพล มโนรมณ์ | สุเมธ รินสุรงควงศ์
สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์ | อนงค์ เทพสุวรรณ์ | อมรรัตน์ วิจิตรลีลา
อรุณลักษณ์ โคมินทร์ | อัครียา สมรรคบุตร | อนันต์ กรลักษณ์
อารยะ อดุลยพันธ์ | อารีย์ ประสิทธิพยงค์ | อรสา อัครวัชรางกูร
อรชร เอี่ยมอารีรัตน์

ผู้จัดการ

อาคม ชัยวีระวัฒนะ

ผู้ช่วยผู้จัดการ

หทัยทิพย์ เชื้อสอน | พรนภา จันทรวีระกุล | มลินี สนธิไชย
วารีพร ศักดิ์สมบูรณ์ | เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน

พิมพ์ที่ บริษัท โฆสิตการพิมพ์ จำกัด
373 ถ.จรัญสนิทวงศ์ แขวงบางอ้อ เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700 โทร. 0-2424-8715, 0-2433-3011

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL

ISSN 0125-2038

The National Cancer Institute Foundation

Editor–in–Chief

Thiravud Khuhaprema

Assistant Editors

Wirote Lausoontornsiri
Nongpanga Suwattananand
Pensri Saelee
Suleeporn Sangrajrang
Sunanta Chariyalertsak

Editorial Board

Kanokporn Jaisathaporn
Kiti Chindavijak
Kawin Leelawat
Danai Tiwawech
Chantana Morkchareonpong
Pongpun Siripong
Petcharin Srivatanakul
Thida Panchaphanpong
Weerawut Imsamran
Vichit Arpornwirat
Chanin Apiwanich
Wutthi Sumetchotimaytha
Vasant Linasmita
Wanpen Benjachai
Somjin Chindavijak
Saipin Tangkarat
Suphon Manoromana
Sumate Rinsurongkawong
Suwat Chariyalertsak
Anong Tepsuwan
Amornrat Vijitleela
Arunluck Komindr
Akariya Samakhaputra
Anant Karalak
Araya Adulbhan
Aree Prasitthipayong
Orasa Akkarawacharangkul
Orachorn Aimarreerat

Managing Editor

Arkom Chaiwerawattana

Assistant Managers

Hathaitip Chuasorn
Pornnapa Jantaraweragul
Malinee Sontichai
Wareeporn Saksomboon
Saowakon Sukarayodhin

KOSIT PRESS COMPANY LIMITED

373 Charansanitwong Rd., Bang-ow, Bangplad, Bangkok 10700 Tel. 0-2424-8715, 0-2433-3011

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL

วัตถุประสงค์ เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ ผลงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็ง และอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

สำนักงาน สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2354-7025 ต่อ 2205
โทรสาร 0-2644-9097

เว็บไซต์เผยแพร่ www.kmnci.com

กำหนดการตีพิมพ์ กำหนดออกทุก 3 เดือน ปีละ 4 ฉบับ

การส่งต้นฉบับ บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2354-7025 ต่อ 2205
โทรสาร 0-2644-9097
E - mail : nci_journal@hotmail.com

การบอกรับเป็นสมาชิก
- ห้องสมุดและหน่วยงานราชการแจ้งความจำนงได้ที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็งโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
- หน่วยงานเอกชน อัตราค่าสมาชิก 200 บาท ต่อปี (4 ฉบับ) รวมค่าจัดส่ง โดยสมัครสมาชิกผ่านเว็บไซต์ www.kmnci.com และโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาธิบดี เลขที่บัญชี 026-2-27518-2 ชื่อบัญชี มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL

สารบาญ
Content

ปีที่ 29 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2552

		หน้า
บทบรรณาธิการ		**87**
การประเมินศักยภาพของสารสกัดจากรากของสบู่ดำต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม	*จรัญญา งามขำ วารี เนื่องจำนงค์ มติ เหรียญกิจการ พรทิพา พิชา*	**90**
การเปรียบเทียบปริมาณ Aflatoxin – Albumin Adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนที่มีภูมิลำเนาอยู่ในเขตกรุงเทพฯ และชนบท	*สิริภัทร ชุติมาเทวินทร์ ศรีสุรางค์ จิตชินะกุล*	**102**
ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับไวรัสตับอักเสบบี อายุและเพศของผู้ที่มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ	*อารีย์ ประสิทธิพยงค์ อนันต์ กรลักษณ์ วิชุดา ไตรรัตน์อภิชาต ผ่องพรรณ รมหิรัญ*	**108**
ความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* Gene Polymorphism กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	*ดนัย ทิวาเวช สมจินต์ จินดาวิจักษณ์ สุดจิตร ทองนุ่น Takafumi Ishida*	**115**
Plant-Derived Phenolic Antioxidants and Cancer Prevention	*Yuttana Sudjaroen*	**126**

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม–กันยายน 2552

บทบรรณาธิการ

การป้องกันโรคมะเร็ง

กองทุนวิจัยโรคมะเร็งโลก (World Cancer Research Fund: WCRF) ประเทศอังกฤษ ร่วมกับสมาคมการวิจัยเพื่อการป้องกันโรคมะเร็ง (American Institute for Cancer Research: AICR) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ร่วมกันประเมินผลงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งกว่า 7000 ฉบับ ทั่วโลก โดยกลุ่มผู้เชี่ยวชาญระดับโลกจำนวน 21 คน พบว่า มะเร็งเป็นโรคที่สามารถป้องกันได้โดยมีความสัมพันธ์กับการออกกำลังกาย การกินอาหาร และการควบคุมน้ำหนัก[1] WCRF/AICR ได้ตีพิมพ์รายงานการศึกษาออกสู่สาธารณชนในหัวข้อ Second Expert Report, *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer* และจากรายงานดังกล่าวได้แสดงความถี่เป็นร้อยละของโรคมะเร็งที่สามารถป้องกันได้โดยการออกกำลังกาย การกินอาหารและการควบคุมน้ำหนักใน 4 ประเทศ คือ ประเทศอังกฤษและสหรัฐอเมริกาเป็นตัวแทนของประเทศที่มีรายได้สูง (high-income country) ประเทศบราซิลและสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นตัวแทนของประเทศที่มีรายได้ต่ำจนถึงปานกลาง (low and middle-income countries) ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Percentage of cancers that could be prevented via healthy diet, regular physical activity and healthy weight[2]

Cancer	US	UK	Brazil	China
1. Endometrium (lining of the uterus)	70	56	52	34
2. Esophagus	69	75	60	44
3. Mouth, pharynx & larynx	63	67	63	44
4. Stomach	47	45	41	33
5. Colon	45	43	37	17
6. Pancreas	39	41	34	14
7. Breast	38	42	28	20
8. Lung	36	33	36	38
9. Kidney	24	19	13	8
10. Gallbladder	21	16	10	6
11. Liver	15	17	6	6
12. Prostate	11	20	N/A	N/A
These 12 cancers combined	**34**	**39**	**30**	**27**

N/A = not available

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ในประเทศสหรัฐอเมริกาประมาณ 1 ใน 3 คน ของผู้ป่วยมะเร็งสามารถป้องกันได้ เช่น ร้อยละ 45 ของมะเร็งลำไส้ และร้อยละ 38 ของมะเร็งเต้านม สามารถป้องกันได้โดยการรักษาสมดุลของการปฏิบัติตน 3 หลักการ คือ 1. การควบคุมน้ำหนัก (healthy weight) 2. การกินอาหาร (healthy diet) และ 3. การออกกำลังกาย (physical activity) ซึ่งทาง WCRF/AICR ได้แนะนำวิธีต่างๆ เพื่อรักษาสมดุลของการปฏิบัติตน 3 หลักการ เพื่อการป้องกันโรคมะเร็ง[3] ดังนี้

1) การควบคุมน้ำหนัก (healthy weight) ภาวะอ้วนเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคต่างๆ มากมายรวมถึงโรคมะเร็งด้วย ภาวะน้ำหนักเกินมาตรฐาน อ้วน และอ้วนลงพุงนั้น เป็นอันตรายต่อร่างกายเป็นอย่างยิ่ง เพราะไขมันส่วนเกินจะกระตุ้นให้ร่างกายปล่อยฮอร์โมนที่เรียกว่า เอสโตรเจน เข้าสู่กระแสเลือดทำให้ในร่างกายมีระดับฮอร์โมนที่สูงมากกว่าปกติ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งเต้านม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การมีไขมันสะสมบริเวณเอวหรือภาวะอ้วนลงพุงนั้นเป็นปัจจัยที่เสริมให้ร่างกายหลั่ง growth hormone ออกมามากกว่าปกติ ซึ่งการมี growth hormone ออกมาในปริมาณที่มากกว่าปกติเป็นการเพิ่มโอกาสเสี่ยงอย่างมากต่อการเกิดโรคมะเร็ง การตรวจสอบตนเองว่าอยู่ในภาวะอ้วน หรือผอมเกินไปหรือไม่ โดยวิธีการง่ายคือ การคำนวณดัชนีมวลกาย (body mass index: BMI) ซึ่งสูตรในการคำนวณ BMI = น้ำหนัก (กิโลกรัม) / ส่วนสูง^2 (เมตร) BMI ที่คำนวณได้ ถ้ามีค่าน้อยกว่า 18.5 แสดงว่า มีน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์ ค่าระหว่าง 18.5-22.9 มีน้ำหนักในเกณฑ์ปกติ ค่าระหว่าง 23-24.9 มีน้ำหนักเกินเกณฑ์ (ท้วม) และถ้ามากกว่า 25 แสดงว่าอ้วน

2) การกินอาหาร (healthy diet) ไม่ควรกินอาหารที่มีไขมันสูง ควรกินผัก ผลไม้สด ธัญพืช และถั่ว หลีกเลี่ยงเนื้อแดง, อาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อาหารที่มีรสเค็มจัด และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

3) การออกกำลังกาย (physical activity) ทำให้สุขภาพดี แข็งแรง สมบูรณ์ ทั้งร่างกายและจิตใจ ต้านทานโรคร้ายต่างๆได้ มีการศึกษาพบว่าการออกกำลังกายมีผลต่อการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ ควรออกกำลังกายทุกวัน หรืออย่างน้อย 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ครั้งละไม่ต่ำกว่า 30 นาที การออกกำลังกายที่ดีนั้นควรเลือกประเภทของกิจกรรมที่เหมาะสมกับวัยของตนเองซึ่งมีมากมายหลายประเภทขึ้นอยู่กับความชอบของแต่ละบุคคล เพราะการออกกำลังกายที่หักโหมมากจนเกินไปอาจทำให้ร่างกายบาดเจ็บได้

จากความสำคัญของการป้องกันโรคมะเร็ง องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และ International Union Against Cancer (UICC) ได้กำหนดให้วันที่ 4 กุมภาพันธ์ ของทุกปี เป็นวันมะเร็งโลก (World Cancer Day) โดยในระยะเวลา 5 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550-2554 จะมุ่งเน้นในการส่งเสริมให้เด็กและเยาวชนมีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตั้งแต่วัยเด็ก ซึ่งเมื่อวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2551 ประเทศไทยก็ได้ร่วมรณรงค์จัดงานวันมะเร็งโลกเช่นกัน ภายใต้แนวทางเดียวกัน คือ "Today's Children, Tomorrow's World" เด็กในวันนี้คือความเป็นไปของโลกในวันหน้า เพื่อรณรงค์เสริมสร้างความเข้มแข็งด้านสุขภาพในการป้องกันโรคมะเร็งแก่เด็กและเยาวชน ส่งเสริมการสร้างสมดุลในการใช้พลังงานในชีวิตประจำวัน เน้นการออกกำลังกาย ลดอาหารไขมันส่วนเกิน หลีกเลี่ยงโรคอ้วน และสร้างการเรียนรู้ให้เด็กดำรงชีวิตอย่างมีความสุข[4]

ถ้าจะกล่าวโดยสรุป โรคมะเร็งเป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ หากมีการปฏิบัติตนให้เหมาะสมในเรื่องของการกินอาหารให้ถูกหลักโภชนาการ การควบคุมน้ำหนักไม่ให้อ้วนหรือผอมเกินไป และการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และสิ่งที่สำคัญที่ทาง WCRF/AICR เน้นย้ำ นอกจากการปฏิบัติตนดังกล่าวข้างต้นแล้ว คือ การไม่สูบบุหรี่ จะช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งได้ หากคนเราสามารถปฏิบัติได้ดังกล่าวแล้วคุณภาพชีวิตย่อมดีขึ้นและสามารถป้องกันได้อีกหลายๆโรคไม่เฉพาะโรคมะเร็งเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

1. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Available at: http://www.aicr.org/site/Pagesaver?pagename=research_science_expert_report. Accessed August 24, 2009.
2. Cancer Prevention by the Numbers. Available at: http://www.aicr.org/site/Pagesaver?pagename=research_science_preventability.Accessed August 26, 2009.
3. Recommendations for Cancer Prevention. Available at: http://www.aicr.org/site/PageServer?pagename=recommendations_home. Accessed August 26, 2009.
4. About the world cancer campaign Available at: http://www.worldcancercampaign.org/. Accessed August 31, 2009.

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม–กันยายน 2552

การประเมินศักยภาพของสารสกัดจากรากของสบู่ดำต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม

จรัญญา งามขำ[1]
วารี เนื่องจำนงค์[2]
มติ เหรียญกิจการ[1]
พรทิพา พิชา[1]

บทคัดย่อ สมุนไพรหรือพืชที่พบในเขตร้อนมักพบว่าเป็นแหล่งของสารสกัดที่มีศักยภาพในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งรวมถึงสมุนไพรที่พบในประเทศไทย เช่น สบู่ดำ โดยสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของสบู่ดำมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของสบู่ดำ หรือ Curcusone C ต่อการยับยั้งการเจริญและการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ผลจากการศึกษา พบว่า Curcusone C สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดโดยการทดสอบด้วยวิธี 3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrasodium bromide (MTT) assay ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง (ร้อยละ50) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือ IC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.73 ± 0.31 ไมโครโมล่าร์ (ค่า IC_{50} ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และสารสกัดดังกล่าวยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิดกระบวน apoptosis เมื่อย้อมดูเซลล์ตายและเซลล์ที่เกิด apoptotic bodies ด้วยวิธี Hoechst & PI รวมทั้งทดสอบการแตกหักของสาย DNA นอกจากนี้ยังพบว่า Curcusone C สามารถเหนี่ยวนำให้เพิ่มหรือลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ได้แก่ *p53, Bcl-2* และ *Bax* จากการทดสอบด้วยวิธี Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า ปริมาณของ p53 และ Bax mRNA เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ปริมาณของ Bcl-2 mRNA ลดลง

ผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของสบู่ดำสามารถยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้นสารสกัดจากสบู่ดำน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต *(วารสารโรคมะเร็ง 2552;29:90-101.)*

[1]งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

Abstract **Induction of Apoptosis by Purified Compound from *Jatropha Curcas* in Breast Cancer Cell**

by Jarunya Ngamkham[1], Waree Naengchomnong[2], Mati Rienkitjakarn[1] and Porntipa Picha[1]

[1]Section of Experimental Oncotherapy, Research Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400 Thailand, [2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand.

Medicinal plants or herbs from tropical regions are found to be one of the potential sources for screening of the anti-cancer agents including a Thai medicinal plant, *Jatropha curcas.* The purified compound from this plant has been extensively investigated for the anti-cancer activity on cancer cells. In this study, the effects of purified compound from roots of *J. curcas,* Curcusone C, underlying anti-proliferation activity and apoptosis induction in human mammary carcinoma; MCF-7 was investigated. The anti-proliferation was undertaken with MTT (3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrasodium bromide) assay. The apoptotic bodies and death cells were demonstrated by Hoechst & PI staining and confirmed by DNA fragmentation. Also, the apoptosis-related gene expression was analyzed by using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. It has been observed that Curcusone C exhibited anti-proliferation against MCF-7 and its median effective dose (IC_{50}) shown value was 0.73 ± 0.31 μM (IC_{50} ± SD). It also induced apoptotic changes in a dose-dependent manner which was investigated by Hoechst & PI staining and DNA ladder formation. The results from semi-quantitative RT-PCR assay showed that the expression of p53 and Bax mRNA were increased, whereas that of Bcl-2 mRNA was decreased.

Our finding demonstrated that the purified compound from roots of *J. curcas* potentially exhibited the effectiveness of its anti-cancer activity and apoptosis induction. It thus, holds the promise of being a potent and selective anti-cancer agent that deserved further exploration. *(Thai Cancer J 2009;29:90-101.)*

บทนำ

Apoptosis หรือ programmed cell death เป็นกระบวนการตายของเซลล์ประเภทหนึ่งซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างเป็นขั้นตอนและค่อนข้างซับซ้อน โดยมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสภาพสมดุลภายในเซลล์ (homeostasis) การพัฒนาการรวมถึงการแบ่งตัวของเซลล์ และกระบวนการ apoptosis มักจะเกิดในเซลล์ที่เสื่อมสภาพหรือมีความผิดปรกติเพื่อกำจัดเซลล์เหล่านี้ในการรักษาสมดุลภายในเซลล์[1] โดยกระบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพและชีวภาพ เช่น ทำให้เซลล์เหี่ยว เกิด chromatin condense มีการแตกหักของสาย DNA และนิวเคลียสสูญเสียสภาพการยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียงเป็นต้น นอกจากนี้การตายของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งที่เกิดจากกระบวนการ apoptosis ยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเซลล์เป็นสาเหตุให้สารพันธุกรรมหรือยีน (gene) เกิดการเปลี่ยนแปลงก่อนที่เซลล์จะถูกย่อยสลายหรือถูกทำลายด้วยวิธีการ phagocytosis[1-3] กระบวนการ ตายแบบ apoptosis สามารถเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยทั้งภายนอกและภายในเซลล์ เช่น สารเคมี รังสีอุลตร้าไวโอเลตหรือการติดเชื้อ เป็นต้น สำหรับกลไกการเกิดสามารถแบ่งเป็น 2 กลไก ที่สำคัญคือ กลไกที่มิได้ผ่านไมโตคอนเดรีย (extrinsic pathway) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย death receptor ที่บริเวณผิวของเมมเบรนและกลไกที่ผ่านไมโตคอนเดรีย (intrinsic pathway)[2] ที่เกิดจากความผิดปรกติภายในเซลล์

หรือ intracellular ถูกทำลาย ส่งผลให้มีการหลั่ง cytochrome c จากไมโตคอนเดรียและเป็นสัญญาณเข้าสู่กระบวนการ apoptosis[1] ซึ่งกลไกที่ผ่านไมโตคอนเดรีย มักจะมีการกระตุ้นหรือยับยั้งสารพันธุกรรมจำนวนมากที่อยู่ภายในเซลล์และสัมพันธ์กับการเกิดกระบวนการ apoptosis เช่น tumor suppressor genes เช่น *p53*, pro-apoptotic genes เช่น *Bax* หรือ anti-apoptotic genes เช่น *Bcl-2* เป็นต้น[1, 4-5] ในปัจจุบันพบว่ายาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหรือสารสกัดจากสมุนไพรจำนวนมากสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis[6-8] ซึ่งสบู่ดำก็เป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง[9-13]

สบู่ดำ *(Jatropha curcas)* เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนและทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในปัจจุบันนิยมนำมาเพาะปลูกเป็นไม้ประดับและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล[9-10] โดยสารเคมีที่สามารถพบในต้นสบู่ดำ ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ curcin, purgative oil, hydrocyanic acid, alkaloid, glycoside เป็นต้น[11] ในตำรับยาแพทย์แผนโบราณพบว่าสารสกัดจากต้นสบู่ดำสามารถใช้รักษาเนื้องอกชนิดต่างๆ บรรเทาและรักษาอาการโรคผิวหนัง บรรเทาอาการของอัมพาต ขับพยาธิ เป็นยาระบาย สามารถบรรเทาอาการอักเสบ ฯลฯ[10] และจากการศึกษาวิจัยพบว่า สารสกัดจากต้นสบู่ดำโดยเฉพาะส่วนรากสามารถยับยั้งหรือบรรเทาอาการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย TPA[12] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากส่วนรากสามารถยับยั้งการเจริญและยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง[13] ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาทดลองเพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดจากรากของต้นสบู่ดำต่อการยับยั้งการเจริญ และการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นและใช้เป็นแนวทางในการวิจัย เพื่อพัฒนายาหรือสารบำบัดมะเร็งในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของสบู่ดำ

นำรากของต้นสบู่ดำ *(Jatropha curcas)* ที่ต้องการสกัดมาบดให้ละเอียดและเริ่มดำเนินการสกัดโดยแช่ในตัวทำละลายชนิดเฮกเซนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาประมาณ 7 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองและระเหยจนเกือบแห้ง วางสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิห้องต่อประมาณ 7 วัน เพื่อให้สารสกัดหยาบแห้งสนิท โดยสารสกัดที่แห้งสนิท (crude extract) จะถูกนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ paper liquid chromatography (PLC) และวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยวิธี ^{13}C NMR และ ^{1}H NMR ซึ่งตัวอย่างของสารสกัดบริสุทธิ์ของรากสบู่ดำได้รับความอนุเคราะห์ในการดำเนินการสกัดและวิเคราะห์ผลโดย รศ.ดร. วารี เนื่องจำนงค์และคณะ จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ในการประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพสามารถเตรียมสารสกัดเพื่อนำมาทดสอบโดยการละลายใน DMSO (Merck, Germany) และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ตามความต้องการในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด minimal essential medium (MEM; Sigma, USA) ที่เติม 10% ของ inactivated fetal calf serum (FCS; Invitrogen, USA) และ 1% ยาปฏิชีวนะ (Invitrogen, USA) ในสภาวะปราศจากเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำคือเซลล์มะเร็งเต้านม (human mammary carcinoma, MCF-7) ซึ่งได้

รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Fumiaki Koizumi จากห้องปฏิบัติการ Shien ศูนย์มะเร็งแห่งชาติของประเทศญี่ปุ่น และอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมคือ MEM ที่เติม 10% FCS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (Nunc, Denmark) และบ่มในตู้เพาะเลี้ยง (Shellab, USA) ที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37°ซ ภายใต้สภาวะ 5% CO_2

การทดสอบคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็ง

การประเมินศักยภาพต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากสบู่ดำในระดับหลอดทดลองด้วยวิธี 3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrasodium bromide (MTT) assay โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่เตรียมตามความเข้มข้นที่ต้องการ ($2x10^3$ cells/well) จำนวน 180 ไมโครลิตร ใน 96-well plate (Corning, USA) แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37°ซ ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในจำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อดูผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มิได้เติมสารสกัดบริสุทธิ์จากรากสบู่ดำ ในการทดสอบผลการยับยั้งเริ่มจากเติมสารละลาย MTT จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำ plate ที่ทดสอบปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดอาหารและสารละลายออกจนหมดและเติม DMSO จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectronic, USA) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

การเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของสาย DNA (DNA fragmentation)

ดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (Corning, USA) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 10 เซนติเมตร โดยมีปริมาณเซลล์ $1x10^6$ cells/plate และเลี้ยงเซลล์ด้วย MEM ที่เติม 10%FCS นำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะ 37°ซ, 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง ดูดอาหารเดิมออกจนหมด ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer solution (PBS) 2 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของสบู่ดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะ 37°ซ, 5% CO_2 อีกครั้งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสกัด DNA จากเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Qiagen, USA) วิเคราะห์ผลการแตกหักของสาร DNA บน 2% agarose gel (Research organics, USA) ที่ใช้ในการแยกขนาดของ DNA (electrophoresis) ด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรม (Bio-Rad, USA) และย้อมด้วย ethidium bromide แล้วประเมินผลภายใต้แสง UV โดยใช้ densitometer (SYNGENE, England)

การย้อมเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด apoptotic bodies ด้วย Hoechst PI staining

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมใน 24-well plate (Corning, USA) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM โดยเตรียมจำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^4$ cells/well จำนวน 450 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะ 37°ซ, 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดพื้นผิวของภาชนะ จากนั้นเติมสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะ 37°ซ, 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยเติมสารละลายของ Hoechst & PI (อัตราส่วน

Hoechst:PI:น้ำ = 10:100:190 ไมโครลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ผลภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มิได้ทดสอบกับสารสกัด

การประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำต่อการแสดงออกของ p53, Bax และ Bcl-2 mRNA

ประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำในเซลล์มะเร็งเต้านมต่อการเพิ่มหรือลดปริมาณของระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis คือ *p53, Bax* และ *Bcl-2* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR[14] แบบ two-step method โดยการเตรียมเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ที่เตรียมมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (Corning, USA) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°ซ, 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดจากสบู่ดำที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน นำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดมาสกัด total RNA ตามวิธีการสกัดที่แนบมากับชุดน้ำยาของ Roche (Roche protocol, USA) และวัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำ total RNA จำนวน 11 กรัมที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบกับสารสกัดจากสบู่ดำที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธีการสังเคราะห์ของ Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) โดยสายของ cDNA ที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นสายตั้งต้นในการทดสอบด้วยวิธี PCR ต่อไป

สำหรับ primers ที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี PCR ของยีนเป้าหมายที่ต้องการทดสอบคือ *p53, Bax* และ *Bcl-2* รวมทั้งยีนมาตรฐานที่เป็น house-keeping gene; *β-actin* มีลำดับเบสดังนี้ p53F; 5'-TCAGTCTACCTCCCGCCATAA-3', p53R; 5'-TTTCTTACATCTCCCAAACATCC-3' (326bp), BaxF; 5'-AGGATCGAGCAGGGCGAATG-3', BaxR; 5'-AGGGCCTTGAGCACCAGTTT-3' (280bp), Bcl-2F; 5'-TTGCCACGGTGGTGGAGGAGC-3', Bcl-2R; 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3' (261bp), β-actinF; 5'-GACCTTCAACACCCCAGCCA-3' และ β-actinR; 5'-AGGCTGGAAGAGTGCCTCAG-3' (411bp) ในการทดสอบเริ่มจากการนำสารผสมจำนวน 20 ไมโครลิตรที่ได้จากการผสมของ 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 10X PCR buffer, 10 pmole ของ primer แต่ละเส้น และ 0.5 U ของ 0.5 *Taq* polymerase (Intronbio, Korea) และน้ำกลั่น มาทดสอบเพิ่มจำนวนของ DNA ในเครื่อง PCR (Eppendrof, Germany) โดยเริ่มการทำงานจาก hot start เพื่อแยกสายคู่ของ cDNA ที่ 95°ซ, 5 นาที จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเพิ่มสาย DNA ตามโปรแกรมดังนี้ denaturation ที่ 95°ซ, 30 วินาที, primer annealing ที่ 58°ซ, 30 วินาที และ polymerization ที่ 72°ซ, 30 วินาที และดำเนินตามโปรแกรมจำนวน 26 รอบ ในขั้นตอนสุดท้ายจะเป็น re-polymerization ที่ 72°ซ เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ไปแยกชนิดของสารพันธุกรรมโดยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 1.2% agarose gel (Research organics, USA) ด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรม (Bio-Rad, USA) และ ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วประเมินและ วิเคราะห์ผล ภายใต้แสง UV โดยใช้ densitometer (SYNGENE, England) และในการทดลองนี้ผู้วิจัยใช้ *β-actin* เป็นตัว normalize ในการแสดงออกของสาร พันธุกรรมที่นำมาทดสอบ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็งแสดงผลในรูปของความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ครึ่งหนึ่ง ± ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (IC_{50} ± S.D.) สำหรับการประเมินศักยภาพของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ apoptosis แสดงค่าในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D.) แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ student's *t*-test ในการหาค่า *P* และกำหนดค่า *P* ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ

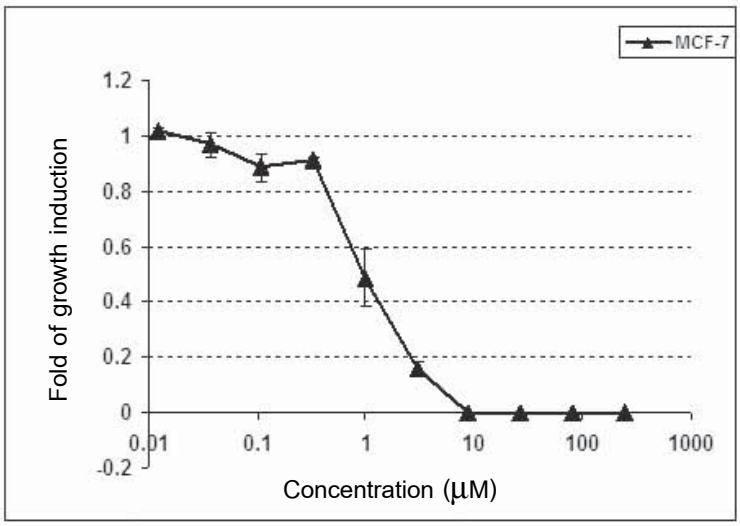
ผลการศึกษา

การเตรียมสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ

จากการสกัดสารบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ *(Jatropha curcas)* ด้วยเฮกเซน พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซนคือ Curcusone C มีลักษณะเป็นแท่งปริซึม (prism) ขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อน มีจุดหลอมเหลวประมาณ 204-205°ซ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 312 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_{20}H_{24}O_3$

การประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) ต่อการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง

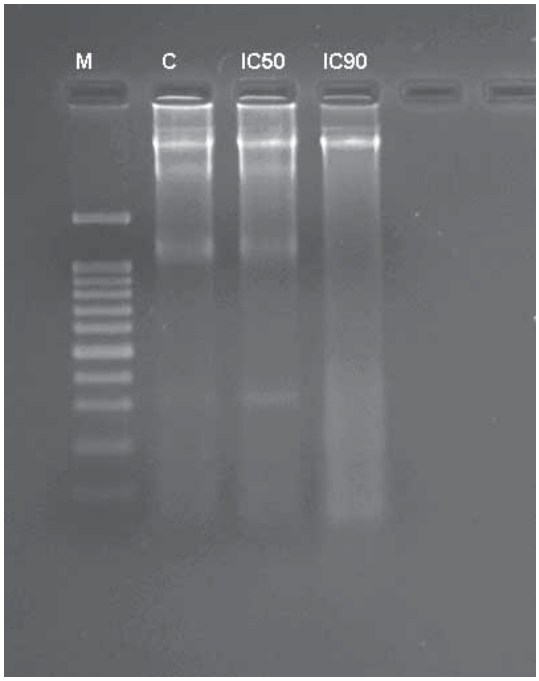
ในการทดสอบคุณสมบัติต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วยสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) พบว่า Curcusone C สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้เป็นครึ่งหนึ่ง (50%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือค่า IC_{50} ประมาณ 0.73 ± 0.31 μM (IC_{50} ± S.D.) ในขณะที่ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ 90% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (IC_{90}) จะมีค่าประมาณ 3.44 ± 1.41 μM (IC_{90} ± S.D.) โดยความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วยสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

การเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของสาย DNA (DNA fragmentation)

จากการทดสอบสารสกัดบริสุทธิ์จากรากสบู่ดำ (Curcusone C) ต่อการแตกหักของสาย DNA ในเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ส่งผลให้การแตกหักของสาย DNA เพิ่มมากขึ้น นั่นคือ Band ของสาย DNA ที่ทดสอบด้วยความเข้มข้น 3.44 μM (IC_{90}) จะเกิดผลการสูญเสียสภาพ (denature) มากกว่าการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.73 μM (IC_{50}) และกลุ่มควบคุม (C) ที่มิได้ทดสอบกับสารสกัดดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงรูปการแตกหักของสาร DNA ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ทดสอบด้วยสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 50% (IC_{50}; 0.73 μM) และ 90% (IC_{90}; 3.44 μM) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มิได้ทดสอบกับสารสกัด (control)

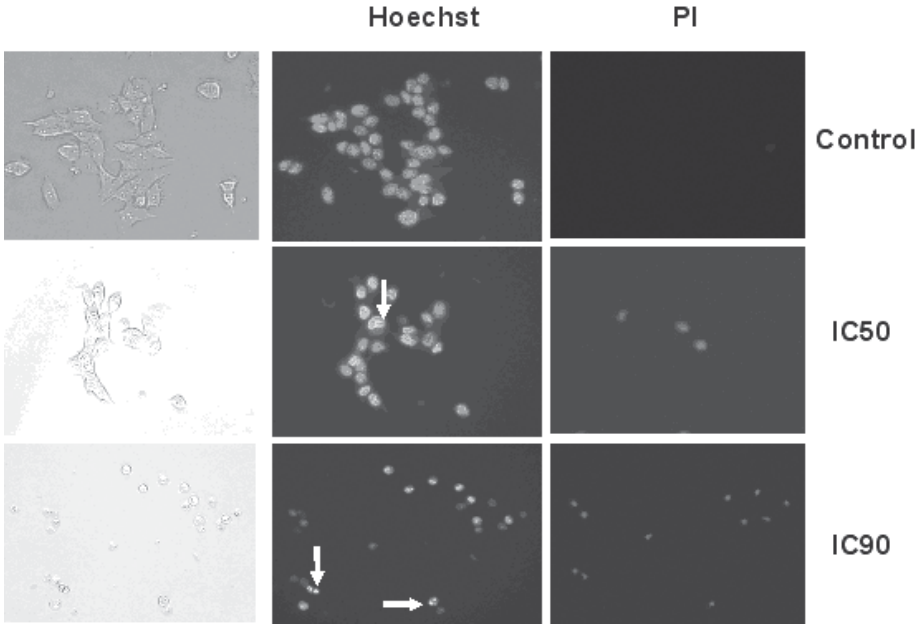
การย้อมเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด apoptotic bodies ด้วย Hoechst PI staining

จากการทดสอบสารสกัดบริสุทธิ์จากรากสบู่ดำ (Curcusone C) ต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการตายแบบ apoptosis และย้อมเซลล์เพื่อดูการเกิด apoptotic bodies โดยวิธี Hoechst & PI เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control group) ที่มิได้ทดสอบกับสารสกัด จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากรากสบู่ดำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้เพียงบางส่วนในจำนวนของเซลล์ที่ตายทั้งหมด และจำนวนของ apoptotic bodies หรือจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้ง (%Inhibition ± S.D.) ประมาณ 6.51± 1.92 และ 68.46± 20.36 ที่ความเข้มข้น 0.73 μM (IC_{50}) และ 3.44 μM (IC_{90}) ตามลำดับ

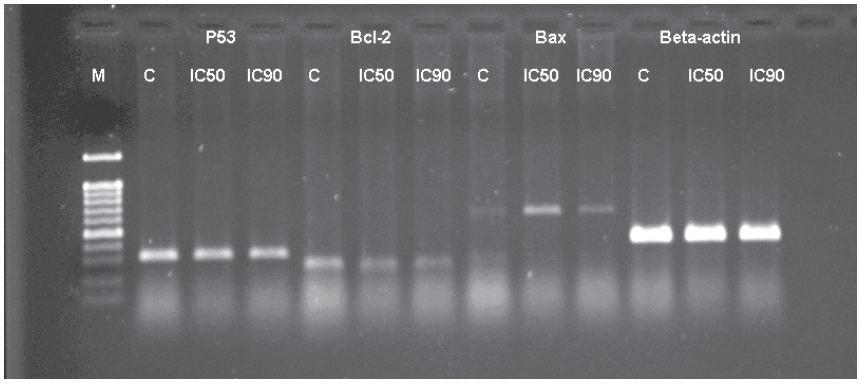
การประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) ต่อการแสดงของ p53, Bax และ Bcl-2 mRNA

ในการประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์ (Curcusone C) จากรากของสบู่ดำในตัวทำละลายที่เป็นเฮกเซนต่อการแสดงออกของระดับ p53, Bax และ Bcl-2 mRNA ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) นั้น พบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นระดับของ p53 และ Bax mRNA เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 3.44 μM (IC_{90}) สามารถกระตุ้น p53 mRNA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มิได้ทดสอบกับสารสกัด แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดจากรากสบู่ดำสามารถกระตุ้นระดับของ Bax mRNA ที่ความเข้มข้น 0.73 μM (IC_{50}) ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 3.44 μM (IC_{90}) และในขณะเดียวกันสารสกัดดังกล่าวยังสามารถยับยั้ง

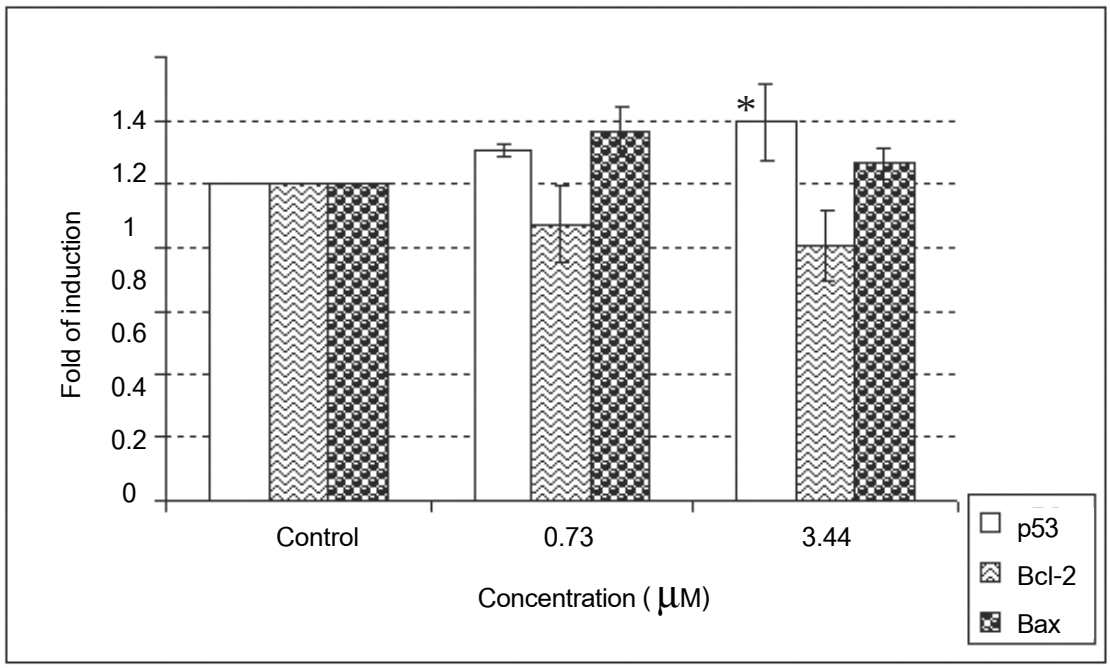
หรือลดระดับการแสดงออกของ anti-apoptoic mRNA ของ *Bcl-2* ได้ดังแสดงในรูปที่ 4 และจากการวิเคราะห์ผลโดยการวัดปริมาณด้วยเครื่อง densitometer ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 3 แสดงรูปเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่เกิด apoptosis (ลูกศรชี้) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 50% (IC_{50}; 0.73 μM) และ 90% (IC_{90}; 3.44 μM) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาย้อมด้วย Hoechst & PI เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control group) ที่มิได้ทดสอบกับสารสกัด โดย Hoechst ย้อมติดเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่เกิด apoptotic bodies ในขณะที่ Propidium iodine (PI) ย้อมติดเซลล์ที่เกิด apoptosis และเซลล์ที่ตาย



รูปที่ 4 แสดง band ของ PCR product ของ p53, Bcl-2, Bax และ Internal control (β-actin) mRNA เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบริสุทธิ์จากรากของต้นสบู่ดำ (Curcusone C) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 50% (IC_{50}; 0.73 μM) และ 90% (IC_{90}; 3.44 μM) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) ที่มิได้ทดสอบกับสารสกัด



รูปที่ 5 แผนภูมิแท่งแสดงศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์ (Curcusone C) จากรากของต้นสบู่ดำต่อระดับการแสดงออกของระดับ *p53*, *Bax* และ *Bcl-2* ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้นต่าง 0.73 μM (IC_{50}) และ 3.44 μM (IC_{90}) โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR (*P < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

วิจารณ์และสรุป

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งในแต่ละปีจะมีแนวโน้มของผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มมากขึ้น และในปัจจุบันยาที่ใช้ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งก็เป็นยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์พยายามคิดค้น วิจัย และพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหรือสมุนไพรมาใช้ในการบำบัดรักษา หรือบรรเทาอาการป่วยของผู้ป่วยมะเร็งและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งของพืชหรือสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาจำนวนมาก[15] โดยเฉพาะสมุนไพรที่มีประวัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาศึกษาวิจัยหรือพัฒนาสารบำบัดมะเร็งที่สามารถพบหรือเพาะปลูกได้ในประเทศไทย โดยสบู่ดำก็เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้[11-13]

ในปัจจุบันเมล็ดของต้นสบู่ดำ *(Jatropha curcas)* มีบทบาทสำคัญในด้านการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง[9] ในขณะที่ตำรับยาแพทย์แผนโบราณของประเทศในเขตโซนร้อน (Tropical countries) ซึ่งรวมถึงประเทศไทยก็มีการนำส่วนต่างๆ ของสบู่ดำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของตำรับยาในการรักษาโรคผิวหนังหรือโรคเกี่ยวกับไขข้อ (rheumatic) ใช้รักษาโรคริดสีดวง ใช้ในการบำบัดรักษาเนื้องอกชนิดต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็ง[10-11] จากการทดสอบสารสกัดบริสุทธิ์ (Curcusone C) จากรากของต้นสบู่ดำในสารสกัดที่เป็นเฮกเซนต่อเซลล์มะเร็ง

เต้านม (MCF-7) ในการศึกษานี้พบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดี และผลการยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด และตามมาตรฐานการกำหนดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา[16] ระบุว่าสารสกัดบริสุทธิ์ที่นับว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต้องมีความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเซลล์ได้ ครึ่งหนึ่ง (50%) ไม่เกิน 4 μg/ml แต่ความเข้มข้นของ Curcusone C ที่สามารถยับยั้งการเจริญที่ 50% ในรายงานนี้มีค่าประมาณ 0.73 μM (ประมาณ 0.23 μg/ml) ซึ่งน้อยกว่ามาตรฐานค่อนข้างมาก แสดงว่าสารสกัดจากสบู่ดำมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมค่อนข้างสูง

จากการประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์ (Curcusone C) ต่อการแตกหักของสาย DNA ในการศึกษานี้พบว่า Curcusone C สามารถเหนี่ยวนำให้สาย DNA ในเซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการแตกหักได้ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยการสูญเสียสภาพของสาย DNA จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent) แต่ผลที่ได้ยังไม่ชัดเจน ซึ่งถ้าเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบสารสกัด อาจจะส่งผลให้สาย DNA เกิดการแตกหักหรือถูกทำลายชัดเจนยิ่งขึ้น และเมื่อย้อมเซลล์มะเร็งด้วย Hoechst & PI เพื่อดูเซลล์มะเร็งที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด apoptotic bodies พบว่า Curcusone C สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptotic bodies เมื่อย้อมด้วย Hoechst และจากการย้อมด้วย PI พบว่าปริมาณของเซลล์ที่เกิด apoptotic bodies และเซลล์มะเร็งที่ตายเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent) เช่นเดียวกัน แต่จำนวนเซลล์ที่ตายมิได้เกิดจากกระบวนการ apoptosis ทั้งหมด เนื่องจากมีการเกิด apoptotic bodies ในเซลล์มะเร็งเพียงบางส่วนเท่านั้นเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ตาย และจากผลการทดสอบพบว่า การตายของเซลล์มะเร็งอาจมิได้เกิดจาก apoptosis เพียงชนิดเดียว ทั้งนี้อาจมีกลไกการทำงานอื่นที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมถูกทำลายได้ เช่น necrosis เนื่องจากสารสกัดจากสบู่ดำ หรือ Curcusone C มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่นำมาทดสอบค่อนข้างสูง

จากการประเมินศักยภาพของสารสกัดบริสุทธิ์ (Curcusone C) จากรากของต้นสบู่ดำต่อการแสดงออกของระดับ mRNA ของ tumor suppressor gene; *p53*, pro-apoptotic gene; *Bax* และ anti-apoptotic gene; *Bcl-2* พบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นระดับ mRNA ใน p53 และ Bax เพิ่มขึ้นในขณะเดียวกันสามารถยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 mRNA เพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงว่า Curcusone C สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ โดยเฉพาะการกระตุ้นใน *Bax* gene พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.73 μM (IC_{50}) Curcusone C สามารถกระตุ้นระดับการแสดงออกของ Bax mRNA ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 3.44 μM (IC_{90}) ทั้งนี้อาจมีผลมาจากลักษณะทางชีวภาพ (genetic background) ของเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบ เนื่องจากเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกันอาจให้ผลการแสดงออกของสารพันธุกรรมแตกต่างกัน[17-19] เช่น ที่ความเข้มข้นสูงอาจให้ผลการแสดงออกของสารพันธุกรรมดีกว่าความเข้มข้นต่ำ[17,19] หรือในเซลล์มะเร็งบางชนิดอาจจะกระตุ้นการแสดงของของสารพันธุกรรมได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ[18] นอกจากนี้ชนิดของสารหรือยาที่นำมาทดสอบหรือระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบก็อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารพันธุกรรมเช่นเดียวกัน[17-19]

จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า สารสกัดบริสุทธิ์ (Curcusone C) จากรากของต้นสบู่ดำมีศักยภาพในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้

เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษา ค้นคว้า วิจัยสารสกัดจากต้นสบู่ดำในด้านต่างๆต่อไป เพื่อพัฒนาเป็นยาหรือสารบำบัดมะเร็ง สำหรับใช้ในการบำบัดรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากห้องปฏิบัติการ Shien ศูนย์มะเร็งแห่งชาติประเทศญี่ปุ่น อาทิเช่น Dr. Fumiaki Koizumi ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็ง อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทดสอบ MTT assay และ Hoechst & PI Staining ตลอดจนคำแนะนำและที่ปรึกษาในการดำเนินโครงการวิจัย ขอขอบคุณ Dr. Taguchi Fumiko และ Dr. Fukui Tomoya ที่กรุณาให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการทดสอบ MTT assay และ Hoechst & PI Staining ตามลำดับ รวมทั้งบุคลากรท่านอื่นๆ ในห้องปฏิบัติการที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานวิจัยและผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย ที่กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther 2001;92:57-70.
2. Malaguarnera L. Implication of apoptosis regulators in tumorigenesis. Cancer Metastasis Rev 2004; 23:367-87.
3. Cheng YL, Chang WL, Lee SC, Liu YG, Chen CJ, Lin SZ, et al. Acetone extract of *Angelica sinesis* inhibits proliferation of human cancer cell via inducing cell cycle arrest and apoptosis. Life Sci 2004;75:1579-94.
4. Cooper GM. Cancer. In: Cooper GM, editor. The cell: A molecular approach. 2nded. Washington DC: ASM Press; 2000. p. 609-40.
5. Dutta T, Sharma H, Kumar L, Dinda AK, Kumar S, Bhatla N, et al. Neoadjuvant chemotherapy for epithelial ovarian cancer-role of apoptosis. Cancer Chemoher Pharmacol 2005;56:427-35.
6. Sekiya M, Funahashi H, Tsukamura K, Imai T, Hayakawa A, Kiuchi T, et al. Intracellular signaling in the induction of apoptosis in a human breast cancer cell line by water extract of Mekabu. Int J Clin Oncol 2005;10:122-6.
7. Kwon KB, Kim EK, Han MJ, Shin BC, Park YK, Kim KS, et al. Induction of apoptosis by *Radix Paeoniae Alba* extract through cytochrome c release and the activations of caspase-9 and caspase-3 in HL-60 cells. Biol Pharm Bull 2006;29:1082-6.
8. Lee EO, Lee JR, Kim KH, Baek NI, Lee SJ, Lee BH, et al. The methylene chloride fraction of trichosantis fructus induces apoptosis in U937 cells through the mitochondrial pathway. Biol Pharm Bull 2006;29:21-5.
9. ABOUT JATROPHA PLANT. Available at:http://www.jatrophabiodiesel.org. Accessed April 27, 2007.
10. *Jatropha curcas*. Available at:http://www.medicinword.com. Accessed April 19, 2007.
11. *Jatropha Curcas* L. Available at:http://www.intox.org. Accessed April 29, 2007.
12. Mujumdar AM, Misar AV. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* L. roots in mice and rats. J Ethnopharmacol 2004;90:11-5.
13. Muangman S, Thippornwong M, Tohtong R. Anti-metastatic effects of curcusone c, a diterpene from *Jatropha curcas*. In vivo 2005;19:265-8.
14. Innis MA, Gelfand DH. Optimiation of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic press;1990. p. 3-12.
15. มูลนิธิมหาวิทยาลัยมหิดล. สารานุกรมสมุนไพร เล่มที่ 4 กกยาอีสาน, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อมรินทร์ 2542
16. Geran RI, Grenberg NG, Macdonale MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and nature products against animal tumors and other biological system. Cancer Chemther Rep Part 3 1972;3:1-66.
17. Cheng KC, Huang HC, Chen JH, Hsu JW, Cheng HC, Ou CH, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides in human monocytic leukemia cells: from gene expression to network construction. BMC Genomics 2007;8:1-17.

18. Suzuki K, Kazui T, Yoshida M, Uno T, Kobayashi T, Kimura T, et al. Drug-induced apoptosis and p53, Bcl-2 and Bax expression in breast cancer tissues *in vivo* and in fibroblast cells *in vitro*. Jpn J Clin Oncol 1999;29:323-31.

19. Shankar S, Srivastava R. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulomethane)-induced apoptosis in prostate cancer. Int J Oncol 2007;30:905-18.

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม–กันยายน 2552

การเปรียบเทียบปริมาณ Aflatoxin – Albumin Adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนที่มีภูมิลำเนาอยู่ในเขตกรุงเทพฯ และชนบท

สิริภัทร ชุติมาเทวินทร์[1]
ศรีสุรางค์ จิตชินะกุล[2]

บทคัดย่อ Aflatoxin-albumin (AF-alb) adduct ตรวจพบได้ในปัสสาวะ น้ำนม เลือด และเนื้อเยื่ออื่น ๆ มีรายงานพบความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับสารพิษ alflatoxin B_1 (AFB_1) กับโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ในประเทศไทยมีรายงานพบว่ามีผู้ได้รับสารพิษ AF มากที่สุดในกรุงเทพฯ รองลงมาคือ อุบลราชธานี เชียงใหม่ สงขลา และนครราชสีมา ตามลำดับ ปริมาณ AF ที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 5-2510 mg AF-equivalent/ml แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาสารพิษนี้ในเด็กไทย ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ AF-alb adducts ในกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีภูมิลำเนาต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างเลือดของนักเรียนที่อยู่ในเขตกรุงเทพฯ 2 โรงเรียน เขตชนบทและเขตชายแดนอีกแห่งละ 2 โรงเรียน รวมเป็น 6 โรงเรียน นักเรียนที่ใช้ในการศึกษามีอายุระหว่าง 9-16 ปี เป็นนักเรียนชาย 133 ราย นักเรียนหญิง 117 ราย อยู่ในเขตกรุงเทพฯ 125 ราย เขตชนบทและชายแดนอีก 125 ราย จากการตรวจหาปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนทั้ง 250 ราย ตรวจไม่พบ AF-alb adducts 1 ราย อีก 249 ราย ตรวจพบโดยมีค่าระหว่าง 1.2-59.0 pg/mg เฉลี่ย 18.8 pg/mg และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ AF - alb adducts ในเด็กนักเรียนทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีภูมิลำเนาในกรุงเทพฯ กับกลุ่มที่อยู่เขตชนบทและชายแดน พบว่าเด็กนักเรียนทั้ง 2 กลุ่มได้รับสาร AF-alb adducts ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน (P=0.068) *(วารสารโรคมะเร็ง 2552;29:102-107.)*

Abstract Comparison of Aflatoxin-Albumin Adduct Levels in Sera of School Children from Bangkok and Rural Area

by Siripat Chutimataewin[1], Srisurang Jitchinakul[2]

[1] *Research Division, National Cancer Institute, Bangkok,* [2]*Planning Division, Department of Medical Service, Ministry of Public Health, Thailand*

Aflatoxin-albumin (AF-alb) adduct can be detected in urine, breast milk, serum and tissue of human. Correlation of aflatoxin B_1 exposure with hepatocellular carcinoma (HCC) has been reported. In Thailand, the highest AF exposure was observed in Bangkok residents followed by Ubonrachthani, Chiangmai,

[1] งานอิมมูนวิทยา กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ
[2] กองแผนงาน กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี

Songkla and Nakornratchasima of which the AF levels were between 5-2510 mg AF-equivalent/ml. However, no report on AF-alb adducts in sera of school children has been revealed. Therefore, this study aimed to compare the level of AF-alb adducts in sera of school children from Bangkok and rural area. Sera of school children were collected from six schools : two in Bangkok, two in rural area and the other two in bordered area. The study group comprised 133 boys and 117 girls. Their age ranged from 9 to 16 years, and 125 children resided in Bangkok and the other 125 ones in rural and bordered area. The exposure of AF-alb adducts among the 250 school children was determined. No exposure of the AF-alb adducts was found in one child, but it was found in the other 249 children with levels between 1.2 and 59.0 pg/mg, averaged 18.8 pg/mg. When compared the AF-alb adduct levels between the two study groups, no statistical difference was demonstrated (*P*=0.068). *(Thai Cancer J 2009;29:102-107.)*

บทนำ

ประเทศไทยมีภูมิอากาศร้อนชื้น อาหารและผลผลิตทางเกษตรจึงมีเชื้อราที่สร้างสาร aflatoxin ปะปนอยู่เสมอ เมื่อคนบริโภคอาหารเหล่านี้เข้าไปก็จะได้รับสารพิษ aflatoxin (AF) เข้าไปสะสมอยู่ในร่างกาย ถ้าได้รับสารพิษนี้เป็นประจำติดต่อกันเป็นเวลานานจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ได้ เนื่องจากสาร aflatoxin เมื่อเข้าสู่ร่างกาย บางส่วนจะถูกกระบวนการของร่างกายเปลี่ยนเป็นสาร metabolites ซึ่งชนิดที่มีพิษมากที่สุด คือ AFB_1 เมื่อจับกับ DNA หรือ RNA ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ผิดปกติ ตามรายงานของ International Agency for Research on Cancer (IARC) พบว่า AFB_1 เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งจัดอยู่ใน Group I (carcinogenic to human)[1] และยังมีรายงานพบว่า AFB_1 มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันลดลงอีกด้วย[2]

จากรายงานที่ผ่านมามีการตรวจพบ aflatoxin น้อยกว่า 20 pg/ml ในตัวอย่างเลือดจากประเทศอังกฤษ[3] และยังตรวจพบ aflatoxin นี้ในตัวอย่างเลือดในประเทศไนจีเรีย[4] ซูดาน[5] ญี่ปุ่น[6] และกานา[7] นอกจากนั้นมีการศึกษาระดับของ aflatoxin - albumin (AF-alb) adducts ในคนจากหลายประเทศทั้งในอัฟริกา, เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และยุโรป[8] พบว่าคนในประเทศแกมเบีย เคนยา และในมณฑลกวางสี ของประเทศจีน ได้รับ aflatoxin มากกว่าคนในประเทศไทย แต่ตรวจพบได้น้อยในคนทางทวีปยุโรป[9] และมีรายงานพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ AF-alb adducts ในเลือดจากสายสะดือ และเลือดของแม่คนเดียวกัน (matched maternal venous blood)[10, 11] โดยปริมาณสารพิษที่ได้รับไม่ได้ขึ้นอยู่กับอายุหรือเพศ แต่แปรเปลี่ยนตามฤดูกาล[12]

จากผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ aflatoxin ในประเทศไทย พบว่ามีผู้ได้รับสารพิษนี้เป็นเปอร์เซ็นต์สูงที่สุดในกรุงเทพฯ รองลงมาคืออุบลราชธานี เชียงใหม่ สงขลา และนครราชสีมาตามลำดับ และปริมาณของ AF-alb ที่ตรวจพบในผู้ที่มีค่าสูงอยู่ระหว่าง 50-2510 mg AF equivalent/ml[13] แต่จากการตรวจเนื้อเยื่อตับในคนไทยที่เป็นโรคมะเร็งตับจำนวน 15 ราย ไม่พบ AFB_1- DNA adduct ในเซลล์ของมะเร็งตับดังกล่าว และมีเพียง 1 รายที่พบ mutation ของ *p53* gene ที่ codon 249 ซึ่งแสดงว่าอะฟลาท็อกซินอาจไม่ใช่สาเหตุหลักของโรคมะเร็งตับในคนไทย[14] และมีการศึกษาพบว่า AFB_1 เป็นต้นเหตุของการเกิด mutation ของ *p53* gene ที่ codon 249[15] อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาทางระบาดวิทยากลับพบว่าในหมู่ประชากรที่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูงจะพบความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับสารพิษ AFB_1 และการ

เกิดโรคมะเร็งตับชนิด primary hepatocellular carcinoma[16, 17]

Biological effective dose ของอะฟลาท็อกซินในแต่ละคนสามารถวัดได้จากการตรวจหาปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่ม[18] ซึ่งปริมาณที่วัดได้จะแสดงถึงการได้รับสารพิษอะฟลาท็อกซิน ก่อนวันเจาะเลือด 2-3 เดือน ส่วนการตรวจหา AFB_1-N_7-guanine adducts ในปัสสาวะ จะตรวจพบได้หลังจากได้รับสาร AFB_1 เข้าไปแล้วประมาณ 24-48 ชั่วโมง[19, 20] ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณ AFB_1-alb adducts ในซีรั่มจึงเป็นการศึกษาถึงสภาวะการได้รับสารพิษนี้จากเชื้อราในปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาสารพิษชนิดนี้ในเด็กวัยเรียน ซึ่งเป็นกลุ่มที่จะเป็นกำลังสำคัญของชาติ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ AFB_1-alb adducts ในซีรั่มของกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีภูมิลำเนาต่างกัน เพื่อจะได้ข้อมูลมาเป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันโรคมะเร็งตับในอนาคตต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

เด็กนักเรียนที่ใช้ในการศึกษานี้ มีอายุระหว่าง 9-16 ปี เป็นนักเรียนชาย 133 ราย และนักเรียนหญิง 117 ราย มาจากโรงเรียนในเขตกรุงเทพฯ 2 โรงเรียน ในเขตชนบทและชายแดนอีกแห่งละ 2 โรงเรียน รวมเป็น 6 โรงเรียน ทำการเจาะเลือด 5 ml จากเด็กนักเรียนที่ได้รับความยินยอมจากผู้ปกครองให้เข้าร่วมโครงการนี้ได้ นำเลือดมาปั่นที่ความเร็ว 2500 รอบ/นาที ดูดซีรั่มส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 ml แล้วเก็บไว้ที่ -80°ซ

วิธีตรวจวัดปริมาณ AF–alb adduct

นำซีรั่มแต่ละรายมาสกัด albumin ด้วยสารละลาย saturated ammonium sulphate และ 1 M acetic acid จากนั้นวัดปริมาณ albumin ในแต่ละรายโดยใช้ BioRad assay[18] แล้วนำ 2 mg ของ albumin แต่ละรายมาสกัดเอา AF-alb adduct ออกมาด้วย proteinase K และ bovine serum albumin และทำให้บริสุทธิ์ด้วย column สำเร็จรูป (Sep-pak C 18, USA) แล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Speed vac (Savant, USA) จากนั้นนำไปละลายอีกครั้งด้วย phosphate buffer saline ที่มี 1% fetal calf serum 500 µl แล้วจึงนำสารละลายนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ AF-alb adduct โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[18]

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนทั้งเขตกรุงเทพฯ และเขตชนบท (รวมเขตชายแดน) ได้จากการคำนวณผลโดยมีหน่วยเป็น pg AF-Lysine equivalents per mg of albumin และแสดงผลเป็นร้อยละ แล้วเปรียบเทียบผลการตรวจหาปริมาณ AF-alb adducts ที่ได้ โดยใช้ chi-square test และกำหนดค่า *P* ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

จากการตรวจวัดปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียน จำนวน 250 ราย ตรวจไม่พบ AF-alb 1 ราย อีก 249 ราย ตรวจพบโดยมีค่าระหว่าง 1.2-59.0 pg/mg เฉลี่ย 18.8 pg/mg เมื่อเปรียบเทียบค่า AF-alb adduct ในเด็กนักเรียนที่อยู่ในเขตกรุงเทพฯ 125 ราย และเขตชนบทรวมเขตชายแดนอีก 125 ราย พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (*P*=0.068) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนในเขตกรุงเทพฯ และชนบท

กลุ่มนักเรียน	ปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่ม (pg/mg)					
	< 5.0 n (ร้อยละ)	5-10 n (ร้อยละ)	>10-20 n (ร้อยละ)	>20-30 n (ร้อยละ)	>30 n (ร้อยละ)	รวม
เขตกรุงเทพฯ	4 (3.2)	13 (10.4)	50 (40)	42 (33.6)	16 (12.8)	125
เขตชนบทและชายแดน	7 (5.6)	11 (8.8)	69 (55.2)	24 (19.2)	14 (11.2)	125
รวม	11 (4.4)	24 (9.6)	119 (47.6)	66 (26.4)	30 (12.0)	250

P = 0.068

วิจารณ์และสรุป

จากรายงานในประเทศอัฟริกาตะวันตกพบว่าเด็กทารกอายุ 9 เดือน - 6 ปี หลังการหย่านมมารดาแล้วร้อยละ 99 (475/479) ตรวจพบ AF-alb adducts โดยมีค่าเฉลี่ย 32.8 pg/mg และพบว่าการได้รับสารพิษ aflatoxin จากอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราเป็นระยะเวลานานทำให้การเจริญเติบโตลดลง[21] ในประเทศไทยมีผู้ศึกษาปริมาณสารพิษ aflatoxin พบเปอร์เซ็นต์สูงสุดอยู่ในกรุงเทพฯ รองลงมา คือ อุบลราชธานี เชียงใหม่ สงขลา และนครราชสีมา ตามลำดับ[13] แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาดังกล่าวในเด็กไทย ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงได้ตรวจหาปริมาณ AF-alb adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนจำนวนทั้งหมด 250 ราย พบว่ามีเพียง 1 ราย เท่านั้นที่ตรวจไม่พบ AF-alb adducts ส่วนที่เหลือ 249 ราย (ร้อยละ 99.6) ตรวจพบ AF-alb adducts โดยมีค่าเฉลี่ย 18.8 pg/mg ซึ่งต่ำกว่าที่ตรวจพบในเด็กอัฟริกัน นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบระดับ AF-alb adducts ในเด็กนักเรียนที่อยู่ในเขตกรุงเทพฯ และเขตชนบท พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากปัจจุบันการคมนาคมขนส่งสะดวก ทำให้การนำผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ไปจำหน่ายได้ทั่วถึง ทำให้อาหารและผลผลิตทางการเกษตรที่จำหน่ายในแต่ละเขตมีสภาพใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามการตรวจวัดปริมาณสารพิษดังกล่าวจากซีรั่มเป็นตัวชี้วัดสภาวะของแต่ละบุคคลที่ได้รับสารพิษ aflatoxin ในระยะ 2-3 เดือนก่อนการเจาะเลือดเท่านั้น[22]

โดยสรุปผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า AF-alb adducts ในซีรั่มของเด็กนักเรียนที่อยู่ในเขตกรุงเทพฯและเขตชนบทไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่าเด็กนักเรียนเกือบทั้งหมดในกลุ่มที่นำมาศึกษานี้ได้รับสารพิษ aflatoxin จากอาหารที่บริโภคอยู่เป็นประจำ ดังนั้น การระมัดระวังในการคัดเลือกวัตถุดิบที่จะนำมาปรุงอาหาร จึงต้องปฏิบัติอยู่เสมอและตลอดเวลา เพื่อลดความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2546-2547 ผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof. Dr. Christopher Paul Wild ซึ่งปัจจุบันดำรงตำแหน่ง Director

ของ International Agency for Research on Cancer (IARC) ประเทศฝรั่งเศส ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และอนุเคราะห์สาร antibody และ standard AFB_1 lysine ที่ใช้ในการทำวิจัยนี้ และ ดร. สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ งานพันธุศาสตร์ กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการเขียนรายงานนี้

เอกสารอ้างอิง

1. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Some Naturally Occurring Substances : Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxine. Lyon, France: IARC, 1993;56:245-395.
2. Jiang Y, Jolly PE, Ellis WO, Wang JS, Phillips TD Williams JH. Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. Int Immunol 2005;17:807-14.
3. Wilkinson AP, Denning DW, Morgan MR. Analysis of UK sera for aflatoxin by enzyme-linked immunosorbent assay. Hum Toxicol 1988;7:353-6.
4. Dennig DW, Onwubalili JK, Wilkinson AP, Morgan MR. Measurement of aflatoxin in Nigerian sera by enzyme-linked immunosorbent assay. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988;82:169-71.
5. Hendrickse RG, Coulter JB, Lamplugh SM, MacFarlane SB, Williams TE, Omer MI, et al. Aflatoxin and kwashiorkor : a study in Sudanese children. Br Med J 1982;285:843-6.
6. Tsuboi S, Nakagawa T, Tomita M, Seo T, Ono H, Kawoonra K, et al. Detection of aflatoxin B_1 in serum samples of male Japanese subjects by radioimmunoassay and high performance liquid chromatography. Cancer Res 1984;44:1231-4.
7. Lamplugh SM, Hendrickse RG, Apeagyai F, Mwanmut DD. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. Br Med J 1988;296:968.
8. Wild C P, Jansen L A M, Cova L, Montesano R. Molecular dosimetry of aflatoxin exposure : contribution to understanding the Multifactorial aetiopathogenesis of primary hepatocellular carcinoma (PHC) with particular reference to hepatitis B virus (HBV). Environ Health Perspect 1993;99:115-22.
9. Wild CP, Jiang YZ, Allen SJ, Jansen LA, Hall AJ, Montesano R. Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world. Carcinogenesis 1990;11:2271-4.
10. Wild CP, Rasheed FN, Jawla MF, Hall AJ, Jansen LA, Montesano R. In-utero exposure to aflatoxin in west Africa Lancet 1991;337:1602.
11. Wild CP, Hudson GJ, Sabbioni G, Chapot B, Hall AJ, Wogan GN, et al. Dietary intake of aflatoxin and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in the Gambia, West Africa. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1992;1:229-34.
12. Allen SJ, Wild CP, Wheeler JG, Riley EM, Montesano R, Bennett S, et al. Aflatoxin exposure, malaria and hepatitis B infection in rural Gambian children. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:426-30.
13. ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช และคณะ. ปริมาณอะฟลาทอกซินที่คนไทยได้รับจากการบริโภคอาหารประจำวันและอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งที่ตับ. ว.กรมวิทย์ 2537;36:253-61.
14. Hollstein MC, Wild CP, Bleicher F, Chutimataewin S, Harris CC, Srivatanakul P, et al. p53 Mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand. Int J Cancer 1993;53:51-5.
15. Paget V, Sichel F, Garon D, Lechevrel M. Aflatoxin B1 -induced TP53 mutational pattern in normal human cells using the FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast). Mutat Res 2008;656:55-61.
16. Van Rensburg SJ, Cook-Mozaffari P, Van Schalkwyk DJ, Van Der Watt JJ, Vincent TJ, Purchase IF. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. Br J Cancer 1985;51: 713-26.
17. Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ, Henderson BE. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. Cancer Res 1989;49:2506-9.
18. Wild CP, Jiang YZ, Sabbioni G, Chapot B, Montesano R. Evaluation of methods for quantitations of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. Cancer Res 1990;50:245-51.
19. Groopman JD, Hall AJ, Whittle H, Hudson GJ, Wogan GN, Montesano R, et al. Molecular dosimetry of aflatoxin-N7-guanine in human urine obtained in

Gambia, West Africa. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1992;1:221-7.

20. Groopman JD, Hasler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N7-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/high performance liquid chromatography. Cancer Res 1992;52: 267-74.
21. Gong, YY, Egal S, Hounsa A, Turner PC, Hall AJ, Cardwell KF, et al. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. Int J Epidemiol 2003;32:556-62.
22. Chapot B, Wild CP. ELISA for quantification of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. In : Warhol M, van Velzen D, Bullock GR, editors. Techniques in Diagnostic Pathology. San Diego CA: Academic Press; 1991. p. 135-55.

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม–กันยายน 2552

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับไวรัสตับอักเสบบี อายุและเพศของผู้ที่มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

อารีย์ ประสิทธิพยงค์
อนันต์ กรลักษณ์
วิชุดา ไตรรัตน์อภิชาต
ผ่องพรรณ รมหิรัญ

บทคัดย่อ มะเร็งเซลล์ตับเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทย ปัจจุบันยังไม่มีสารบ่งชี้มะเร็งที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับ มีเพียง Alpha-fetoprotein (AFP) เท่านั้นที่เป็นสารบ่งชี้มะเร็งที่นิยมใช้ในการตรวจติดตามและวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับในประชากรกลุ่มเสี่ยง การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับผลการตรวจไวรัสตับอักเสบบี อายุและเพศของผู้ที่มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ คณะผู้วิจัยได้รวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของผู้มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับรวม 545 ราย (เป็นผู้ที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 330 ราย และผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 215 ราย) และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ (HCC) จำนวน 61 ราย พบระดับ AFP ที่สูงเกิน 20 ng/ml เท่ากับร้อยละ 0.9 และ 62.3 ในผู้ที่ไม่เป็นและเป็นมะเร็งเซลล์ตับตามลำดับ

การศึกษานี้ยังพบว่าร้อยละ 2.3 ของกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับ แต่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีระดับ AFP สูง อายุเฉลี่ยของผู้ที่มีระดับ AFP สูง สูงกว่าผู้ที่มีระดับ AFP ปกติ และพบว่าเพศชายมีระดับ AFP สูงกว่าเพศหญิง สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับไวรัสตับอักเสบบี อายุและเพศ ผลจากการศึกษานี้พบร้อยละ 2.3 ของผู้ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบีมีระดับ AFP ขึ้นสูง ดังนั้นกลุ่มคนเหล่านี้ควรจะได้รับการตรวจติดตามเพื่อตรวจหามะเร็งเซลล์ตับระยะเริ่มแรกต่อไป *(วารสารโรคมะเร็ง 2552;29:108-114.)*

Abstract Correlation between Serum AFP Level and HBsAg, Age and Sex in Subjects of the National Cancer Institute, Thailand

by Aree Prasitthipayong, Anant Karalak, Vichuda Triratapichat, Phongphan Romhirun
Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancer in Thailand. Serum alpha-fetoprotien (AFP) is widely used for HCC screening and has been suggested as a tumor marker for

กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

monitoring and diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) in high-risk population. In this study, we aimed to demonstrate the correlation between serum AFP level and HBsAg, age and sex in HCC and normal subjects of the National Cancer Institute, Thailand. The laboratory data from computerized records of the laboratory information system (LIS) were collected. Two groups of sample comprised 545 non-HCC subjects as control group (215 with viral hepatitis B infection and 330 without viral hepatitis B infection) and 61 patients with HCC. Elevation of serum AFP level (>20 ng/ml) was detected in 0.9% in controls and 62.3% in HCC patients. In addition, high serum AFP levels were found in 2.3% of controls who were infected with hepatitis B virus. Mean age was higher in controls who had high serum AFP levels, and male had higher serum AFP level than female. In HCC patients, no correlation of serum AFP level with HBsAg with age and sex was found. From our findings, 2.3% of the HBsAg carriers had elevation of AFP level, therefore, these carriers should be further investigated for early detection of HCC. *(Thai Cancer J 2009;29:108-114.)*

บทนำ

Alpha-fetoprotein (AFP) เป็น glycoprotein สร้างจาก yolk sac ตับ และทางเดินอาหารของทารกในครรภ์ โดยระดับของ AFP จะเพิ่มสูงสุดระหว่างสัปดาห์ที่ 12 และ 16 แล้วค่อยๆ ลดลงจนถึงคลอด หลังคลอดระดับ AFP จะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งทารกอายุได้ 1 ปี ระดับของ AFP จึงเท่ากับระดับปกติในผู้ใหญ่ ระดับของ AFP ที่สูงขึ้นในซีรั่มของผู้ใหญ่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้มะเร็ง (tumor marker) ที่สำคัญในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) นอกจากนี้ยังใช้ในการติดตามการตอบสนองต่อการรักษา และอาจใช้ในการวินิจฉัยมะเร็งของเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell tumor) ได้[1-3] ปัจจุบัน AFP เป็นสารบ่งชี้มะเร็งที่เป็นที่ยอมรับและใช้ประโยชน์ในการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรคมะเร็งเซลล์ตับในประชากรกลุ่มเสี่ยง โดยทำการตรวจร่วมกับการตรวจด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound, US) ทุก 3-6 เดือน[4] การตรวจหาระดับ AFP ในซีรั่มสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย ได้ผลเร็ว ผู้ป่วยไม่ต้องเตรียมตัวเป็นพิเศษ แต่ข้อจำกัดของ AFP คืออาจพบระดับ AFP ปกติในระยะแรกของมะเร็งเซลล์ตับ และพบระดับ AFP สูงกว่าปกติได้ในภาวะอื่นๆ ที่ไม่ใช่มะเร็ง เช่น ตับอักเสบเรื้อรัง ไวรัสตับอักเสบ ตับแข็ง โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ใช่มะเร็งตับระดับ AFP จะสูงขึ้นแบบไม่คงที่และมีค่าสูงกว่าปกติเล็กน้อยเท่านั้น[5]

มะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญ ทั่วโลกพบว่าสูงเป็นอันดับ 5 ในเพศชาย และอันดับ 8 ในเพศหญิง โดยแต่ละปีพบผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นชายจำนวน 442,119 ราย และเป็นหญิงจำนวน 184,043 ราย ซึ่งร้อยละ 80 ของมะเร็งตับที่พบเป็นชนิดเซลล์ตับ (HCC)[6,7] มะเร็งเซลล์ตับพบมากในประเทศแถบเอเชียและมีปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญคือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) และไวรัสตับอักเสบซี (HCV)[8,9]

สำหรับมะเร็งตับในประเทศไทยมีอุบัติการณ์เกิดสูงโดยพบมากเป็นอันดับแรกในเพศชายและอันดับสามในเพศหญิง[10,11] และพบภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรไทยค่อนข้างสูง การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับผลการตรวจไวรัสตับอักเสบบี อายุ และเพศของผู้ที่มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติในช่วงปี พ.ศ.

2549-2551 โดยมีผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยาและพยาธิวิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา ซึ่งประกอบด้วยผลการตรวจ AFP และ HBsAg จากงานอิมมูโนวิทยา ผลการตรวจทางจุลพยาธิจากงานพยาธิวิทยา คณะผู้วิจัยได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับจำนวน 545 ราย ซึ่งได้แก่ผู้ที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg ให้ผลลบ) จำนวน 330 ราย และผู้ที่พบภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg ให้ผลบวก) จำนวน 215 ราย และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ (HCC) อีกจำนวน 61 ราย

การตรวจหาระดับ AFP

การตรวจหาระดับ AFP ในซีรั่มใช้หลักการ electrochemiluminescence immunoassay (sandwich immunoassay, ECLIA) (Roche Diagnostics, สวิสเซอร์แลนด์) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในเอกสารที่แนบมากับชุดน้ำยาของบริษัท ในการศึกษานี้ใช้ระดับ AFP ที่ 20 ng/ml เป็นค่า cutoff[12]

การตรวจหาแอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B surface antigen, HBsAg)

การทดสอบหา HBsAg ในซีรั่มใช้หลักการ microparticle enzyme immunoassay (MEIA) (Abbott Laboratories, สหรัฐอเมริกา) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในเอกสารที่แนบมากับชุดน้ำยาของบริษัท

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษานี้ผู้วิจัยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการบันทึกข้อมูลและคำนวณทางสถิติ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD), พิสัย (range) ; ใช้ chi-square หรือ Fisher's exact test เพื่อวิเคราะห์ดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับผลการตรวจไวรัสตับอักเสบบีและเพศ และใช้ student's t-test วิเคราะห์ดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับอายุในผู้ที่มารับบริการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยกำหนดค่า *P* ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับไวรัสตับอักเสบบี

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวน	ระดับ AFP ≤ 20 ng/ml จำนวน (ร้อยละ)	ระดับ AFP >20 ng/ml จำนวน (ร้อยละ)	ค่า *P*
ผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับ				
HBsAg ลบ	330	330 (100)	0 (0)	0.009
HBsAg บวก	215	210 (97.7)	5 (2.3)	
รวม	545	540 (99.1)	5 (0.9)	
ผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ				
HBsAg ลบ	29	11 (37.9)	18 (62.1)	1.000
HBsAg บวก	32	12 (37.5)	20 (62.5)	
รวม	61	23 (37.7)	38 (62.3)	

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับอายุและเพศ

	ผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับ (n=545)			**ผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ** (n=61)		
	ระดับ AFP		**ค่า *P***	**ระดับ AFP**		**ค่า *P***
	≤20 ng/ml	>20 ng/ml		≤20 ng/ml	>20 ng/ml	
อายุ (ปี)						
mean+SD	48.2± 11.1	52.0± 11.1	0.000	53.5± 8.8	56.0± 13.3	0.844
range	17-85	39-62		34-73	27-94	
เพศ						
ชาย	134 (97.1%)	4 (2.9%)	0.017	18 (34.6%)	34 (65.4%)	0.278
หญิง	406 (99.8%)	1 (0.2%)		5 (55.6%)	4(44.4%)	
อัตราส่วน (ชาย:หญิง)	0.33:1	4.0:1		3.6:1	8.5:1	

ผลการศึกษา

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับผลการตรวจไวรัสตับอักเสบบี

จากการศึกษานี้พบว่าในกลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับตรวจพบระดับ AFP ในซีรั่มสูง (>20 ng/ml) ในผู้ที่มี HBsAg บวก จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.3 แต่ไม่พบ AFP สูงในผู้ที่มี HBsAg ลบโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*=0.009) ส่วนกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับไม่พบความแตกต่างกันของระดับ AFP ระหว่างกลุ่มผู้ที่มีการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (*P*=1.000) ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับอายุและเพศ

กลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับจำนวน 545 ราย มีอายุเฉลี่ยของผู้ที่มีระดับ AFP ≤ 20 ng/ml ต่ำกว่าผู้ที่มี AFP>20 ng/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (48.2 และ 52.0 ปี ตามลำดับ, *P*= 0.000) และในเพศชายพบผู้ที่มี AFP>20 ng/ml (ร้อยละ 2.9) สูงกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 0.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*=0.017) สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับจำนวน 61 ราย ไม่พบความแตกต่างของอายุและเพศระหว่างกลุ่มผู้ที่มีระดับ AFP ≤20 ng/ml และ >20 ng/ml (*P*=0.844 และ 0.278 ตามลำดับ) (ตารางที่ 2)

วิจารณ์และสรุป

ในประเทศไทยมีรายงานพบประชากรที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบีถึงร้อยละ 6-10 หรือประมาณ 6 ล้านคน[11] มีการศึกษาพบว่าในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูง ผู้ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบีมีโอกาสเกิดมะเร็งตับมากกว่าผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อถึง 100 เท่า[13] การศึกษาครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับที่มารับบริการที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมด้วย

จำนวน 32 รายจากผู้ป่วยจำนวน 61 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.5 ในขณะที่การศึกษาของโรงพยาบาลศิริราชช่วงปี พ.ศ. 2537-2538 พบผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมด้วยร้อยละ 62.5[14]

Alpha-fetoprotein (AFP) เป็นสารบ่งชี้มะเร็งที่สำคัญในการใช้ตรวจคัดกรอง และวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับในประชากรกลุ่มเสี่ยง ซึ่งพบว่าร้อยละ 70-90 ของผู้ป่วยมะเร็งตับมีระดับ AFP สูงกว่าปกติ [15] ในการศึกษานี้พบผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับที่มีระดับ AFP สูง (>20 ng/ml) ร้อยละ 62.3 ส่วนในผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับพบระดับ AFP สูงเพียงร้อยละ 0.9 เท่านั้น และมีอัตราส่วนของเพศชายต่อเพศหญิงในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ 5.8:1 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในผู้ป่วยชาวอินเดีย พบผู้ที่มีระดับ AFP>20 ng/ml ร้อยละ 45.4 และมีอัตราส่วนของเพศชายต่อเพศหญิง 6.4:1[16]

การศึกษาครั้งนี้พบว่าในผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับแต่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีระดับ AFP สูงกว่าผู้ที่ไม่ได้รับเชื้อซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่นที่ผ่านมา[1,12,17] ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับไม่พบความแตกต่างของระดับ AFP ระหว่างผู้ที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราช[14] ผู้ป่วยชาวเกาหลี[18] และผู้ป่วยชาวตะวันตก[19] แต่ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่ให้ผลต่างจากการศึกษาครั้งนี้คือพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP กับไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ[1,16,20]

นอกจากไวรัสตับอักเสบบีแล้ว ยังพบว่าในผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับระดับ AFP มีความสัมพันธ์กับอายุและเพศ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chen[12] และ Liaw[21] ซึ่งพบว่าระดับ AFP ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุและเพศ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาที่พบว่าระดับ AFP ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุแต่มีความสัมพันธ์กับเพศ[1] ส่วนการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับอายุและเพศเช่นเดียวกับรายงานการศึกษาในผู้ป่วยชาวยุโรป[1] อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้อาจมีข้อจำกัดเกี่ยวกับจำนวนผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับซึ่งมีเพียง 61 ราย และอาจมีผลต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP กับปัจจัยต่างๆของผู้ป่วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ของผู้ป่วยที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา และอาจมีผลต่อระดับ AFP ได้ซึ่งได้แก่ ระยะความรุนแรงของโรค ขนาดของก้อนเนื้อมะเร็ง พยาธิสภาพอื่นๆ สารเคมีและพฤติกรรมการบริโภคของผู้ป่วย เป็นต้น

ปัจจุบัน แม้ว่า AFP จะไม่สามารถใช้ตรวจคัดกรองมะเร็งเซลล์ตับได้ครบทุกราย แต่ก็ยังไม่พบสารบ่งชี้มะเร็งตัวใดที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับที่นำมาแทนที่ AFP ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้ได้สารบ่งชี้มะเร็งที่จำเพาะและมีความไวสูงขึ้น การป้องกันสาเหตุและหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงต่างๆ จึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันและลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งตับในประเทศไทย โดยเฉพาะการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งในอนาคตเป็นที่คาดหวังว่าอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งตับในประเทศไทยน่าจะลดลงเนื่องจากประเทศไทยได้มีโครงการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีแก่เด็กแรกเกิดทุกราย และจากการสำรวจของคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2549 ซึ่งเป็นเวลา 12 ปีหลังจากมีโครงการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีแก่เด็กแรกเกิด พบว่าสามารถลดภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีลงได้ โดยพบพาหะของไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มเด็กอายุต่ำกว่า 18 ปีที่ได้รับและไม่ได้รับวัคซีนเท่ากับร้อยละ 0.98 และ 1.36 ตามลำดับ [22] นอกจากนี้การตรวจคัดกรองไวรัสตับอักเสบบีและซีในโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตทุกยูนิตก่อนให้ผู้ป่วยก็เป็นวิธีป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบในผู้รับโลหิตอีกวิธีหนึ่ง

สรุปผลการศึกษานี้พบว่าร้อยละ 2.3 ของกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งเซลล์ตับ แต่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีระดับ AFP สูง อายุเฉลี่ยของผู้ที่มีระดับ AFP สูง สูงกว่าผู้ที่มีระดับ AFP ปกติ และพบว่าเพศชายมีระดับ AFP สูงกว่าในเพศหญิง สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AFP ในซีรั่มกับไวรัสตับอักเสบบี อายุและเพศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ งานพันธุศาสตร์ กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาและเขียนงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Trichopoulos D, Sizaret P, Tabor E, Gerety RJ, Martel N, Munoz N, et al. Alphafetoprotein levels of liver cancer patients and controls in a European population. Cancer 1980;46:736-740.
2. Adrian M, Di Bisceglie, Hoofnagle Jay H. Elevations in serum alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis B. Cancer 1989;64:2117-120.
3. Fateh-Moghadam A, Stieber P. การเลือกตรวจ Tumour markers อย่างเหมาะสม. Editions Roche, Basel, Switzerland. บริษัทโรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด
4. ชุติมา ประมูลสินทรัพย์. แนวทางการตรวจวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับของประเทศไทย. ใน: อาคม ชัยวีระวัฒนะ, อาคม เชี่ยรศิลป์, เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน, ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ, บรรณาธิการ. แนวทางการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2549. หน้า 9-12.
5. Tumor Markers. Avialable at:http://www.cancer.gov/. Accessed April 20, 2003.
6. Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis 2005; 9:191-211.
7. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer care No.5, Version 2 Lyon; France:IARC Press.
8. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. Asian Pac J Cancer Prev 2004;5:118-25.
9. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. N Eng J Med 2001;345:41-52.
10. Khuhaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, Attasara P, editors. Cancer in Thailand. Vol IV, 1998-2000. Bangkok; 2007.
11. Srivatanakul P. Epidemiology of liver cancer in Thailand. Asian Pac J Cancer Prev 2001;2:117-121.
12. Chen DS, Sung JL. Relationship of hepatitis B surface antigen to serum alpha-fetoprotien in nonmalignant diseases of the liver. Cancer 1979;44: 984-92.
13. Novel insights to the hepatitis B virus. Available at:http://www.ucd.ie/t4cms/conwayfocus_apr09.pdf. Accessed June 16, 2007.
14. Songsivilai S, Dharakul T, Senawong S. Hepatitis B and hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma: evaluation of alpha-fetoprotein as a diagnostic marker. Asian Pac J Allergy Immunol 1995;13:167-71.
15. Ramsey WH, Wu GY. Hepatocellular carcinoma: update on diagnosis and treatment. Dig-Dis 1995;13, 2:81-91.
16. G Murugavel KG, Mathews S, Jayanthi V, Shankar EM, Hari R, Surendran R, et al. Alpha-fetoprotein as a tumor marker in hepatocellular carcinoma: investigations in south Indian subjects with hepatotropic virus and aflatoxin etiologies. Int J Infect Dis 2008; 12:71-76.
17. Kitau MJ, Grint PCA, Heath RB, Chard T. Serum alphafetoprotein levels in subjects infected with hepatitis B virus. J Med Virol 1988;28:437-42.
18. Lee HS, Chung YH, Kim CY. Specificities of serum α-fetoprotien in HBsAg+ and HBsAg-patients in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Hepatology 1991;14:68-72
19. Cedrone A, Covino M, Caturelli E, Pompili M, Lorenzelli G, Villani MR, et al. Utility of alpha-fetoprotein (AFP) in the screening of patients with virus related chronic liver disease: does different viral etiology influence AFP levels in HCC? A study in 350 western patients. Hepatogastroenterology 2000;47:1654-8.

20. Xuan SY, Xin YN, Chen H, Shi GJ, Guan HS, Li Y. Significance of hepatitis B virus surface antigen, hepatitis C virus expression in hepatocellular carcinoma and pericarcinomatous tissues. World J Gastroenterol 2007;13:1870-4.
21. Liaw YF, Tai DI, Chen TJ, CHU CM, Huan MJ. Alpha-fetoprotien changes in the course of chronic hepatitis: relation to bridging hepatic necrosis and hepatocellular carcinoma. Liver 1986;6:133-7.
22. Chongsrisawat V, Yoocharoen P, Theamboonlers A, Tharmaphornpilas P, Warinsatien P, Sinlaparatsamee S, et al. Hepatitis B seroprevalence in Thailand: 12 years after hepatitis B vaccine integration into the national expanded programme on immunization. Trop Med Int Health 2006;11:1496-502.

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม–กันยายน 2552

ความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* Gene Polymorphism กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

ดนัย ทิวาเวช[1]
สมจินต์ จินดาวิจักษณ์[2]
สุดจิตร ทองนุ่น[3]
Takafumi Ishida[4]

บทคัดย่อ โรคมะเร็งช่องปากเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของประเทศไทยโดยเฉพาะในทางภาคใต้ซึ่งรวมถึงจังหวัดสุราษฎร์ธานี และมีแนวโน้มที่จะพบผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้นทุกปี อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกนั้นรักษาให้หายได้ การตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกให้พบตั้งแต่ยังไม่มีอาการจึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญรีบด่วน มีรายงานว่า *GSTM1* gene *(GSTM1)* ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอ็นซัยม์ทำลายพิษของสารก่อมะเร็งนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) และมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* polymorphisms กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในประชากรของจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยการตรวจหาความถี่ของ *GSTM1* genotypes [*GSTM1* normal *(GSTM1+)* และ *GSTM1* null genotype *(GSTM1-)*] จาก DNA ที่สกัดได้จากเม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก 200 ราย และกลุ่มคนปกติ 200 ราย ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ผลของการตรวจหา *GSTM1* polymorphism พบว่าโดยภาพรวมความถี่ของ *GSTM1* genotypes ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากกับกลุ่มคนปกติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) และพบว่าผู้ที่มี *GSTM1-* มีอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งช่องปากเพิ่มขึ้น 1.95 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มี *GSTM1+* [Odds ratio (OR) = 1.95, 95% confidence interval = 1.31-2.90] นอกจากนี้ยังพบว่า *GSTM1* polymorphism มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในผู้ที่สูบบุหรี่ ดื่มแอลกอฮอล์ และเคี้ยวหมากอีกด้วย โดยสรุปผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *GSTM1* polymorphism มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก และ*GSTM1-* เป็นปัจจัยเพิ่มความเสี่ยงของโรคมะเร็งช่องปาก ดังนั้น การตรวจหา *GSTM1* polymorphism จึงน่าจะใช้ช่วยตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงและนำไปสู่การวินิจฉัยโรคมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกในประชากรของจังหวัดสุราษฎร์ธานีได้ *(วารสารโรคมะเร็ง 2552;29:115-125.)*

[1] กลุ่มงานวิจัย และ [2]กลุ่มงานโสต ศอ นาสิก สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ 10400
[3] ศูนย์มะเร็งจังหวัดสุราษฎร์ธานี กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100
[4] Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Abstract Association between *GSTM1* Gene Polymorphism and Oral Cavity Cancer in Suratthani Province

by Danai Tiwawech[1], Somjin Chindavijak[2], Sudjit Tongnun[3] and Takafumi Ishida[4]

[1]Research, and [2]Otolaryngology Divisions, National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand.

[3]Suratthani Cancer Center, Suratthani province 84000, Thailand

[4]Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Oral cavity cancer (OCC) is a serious malignant disease in Thailand, particularly in the South, including Suratthani province, with a trend to increase in the number of its death yearly. However, patients with early stages of OCC are treatable. Hence, a mass screening for early stages of OCC patients without cancer-related symptoms is urgent. *GSTM1* gene *(GSTM1)* that produced enzyme for detoxification of carcinogens has been reported to be polymorphic and associated with the risk of several cancer developments. The purpose of this study is to investigate the association between *GSTM1* polymorphisms and the risk of OCC development in Suratthani province population. The frequency of *GSTM1* genotypes [*GSTM1* normal *(GSTM1+)* and *GSTM1* null genotype *(GSTM1-)*] was detected in DNA extracted from peripheral white blood cells of 200 cases of OCC patients and 200 healthy controls using the polymerase chain reaction (PCR) assay. Overall, the frequency of *GSTM1* genotypes between OCC and healthy control groups was significantly different ($P<0.001$). Individuals with *GSTM1-* had increased risk about 1.95-fold for OCC development as compared with those *GSTM1+* [Odds ratio (OR) = 1.95, 95% confidence interval = 1.31-2.90]. In addition, *GSTM1* polymorphism was found to be associated with an increased risk of OCC development in cigarette smokers, alcohol drinkers, and betel-nut chewers. In conclusion, the findings of this study suggest that *GSTM1* polymorphism is associated with the risk of OCC development and the *GSTM1-* is the key factor for increasing the risk of OCC. Therefore, the detection of *GSTM1* polymorphism is a useful tool in screening for the high-risk group that may be lead to identification of early stages of OCC in population who reside in Suratthani province. *(Thai Cancer J 2009;29:115-125.)*

Keywords: *GSTM1* gene, polymorphism, oral cavity cancer, Suratthani province, PCR

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจและทำลายชีวิตประชากรโลกไปปีละมากมายรวมทั้งในประเทศไทย จากสถิติสาธารณสุขของประเทศไทยปี พ.ศ. 2550 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 1 ของสาเหตุการตายทั่วประเทศโดยในปี พ.ศ. 2546 และ 2550 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง 49,682 และ 523,434 รายตามลำดับ และอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งนี้ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีอีกด้วย[1] สำหรับโรคมะเร็งช่องปากและหลอดอาหาร (cancer of oral cavity and pharynx) มีรายงานว่าตรวจพบในชายไทยสูงเป็นอันดับที่ 4 โดยมีอัตราเกิดประมาณ 6.8 รายต่อแสนประชากร[2] และพบว่าอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งช่องปากนั้นพบได้มากที่สุดในภาคใต้ของประเทศโดยเฉพาะในจังหวัดสงขลา[3] รวมทั้งในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ดังนั้นโรคมะเร็งช่องปากจึงนับได้ว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญซึ่งควรที่จะทำการควบคุมอย่างจริงจัง

จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติปี พ.ศ. 2550 พบว่าโรคมะเร็งช่องปากเป็นโรคที่พบได้บ่อยและโรคนี้เป็นสาเหตุของการตายที่ค่อนข้างสูงโรค

หนึ่ง[4] เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยมะเร็งช่องปากที่ตรวจพบในสถาบันมะเร็งแห่งชาตินั้น ส่วนใหญ่เป็นโรคในระยะสุดท้าย ซึ่งมีการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาไม่ดี ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักเสียชีวิตภายในหนึ่งปีหลังจากตรวจพบมะเร็ง อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมะเร็งช่องปากในระยะเริ่มแรกนั้นสามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการตรวจหาผู้ป่วยมะเร็งช่องปากให้พบโดยเร็วตั้งแต่เป็นโรคในระยะเริ่มแรกในกลุ่มคนไทยที่มีความเสี่ยงสูงของโรคมะเร็งช่องปากโดยอาศัยตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) แล้วติดตามตรวจหาโรคมะเร็งช่องปากในระยะเริ่มแรกในกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงเหล่านี้อย่างละเอียดอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้การตรวจหา specific tumor marker ร่วมกับการตรวจทางด้านรังสีวินิจฉัย และการตรวจทาง physical examination ทุกๆ 4 เดือน จึงเป็นเรื่องจำเป็นเร่งด่วนในการป้องกันและควบคุมโรคร้ายนี้ในอนาคต

ในปัจจุบันความเจริญก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีของอณูชีววิทยา (molecular biology) ทำให้ทราบว่าในมนุษย์นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ซึ่งมีผลทำให้แต่ละบุคคลมีความไวในการเกิดโรคมะเร็งได้ไม่เท่ากัน[5] เช่น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของ gene ที่ทำหน้าที่ต้านการเกิดโรคมะเร็ง (*p53* tumor suppressor gene) การเผาผลาญ (metabolism) และการทำลายพิษ (detoxification) ของสารก่อมะเร็งชนิดต่างๆ และการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายไปได้ไม่เหมือนกันซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค้นพบเหล่านี้พบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ในการทำนายและการค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งนำไปสู่การตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งระยะเริ่มแรกได้หลายชนิด เช่น โรคมะเร็งปอด[6] กระเพาะอาหาร[7] ลำไส้ใหญ่[8] โพรงหลังจมูก[9] กระเพาะปัสสาวะ[10] เต้านม[11] และตับ[12] เป็นต้น

เนื่องจากมีหลักฐานทางระบาดวิทยาพบว่าการได้รับสารก่อมะเร็งไนโตรซามีนและสาร polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) จากควันบุหรี่และการเคี้ยวหมาก รวมทั้งการดื่มแอลกอฮอล์เป็นปัจจัยสำคัญทำให้เกิดโรคมะเร็งช่องปากในคน[13-19] และพบว่า *GSTM1* polymorphism มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดได้แก่ โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่[8] โพรงหลังจมูก[9] เต้านม[11] ตับ[12] ปอด[20] กระเพาะปัสสาวะ[21] ผิวหนัง[22] ช่องปาก[23] กระเพาะอาหาร[24] ต่อมลูกหมาก[25] รังไข่[26] และปากมดลูก[27] ซึ่งมีสาเหตุมาจากสารก่อมะเร็งดังกล่าว จึงเป็นไปได้ว่า *GSTM1* polymorphism นี้น่าจะมีบทบาทในการทำให้เกิดโรคมะเร็งช่องปากในคนไทยได้ ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* polymorphism กับการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก โดยใช้วิธี PCR จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะได้พิจารณานำการตรวจหา *GSTM1* polymorphism นี้ไปใช้ประโยชน์ในการทำนายและติดตามค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงของโรคมะเร็งช่องปากซึ่งจะกลายเป็นผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกในอนาคต

จากสถิติและทะเบียนมะเร็งระดับประชากรของจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบว่าอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องปากและคอมีค่าค่อนข้างสูงโดยตรวจพบในเพศชาย และหญิงมีค่าประมาณ 9.6 และ 4.8 รายต่อแสนประชากรตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิดของโรคมะเร็งดังกล่าวนี้มีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น (หน่วยทะเบียนมะเร็ง ศูนย์มะเร็งสุราษฎร์ธานี, 2546) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* polymorphism กับโรคมะเร็งช่องปากในประชากรของจังหวัด

สุราษฎร์ธานีขึ้นโดยใช้วิธี PCR และคาดว่าจะใช้องค์ความรู้ที่ได้รับนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาหาวิธีควบคุม และป้องกันโรคมะเร็งช่องปากอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดขาว

เจาะเลือดของผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก (stage I-II จำนวน 13 ราย และ stage III-IV จำนวน 187 ราย ซึ่งมี histological types เป็น squamous cell carcinoma 185 ราย และ adenocarcinoma 15 ราย) ที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีอายุตั้งแต่ 30-80 ปี ซึ่งเข้ารับการตรวจรักษาที่ศูนย์มะเร็งสุราษฎร์ธานี และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 200 ราย ๆ ละ 7 มิลลิลิตร ใส่ใน EDTA tube (EDTA blood 7 ml) จากนั้นนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดขาวที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 20 นาที และเก็บเม็ดเลือดขาวที่ได้ทั้งหมดไว้ที่ -40°ซ จนกว่าจะนำไปใช้ ในขณะเดียวกันทำการเก็บเม็ดเลือดขาวจากกลุ่มคนปกติที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี และมีอายุใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก ซึ่งมารับการตรวจร่างกายประจำปีที่ศูนย์มะเร็งสุราษฎร์ธานี และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 200 ราย เพื่อใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

การสกัด DNA

นำเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากทุกรายมาสกัด DNA ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QuickGene DNA whole blood kit S และใช้เครื่องสกัดรุ่น QuickGene-810 (FUJIFILM Corporation, Japan) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำที่มากับชุดน้ำยา ซึ่ง DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 ng/μl จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้ไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°ซ จนกว่าจะนำไปใช้

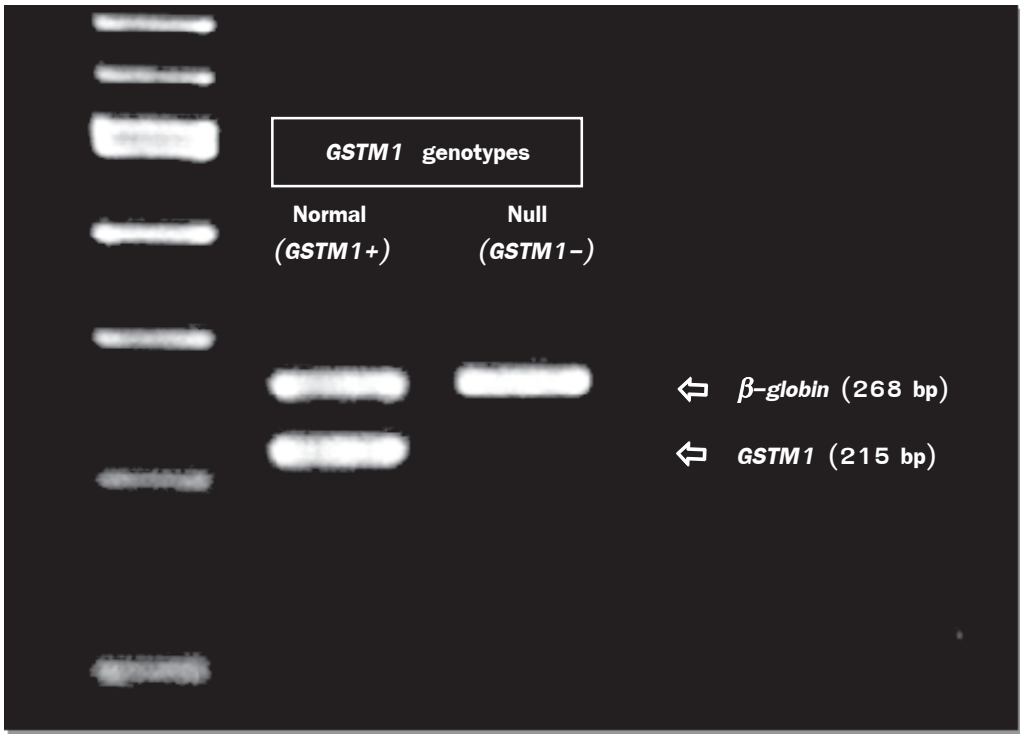
การตรวจหา *GSTM1* polymorphism ด้วย วิธี PCR

ในการตรวจใช้ primers 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 สำหรับตรวจหา *GSTM1*: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' และ 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3' ส่วนชุดที่ 2 สำหรับตรวจหา human β-globin: 5'-AAC TTC ATC CAC GTT CAC C-3' และ 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3' โดยมีขั้นตอนในการตรวจดังนี้คือ นำ PCR reaction mixture 50 μl [36.7 μl ของ double distilled water + 5 μl ของ PCR buffer ที่มี $MgCl_2$ + 5 μl ของ dNTP + 1 μl ของ 20 pmole ของแต่ละ primer + 0.3 μl ของ Taq DNA polymerase + 1 μl ของ DNA template] ไป incubated ที่ 94°ซ นาน 5 นาที ก่อนการทำ PCR จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA โดยการทำ PCR ดังนี้คือ 94°ซ นาน 10 วินาที, 58°ซ นาน 20 วินาที และ 72°ซ นาน 45 วินาทีเป็นจำนวน 40 รอบแล้วตามด้วย 72°ซ นาน 5 นาที PCR product ของ *GSTM1* ที่ได้จะมีขนาด 215 base pair ใน 2.5% agarose gel electrophoresis เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ human β-globin เป็น DNA-positive control (PCR product มีขนาด 268 base pair) และใช้ double distilled water เป็น DNA-negative control (รูปที่ 1 และ 2)

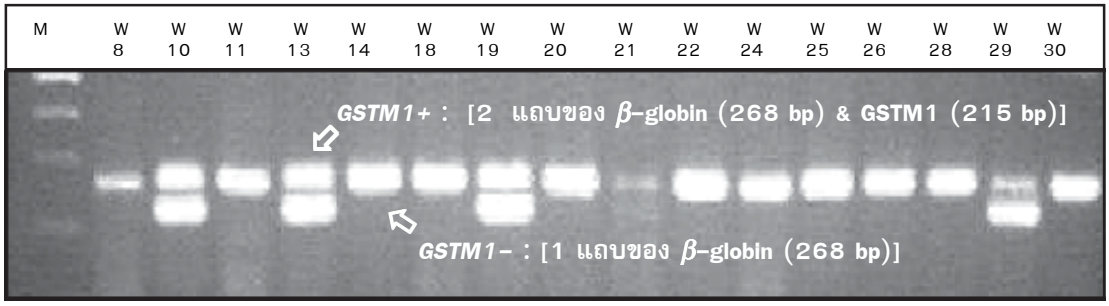
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป EpiCalc2000 (http://www.myatt.demon.co.uk/epicalc.htm) โดยการคำนวณหาค่า Chi-square และค่า *P* เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์

ระหว่างลักษณะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากกับกลุ่มคนปกติ (กำหนดให้ข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P <0.05) พร้อมทั้งประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งด้วยการคำนวณหาค่า odds ratio (OR) และค่า 95% confidence interval (CI) โดยใช้ logistic regression



รูปที่ 1 PCR products ของ *GSTM1* polymorphism หลังจากผ่านขั้นตอนการทำ agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide จะมีขนาด 215 base pair (bp) ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ human β-*globin* เป็น DNA-positive control (PCR product มีขนาด 268 bp) และใช้ double distilled water เป็น DNA-negative control



รูปที่ 2 การวิเคราะห์ผลของ *GSTM1* polymorphism ที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก 16 ราย (W8-W30) ในการทำ PCR product และผานการทำ electrophoresis บน 2.5% agarose gel ตามด้วยการย้อมด้วย ethidium bromide. M = 100 bp size marker, W 10, 13, 19 และ 29 = *GSTM1*+, W 8, 11, 14, 18, 20-22, 24-26, 28 และ 30 = *GSTM1*-

ผลการศึกษา

ในการศึกษานี้มีกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากจำนวน 200 ราย เป็นชาย 100 ราย หญิง 100 ราย และมีอายุเฉลี่ย 68.1 ปี (ค่า SD=9.6) สำหรับกลุ่มคนปกตินั้นมีจำนวน 200 ราย เป็นชาย 100 ราย หญิง 100 ราย และมีอายุเฉลี่ย 67.6 ปี (ค่า SD=10.3) โดยพบว่าทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างในด้าน อายุ การนับถือศาสนา การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และการเคี้ยวหมาก (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ *GSTM1* polymorphism กับการเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากกับกลุ่มคนปกติพบว่าโดยรวมผู้ที่มี *GSTM1*- เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งช่องปากสูงกว่าผู้ที่มี *GSTM1*+ ประมาณ 2 เท่า (OR = 1.95, 95%CI = 1.31-2.90) และเมื่อแยกวิเคราะห์ตามพฤติกรรมเสี่ยงพบว่า *GSTM1* genotype ชนิด *GSTM1*- มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในผู้ที่มีพฤติกรรมการสูบบุหรี่ (OR = 2.80, 95%CI = 1.63-4.80) การดื่มแอลกอฮอล์ (OR = 3.03, 95%CI = 1.73-5.28) และการเคี้ยวหมาก (OR = 2.35, 95%CI = 1.35-4.07) ในทางตรงกันข้ามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* polymorphism กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในผู้ที่ไม่มีพฤติกรรมเสี่ยงดังกล่าว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากและกลุ่มคนปกติ

	มะเร็งช่องปาก (n=200)	**คนปกติ** (n=200)	*P* value
อายุ			0.616
Mean	68.1	67.6	
SD	9.6	10.3	
ศาสนา			0.317
พุทธ	199	200	
อิสลาม	1	0	
การสูบบุหรี่			0.131
สูบ	120	105	
ไม่สูบ	80	95	
การดื่มแอลกอฮอล์			0.228
ดื่ม	113	101	
ไม่ดื่ม	87	99	
การเคี้ยวหมาก			0.385
เคี้ยว	111	102	
ไม่เคี้ยว	89	98	

SD = standard deviation

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* polymorphism กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากโดยรวมและแยกตามพฤติกรรมที่เสี่ยงตอการเกิดมะเร็งช่องปาก

	มะเร็งช่องปาก		คนปกติ		OR (95%CI)
	GSTM1+	*GSTM1-*	*GSTM1+*	*GSTM1-*	
โดยรวม	83	117	116	84	1.95 (1.31-2.90)
การสูบบุหรี่					
สูบ	43	77	64	41	2.80 (1.63-4.80)
ไม่สูบ	40	40	52	43	1.21 (0.67-2.19)
การดื่มแอลกอฮอล์					
ดื่ม	40	73	63	38	3.03 (1.73-5.28)
ไม่ดื่ม	43	44	53	46	1.18 (0.66-2.10)
การเคี้ยวหมาก					
เคี้ยว	42	69	60	42	2.35 (1.35-4.07)
ไม่เคี้ยว	41	48	56	42	1.56 (0.88-2.78)

วิจารณ์และสรุป

จากความเจริญก้าวหน้าทางด้าน molecular epidemiology ทำให้ทราบว่ามนุษย์มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และสามารถนำคุณสมบัติดังกล่าว ไปประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ในการทำนายและค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็ง เพื่อให้ตรวจพบโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกได้มากขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในคนไทยทางภาคใต้นั้น มีสาเหตุมาจากการได้รับสารก่อมะเร็งไนโตรซามีน และสาร PAHs จากควันบุหรี่และการเคี้ยวหมาก รวมทั้งการดื่มแอลกอฮอล์โดยไม่ทราบถึงกลไกในการทำให้เกิดโรคมะเร็งช่องปากที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าสารก่อมะเร็งเหล่านี้น่าจะเป็นตัว initiator ทำให้เกิด DNA adducts ขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ในช่องปากทำให้เซลล์ดังกล่าวมี DNA ที่ผิดปกติ ในขณะเดียวกัน human papilloma virus (HPV) อาจจะทำหน้าที่เป็นตัว promotor กระตุ้นให้เซลล์ที่ DNA ผิดปกติเหล่านั้นแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งกลายเป็นมะเร็งในที่สุด[13-19, 28-30]

โดยทั่วไปสารก่อมะเร็งจะเป็น pro-carcinogens ซึ่งต้องถูกกระตุ้นโดย Phase I enzymes [cytochrome 450 (CYP 450) super gene family] ให้กลายเป็น ultimate carcinogen ซึ่งสามารถจับกับ DNA (DNA adducts) ในนิวเคลียสของเซลล์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutations) บนยีนใน DNA และกระตุ้นให้เกิดโรคมะเร็ง (initiating carcinogenesis) ในที่สุด ส่วน Phase II enzymes สามารถทำลายพิษ (detoxify) ของสารก่อมะเร็งได้ ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันการเกิด DNA adducts มีรายงานว่า *glutathione S-transferase* (*GST*) ของมนุษย์เป็น supergene family ซึ่งมีอย่างน้อย 4 classes คือ alpha, mu, pi และ theta[31] และในแต่ละ class ประกอบด้วยยีนหลายชนิดยกเว้น pi class ตามปกติ GSTs ทำหน้าที่เป็น Phase II enzymes โดยการใช้ glutathione เข้าจับกับ (conjugation) electrophilic substances ซึ่งเป็น ultimate carcinogen และขับสารดังกล่าวออกจากร่างกาย[32]

Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) เป็นโปรตีนที่อยู่ใน mu class isoenzyme ทำหน้าที่สำคัญในการทำลายพิษของสารก่อมะเร็งเช่น aflatoxin B1, PAHs และ nitrosamines ที่มีอยู่ในอาหารและควันบุหรี่ มีรายงานว่า *GSTM1* gene (*GSTM1*) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด โดยพบว่าประมาณร้อยละ 50 ของชาว Caucasian และชาว Asian ไม่มี *GSTM1* (*GSTM1* null genotype: *GSTM1*-)[33-35] นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณร้อยละ 20-30 ของชาวอเมริกันอัฟริกันไม่มี *GSTM1* เช่นกัน[36] มีรายงานว่าคนกลุ่มที่ไม่มี *GSTM1* (*GSTM1*-) นี้จะมีความไวต่อการเกิดโรคมะเร็งหรือมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งมากกว่าคนกลุ่มที่มี *GSTM1* (*GSTM1* present genotype : *GSTM1*+) เนื่องจากกลุ่มคนดังกล่าวไม่สามารถสร้าง *GSTM1* ไปทำลายพิษของสารก่อมะเร็งได้ จากการศึกษาด้านระบาดวิทยาโมเลกุลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* polymorphisms กับโรคมะเร็งช่องปากพบว่า *GSTM1*- มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งช่องปากและความเสี่ยงของโรคมะเร็งนี้มักจะเกี่ยวข้องกับประวัติการสูบบุหรี่[37-38]

จากข้อมูลการวิจัยพบว่าการได้รับสารก่อมะเร็งไนโตรซามีน และ PAHs จากควันบุหรี่ และการเคี้ยวหมาก รวมทั้งการดื่มแอลกอฮอล์เป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคมะเร็งช่องปากในคนไทย และพบว่า *GSTM1* polymorphism มีความสัมพันธ์กับการทำลายพิษของสารก่อมะเร็งดังกล่าว จึงเชื่อว่า *GSTM1* polymorphism น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในคนไทย เนื่องจากในประเทศไทยยังมีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ *GSTM1* polymorphism ในผู้ป่วยมะเร็งช่องปากน้อยมาก การศึกษาถึงประโยชน์ของ *GSTM1* polymorphism ในการนำไปใช้ทำนายและติดตามค้นหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากเพื่อให้พบมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกเพิ่มขึ้น อนึ่งมีรายงานพบอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องปากและคอในจังหวัดสุราษฎร์ธานีนั้นค่อนข้างมากและมีแนวโน้มสูงขึ้น คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกศึกษาความสัมพันธ์ของ *GSTM1* polymorphism กับอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก ในจังหวัดสุราษฎร์ธานีเพื่อประโยชน์ในการหาแนวทางที่จะช่วยลดอัตราการเกิดและอัตราการตายจากโรคมะเร็งชนิดนี้ในประชากรที่มีภูมิลำเนาในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

การประยุกต์ใช้ความก้าวหน้าด้าน molecular biology ในการตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมนุษย์เพื่อใช้เป็นการทำนาย และค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งเพื่อให้พบโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกเพิ่มขึ้นนับว่าเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้การป้องกัน และควบคุมโรคมะเร็งช่องปากมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ *GSTM1* polymorphism ในเม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากและกลุ่มคนปกติได้ด้วยวิธี PCR assay และยังชี้ให้เห็นว่าความถี่ของการตรวจพบ *GSTM1* polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งช่องปากมีความแตกต่างจากกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเชื่อว่าการตรวจหา *GSTM1* polymorphism น่าจะนำไปประยุกต์ใช้เป็น genetic risk factor ช่วยในการตรวจวินิจฉัยและค้นหาผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกในคนไทยได้ อย่างไรก็ตามควรตระหนักว่าการใช้ *GSTM1* polymorphism เพียงอย่างเดียวเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งช่องปากนั้นไม่เพียงพอ เนื่องจาก *GSTM1* polymorphism ยังสามารถตรวจพบในโรคมะเร็งอีกหลายชนิด[5-12] ดังนั้นควรใช้ *GSTM1* polymorphism ร่วมกับการตรวจสอบประวัติ ผลการตรวจร่างกาย ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ของผู้ป่วยเพื่อช่วยทำให้การ

วินิจฉัยโรคมะเร็งช่องปากถูกต้องมากขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่าผลของการศึกษานี้พบว่าผู้ที่มี *GSTM1*- นั้นจะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากเพิ่มขึ้น 1.95 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มี *GSTM1*+ (OR = 1.95, 95% CI = 1.31-2.90) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Zhuo W และคณะโดยพบว่า *GSTM1*- สามารถเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในชาวเอเชียได้แต่ไม่พบความเสี่ยงดังกล่าวในชาว Caucasians[38] อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Cha IH และคณะซึ่งพบว่าผู้ที่มี *GSTM1*- เพียงอย่างเดียวนั้นจะไม่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากได้ ในขณะที่ผู้ที่มี *GSTM1*- ร่วมกับ *CYP1A1* (m2/m2) จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากมากขึ้น[40] นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบความสัมพันธ์ของ *GSTM1* polymorphism กับการเพิ่มความเสี่ยงของเกิดโรคมะเร็งช่องปากในกลุ่มของผู้ที่มี *GSTM1*- และมีพฤติกรรมเสี่ยงได้แก่ การสูบบุหรี่ (OR = 2.80, 95%CI = 1.63-4.80) การดื่มแอลกอฮอล์ (OR = 3.03, 95%CI = 1.73-5.28) และการเคี้ยวหมาก (OR = 2.35, 95%CI = 1.35-4.07) ซึ่งตรงกับรายงานการวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้านี้[14,16,22]

ในปัจจุบันการตรวจหา *GSTM1* polymorphism ด้วยวิธี PCR assay ที่ใช้กันทั่วไป (conventional) ยังมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากมีความซับซ้อนในการตรวจใช้เวลานาน (5-6 ชั่วโมง) และต้องใช้สารก่อมะเร็ง (ethidium bromide) ในการย้อมแถบ DNA บน agarose gel จึงทำให้วิธี PCR assay ไม่มีความปลอดภัย และไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างที่มีจำนวนมากๆ (mass screening) ได้ ดังนั้นการวิจัย และพัฒนาวิธีการตรวจแบบ real-time PCR ซึ่งไม่มีความซับซ้อน ใช้เวลาน้อยกว่า (1-2 ชั่วโมง) และไม่ต้องใช้สาร ethidium bromide ในการย้อมแถบ DNA รวมทั้งสามารถทำการตรวจได้รวดเร็วครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง จึงเป็นวิธีที่มีความปลอดภัย และเหมาะที่จะนำไปใช้ทดแทนวิธีการตรวจด้วยวิธี PCR assay ได้เป็นอย่างดี ซึ่งคณะผู้วิจัยที่กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติได้พัฒนาวิธีการตรวจหา *GSTM1* polymorphism โดยใช้ real-time PCR แล้วพบว่าได้ผลดี[41]

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *GSTM1* polymorphism มีความสัมพันธ์กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการตรวจหา *GSTM1* polymorphism นี้น่าจะนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยบ่งชี้ในการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรค เพื่อให้ตรวจพบมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกได้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี พ.ศ. 2550-2551

เอกสารอ้างอิง

1. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2550 กองสถิติสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข
2. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, et al, editors. Cancer in Thailand. Vol III, 1995-1997. Bangkok; 2003.
3. Khuhaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Sontipong S, Martin N, et al, editors. Cancer in Thailand. Vol IV, 1998-2000. Bangkok; 2003.
4. รายงานสถิติประจำปี พ.ศ. 2550 กองสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
5. Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. Environ Health Perspect 1996; 104:569-77.
6. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, White E, Hornung SK, Leng ZT, et al. The glutathione S-transferase polymorphism as a marker for susceptibility to lung cancer. Cancer Res 1993;53:2313-18.
7. Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk gastric cancer: A case-control study. World J Gastroenterol 2001;7:506-9.

8. Gawronska-Szklarz B, Lubinski J, Klandy J, Kurzawski G, Bielicki D, Wjcicki M, et al. Polymorphism of *GSTM1* gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. Exp Toxicol Pathol 1999;51:321-5.
9. Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Burt RD, Chen C, Berwick M, Swanson GM. Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8:547-51.
10. Srivastava DS, Kumar A, Mittal B, Mittal RD. Polymorphism of *GSTM1* and *GSTT1* genes in bladder cancer: a study from North India. Arch Toxicol 2004;78:430-4.
11. Van der Hel OL, Peeters PH, Hein DW, Doll MA, Grobbee DE, Kromhout D, et al. *NAT2* slow acetylation and *GSTM1* null genotypes may increase postmenopausal breast cancer risk in long-term smoking women. Pharmacogenetics 2003;13:399-407.
12. Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Polymorphism of glutathione S-transferase mu 1 and theta 1 genes and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. World J Gastroenterol 2005;11:272-4.
13. IARC. Tobacco habits other than smoking; betel-quid and areca-nut chewing; and some related nitrosamines. IARC Working Group. Lyon, 23-30 October 1984. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 1985;37:1-268.
14. Bhide SV, Nair UJ, Nair J, Spiegelhalder B, Preussmann R. N-nitrosamines in the saliva of tobacco chewers or masheri users. Food Chem Toxicol 1986;24:293-7.
15. Sankaranarayanan R, Duffy SW, Padmakumary G, Day NE, Nair MK. Risk factors for oral cancer of the buccal and labial mucosa in Karala, southern India. J Epidemiol 1990;135:1093-102.
16. Ko YC, Muang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin IM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking, and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. J Oral Pathol Med 1995;24:450-3.
17. Kerdpon D, Sriplung H. Oral squamous cell carcinomas in Songklanagarind Hospital. J Dent Assoc Thai 1997;47:296-302.
18. Nair UJ, Nair J, Mathew B, Bartsch H. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. Carcinogenesis 1999;20:743-8.
19. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:733-44.
20. Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, Eaton DL, Vaughan, TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003;12:527-33.
21. Lee SJ, Cho SH, Park SK, Kim SW, Park MS, Choi HY, et al. Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk. Cancer Lett 2002;177:173-9.
22. Heagerty AH, Fitzgerald D, Smith A, Bowers B, Jones P, Fryer AA, et al. Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumours. Lancet 1994;343:266-8.
23. Kietthubthew S, Sriplung H, Au WW. Genetic and environmental interactions on oral cancer in Southern Thailand. Environ Mol Mutagen 2001;37:111-6.
24. Setiawan VW, Zhang ZF, Yu GP, Li YL, Lu ML, Tsai CJ, et al. *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes and risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9:73-80.
25. Autrup JL, Thomassen LH, Olsen JH, Wolf H, Autrup H. Glutathione S-transferases as risk factors in prostate cancer. Eur J Cancer Prev 1999;8:525-32.
26. Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. Carcinogenesis 2001;22:67-72.
27. Sierra-Torres CH, Au WW, Arrastia CD, Cajas-Salazar N, Robazetti SC, Payne DA, et al. Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia. Environ Mol Mutagen 2003;41:69-76.
28. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population- based case-control study in southern Sweden. Swed Dent J Suppl 2005;179:1-66.
29. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;93:125-6.
30. Chocolatewala NM, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. J Cancer Res Ther 2009;5:71-7.
31. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995;30:445-600.
32. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995; 30:445-600.

33. Gao Y, Zhang Q. Polymorphisms of the GSTM1 and CYP2D6 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. Mutat Res 1999;444:441-9.
34. Kiyohara C, Shirakawa T, Hopkin JM. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of lung cancer. Environ Health Prevent Med 2002;7:47-59.
35. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. Toxicol Lett 2000;112/113:357-63.
36. Ford JG, Li Y, O'Sullivan MM, Demopoulos R, Garte S, Taioli E, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans. Carcinogenesis 2000;21:1971-5.
37. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at *GSTM1*, *GSTM3* and *GSTT1* gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. Carcinogenesis 2002;23:803-7.
38. Anantharaman D, Chaubal PM, Kannan S, Bhisey RA, Mahimkar MB. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. Carcinogenesis 2007;28:1455-62.
39. Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, Zhu Y, Wang W, Zhu B, et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk: association studies via evidence- based meta-analyses. Cancer Invest 2009;27:86-95.
40. Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, Kim HJ, Park KK. Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* genes and susceptibility to oral cancer. Yonsei Med J 2007;48:233-9.
41. Tiwawech D, Jindavijak S, Karalak A, Ishida T. Real-Time PCR assay for Rapid Detection of GSTM1 Polymorphism in Nasopharyngeal Carcinoma. Asian Pacific J Cancer Prev 2008;9:233-8.

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
Volume 29 No. 3
July–September 2009

Plant–Derived Phenolic Antioxidants and Cancer Prevention

Yuttana Sudjaroen

Abstract Oxidative stress imposed by reactive oxygen species (ROS) plays a crucial role in the pathophysiology associated with cancer and atherosclerosis. The ROS-induced development of cancer involves malignant transformation due to altered gene expression through epigenetic mechanisms as well as DNA mutations. The phenolic antioxidants play an important role in the chemoprevention of diseases especially cancer by reduced excess ROS. This article reviews the classification of major phenolic compound such as, phenolic acids and flavonoids, and the role of phenolic compound in cancer prevention. Future studies are not only elucidated mechanism related to direct antioxidant of phenolic compounds, but also to their ability to bind cellular receptors and transporters and influence gene expression, cell signaling, and cell adhesion *(Thai Cancer J 2009;29:126-134.)*

Keywords: phytochemicals, antioxidant, phenolic compounds, cancer prevention

บทคัดย่อ **สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลลิกกับการป้องกันมะเร็ง**

โดย **ยุทธนา สุดเจริญ**
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

ภาวะ Oxidative stress โดยกลุ่มออกซิเจนที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาหรือ ROS นั้น เป็นกลไกสำคัญทางพยาธิสรีระวิทยาที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจ ROS ทำให้เกิดมะเร็งโดยการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนของเซลล์ปกติ สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลลิกสามารถป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวได้โดยลดปริมาณ ROS ที่มีมากเกินไปในร่างกาย บทความนี้ได้กล่าวถึงการจำแนกสารกลุ่มฟีนอลลิกที่พบบ่อย เช่น ฟีนอลลิกแอซิด และฟลาโวนอยด์ ตลอดจนกลไกการป้องกันโรคมะเร็ง การศึกษาในอนาคตนั้นจะไม่ได้ค้นคว้าหากลไกของสารฟีนอลลิกในการป้องกันโรคมะเร็งโดยตรงเพียงอย่างเดียว หากแต่ยังรวมถึงความสามารถของฟีนอลลิกในการจับกับตัวรับ และตัวขนส่งของเซลล์ ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน, การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และการยึดติดกันของเซลล์ *(วารสารโรคมะเร็ง 2552;29:126-134.)*

คำสำคัญ : ฟีนอลลิก, ฟลาโวนอยด์, โรคมะเร็ง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok

Introduction

Lipid peroxidation, a radical chain oxidation of unsaturated fatty acids, causes not only food deterioration but also DNA, cell membrane and tissue damages in human body. Antioxidants have been widely used to delay or prevent oxidation of fats and oils. Butylated hydroxyanisol (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), the most commonly used synthetic antioxidants, show high efficacy, but their use in food has been partially restricted due to their undesirable effect on the enzymes of human organs. Natural antioxidants, such as tocopherols and ascorbic acid, are also practically used but less active than synthetic ones. Consequently, there is currently a strong worldwide interest in searching for new and safe antioxidants from natural sources[1-3]. There are multiple lines of evidence that oxidative stress imposed by reactive oxygen species (ROS) plays a key role in carcinogenesis. Oxidative modification of cell signal transduction by ROS may result in dysfunctional cell growth, differentiation, and death - often together with DNA mutations - that ultimately lead to the development of cancer. Epidemiological studies have revealed that a high consumption of antioxidant-rich fruits and vegetables is inversely correlated with the incidence of cancer[4-7].

The National Cancer Institute of the United States has identified approximately 40 plant-based foods that exert cancer-preventive effects, including green tea, red wine, soybean, ginger, onion, cabbage, cauliflower, Brussels sprouts, and turmeric [8]. The most promising findings have been associated with antioxidant vitamins and their precursors, which are abundant in dark, green leafy vegetables, and yellow/orange fruit and vegetables. Polyphenols or phenolic compounds, a family of phenolic phytochemicals, are among the most prevalent antioxidants in fruits, vegetables, grains, and some beverages, and have been proposed as primary chemopreventive agents.

Considerable attention has been focused on identifying naturally occurring antioxidative phenolics that are able to reduce excess ROS. However, it has been suggested that the consumption of large amounts of a single dietary antioxidant supplement is deleterious to human health[9]. The current consensus from epidemiological and human studies is that a low risk of cancer is more strongly related to a diet rich in multiple antioxidants than to one supplemented with an individual antioxidant[10, 11].

I. Phenolic compounds

Phenolics are compounds possessing one or more aromatic rings with one or more hydroxyl groups and generally are categorized as phenolic acids, flavonoids, stilbenes, coumarins, and tannins. Phenolics are the products of secondary metabolism in plants, providing essen-

tial functions in the reproduction and the growth of the plants; acting as defense mechanisms against pathogens, parasites, and predators, as well as contributing to the color of plants. In addition to their roles in plants, phenolic compounds in our diet may provide health benefits associated with reduced risk of chronic diseases. Among the [11] common fruits consumed in the United States, cranberry has the highest total phenolic content, followed by apple, red grape, strawberry, pineapple, banana, peach, lemon, orange, pear, and grapefruit[12]. It is estimated that flavonoids account for approximately two thirds of the phenolics in our diet and the remaining one third are from phenolic acids.

A. Flavonoids

Flavonoids are a group of phenolic compounds with antioxidant activity that have been identified in fruits, vegetables, and other plant foods and that have been linked to reducing the risk of major chronic diseases. More than 4000 distinct flavonoids have been identified. They commonly have a generic structure consisting of two aromatic rings (A and B rings) linked by 3 carbons that are usually in an oxygenated heterocycle ring, or C ring (Figure 1). Differences in the generic structure of the heterocycle C ring classify them as flavonols, flavones, flavanols (catechins), flavanones, anthocyanidins, and isoflavonoids (Figure 2). Flavonols (quercetin, kaempferol, and myricetin), flavones (luteolin and apigenin), flavanols (catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, and epigallocatechin gallate), flavanones(naringenin), anthocyanidins, and isoflavonoids (genistein) are common flavonoids in the diet (Figure 3).

Flavonoids are most frequently found in nature as conjugates in glycosylated or esterified forms but can occur as aglycones, especially as a result of the effects of food processing. Many different glycosides can be found in nature; 80 different sugars have been discovered bound to flavonoids [13]. Anthocyanidins give the red and blue colors in some fruits and vegetables. Human intake of all flavonoids is estimated at a few hundred milligrams[14] to 650 mg/d [15]. The total average intake of flavonols (quercetin, myricetin, and kaempferol) and flavones (luteolin and apigenin) was estimated as 23 mg/d, of which quercetin contributed 70%; kaempferol, 17%; myricetin, 6%; luteolin, 4%; and apigenin 3%[16].

B. Phenolic acids

Phenolic acids can be subdivided into two major groups, hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic acids (Figure 4). Hydroxybenzoic acid derivatives include p-hydroxybenzoic, protocatechuic, vannilic, syringic, and gallic acids (Table 1). They are commonly present in the bound form and are typically a component of a complex structure like lignins and hydrolyzable

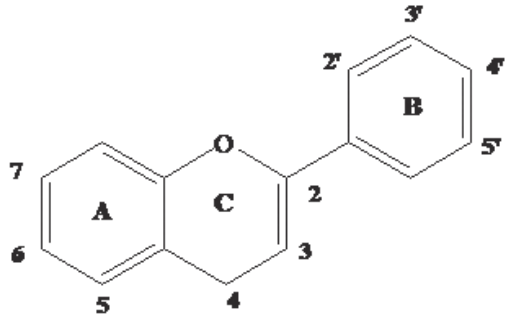
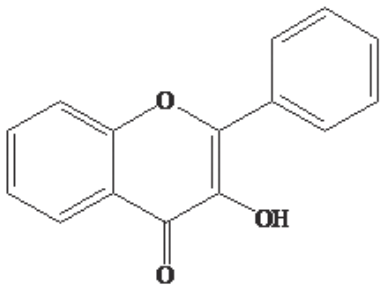
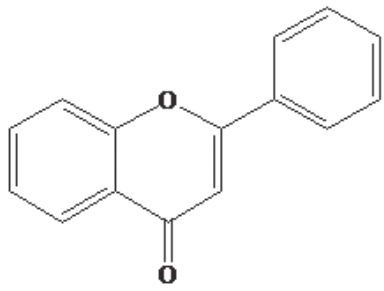


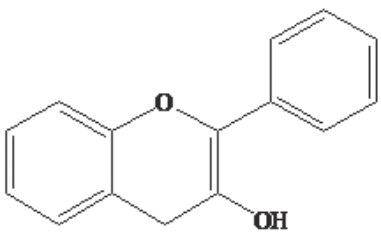
Figure 1 Generic structure of flavonoids



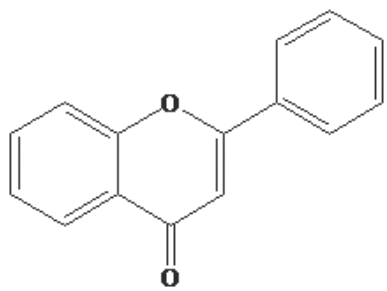
Flavonols



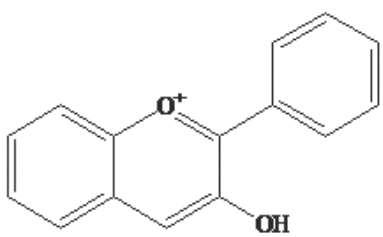
Flavones



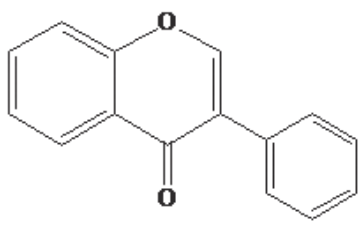
Flavanols (Catechins)



Flavanones



Anthocyanidins



Isoflavones

Figure 2 Structures of main classes of dietary flavonoids.

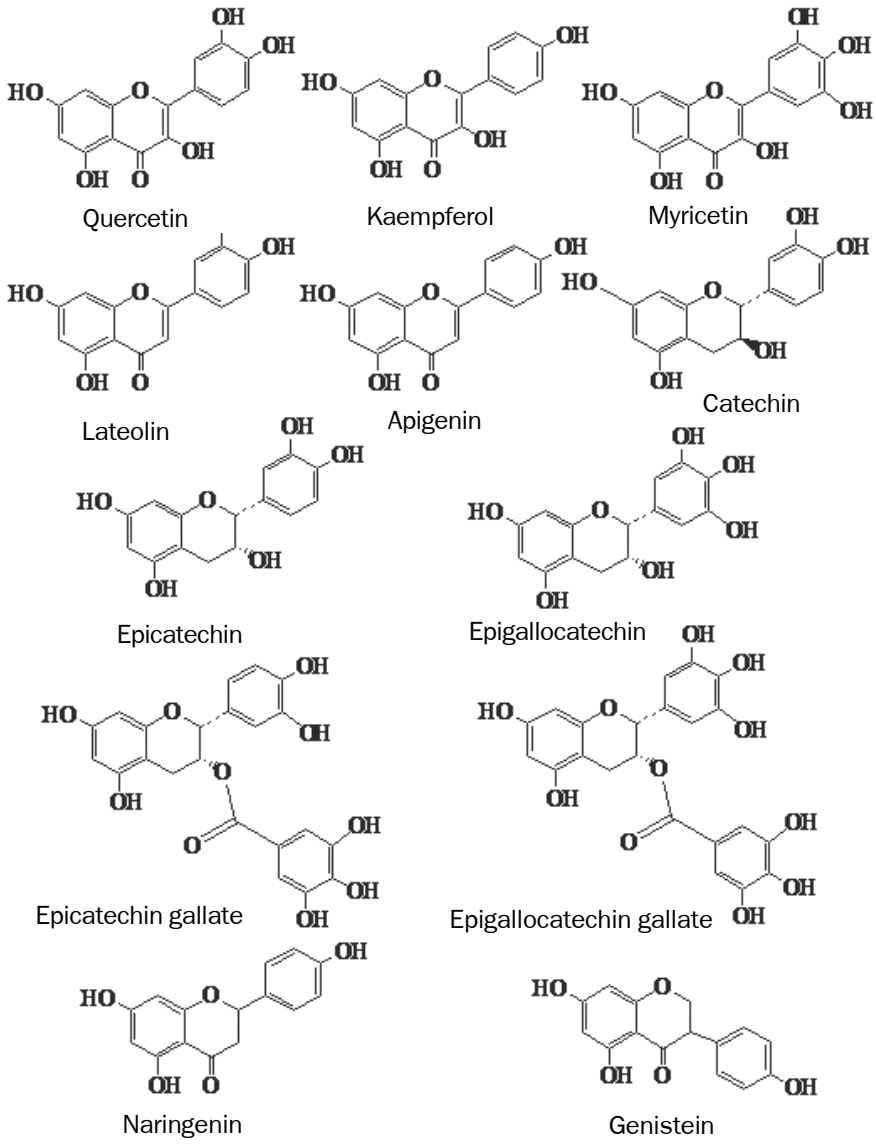


Figure 3 Chemical structures of common dietary flavonoids.

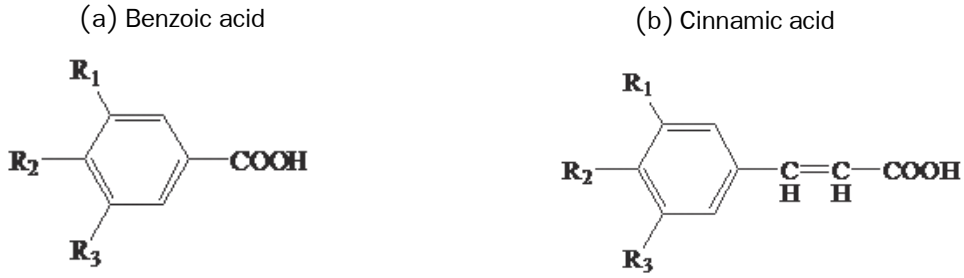


Figure 4 Structures of common phenolic acids: (a) benzoic acid and derivatives; (b) cinnamic acid and derivatives.

Table 1 Benzoic acid derivatives and substitutions

Benzoic acid derivatives	Substitutions		
	R1	R2	R3
p-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	H	OH	OH
Valnilic	CH3O	OH	H
Syringic	CH3O	OH	CH3O
Gallic	OH	OH	OH

tannins. They can also be found in the form of sugar derivatives and organic acids in plant foods. Hydroxycinnamic acid derivatives include p-coumaric, caffeic, ferulic, and sinapic acids (Table 2). They are mainly present in the bound form, linked to cell-wall structural components, such as cellulose, lignin, and proteins through ester bonds.

Ferulic acid occur primarily in the seeds and leaves of plants, mainly covalently conjugated to mono- and disaccharides, plant-cell-wall polysaccharides, glycoproteins, polyamines, lignin, and insoluble carbohydrate biopolymers. Wheat bran is a good source of ferulic acids, which are esterified to hemicellulose of the cell walls. Free, soluble-conjugated, and bound ferulic acids in grains are present in the ratio of 0.1:1:100[17]. Food processing, such as thermal processing, pasteurization, fermentation, and freezing, contributes to the release of these bound phenolic acids[18].

Caffeic, ferulic, p-coumaric, protocatechuic, and vannilic acids are present in almost all plants. Chlorogenic acids and curcumin are also major derivatives of hydroxycinnamic acids present in plants. Chlorogenic acids are the ester of caffeic acids and are the substrate for enzymatic oxidation leading to browning, particularly in apples and potatoes. Curcumin is made of two ferulic acids linked by a methylene in a diketone structure and is the major yellow pigment of mustard.

Table 2 Cinnamic acid derivatives and substitutions

Cinnamic acid derivatives	Substitutions		
	R1	R2	R3
p-Coumaric	H	OH	H
Caffeic	OH	OH	H
Ferulic	CH3O	OH	H
Sinapic	CH3O	OH	H

II. Phenolic compounds and role of cancer prevention

Cells in humans and other organisms are constantly exposed to a variety of oxidizing agents, some of which are necessary for life. These agents may be present in air, food, and water, or they may be produced by metabolic activity within cells.

The key factor is to maintain a balance between oxidants and antioxidants to sustain optimal physiological conditions. Overproduction of oxidants can cause an imbalance, leading to oxidative stress, especially in chronic bacterial, viral, and parasitic infections [19]. Oxidative stress can cause oxidative damage to large biomo- lecules such as lipids, proteins, and DNA, resulting in an increased risk for cancer and cardiovascular diseases [19-21]. To prevent or slow the oxidative stress induced by free radicals, sufficient amounts of antioxidants need to be consumed. Fruits, vegetables, and whole grains contain a wide variety of antioxidant compounds (phytoc- hemicals), such as phenolics and carotenoids, and may help protect cellular systems from oxidative damage and also may lower the risk of chronic diseases[12, 17, 22-24].

Carcinogenesis is a multistep process, and oxidative damage is linked to the formation of tumors through several mechanisms[19,21]. Oxidative stress induced by free radicals causes DNA damage, which, when left unrepaired, can lead to base mutation, single- and double-strand breaks, DNA cross-linking, and chromosomal breakage and rearrangement[21]. This potentially cancer-inducing oxidative damage might be prevented or limited by dietary antioxidants found in fruits and vegetables. Studies to date have demonstrated that phytochemicals in common fruits and vegetables can have complementary and overlapping mec- hanisms of action (Table 3), including antioxidant activity and scavenging free radicals; regulation of gene expression in cell proliferation, cell differentiation, oncogenes, and tumor suppressor genes; induction of cell-cycle arrest and apoptosis; modulation of enzyme activities in detoxification, oxidation, and reduction; stimulationof the immune system; regulation of hormone metabolism; and antibacterial and antiviral effects [12, 22, 25, 26].

III. Future directions

Considering that the role of dietary phenolic compounds or polyphenols in cancer prevention has only attracted real scientific interest about a decade, this field has seen a remarkable rate of progress. One of the most crucial results from epidemiological and human studies is that a low risk of cancer is more closely related to a diet rich in multiple antioxidants than to one supplemented with an individual antioxidant. The toxicity of polyphenols beyond normal dietary intake levels as well as their bioavailability, metabolism, and interactions with various dietary components still need to be investigated. One of the innovative approaches that can be applied in dietary chemoprevention is combining agents with different modes of action to increase efficacy and minimize toxicity. Future studies should also attempt to elucidate the important mechanisms of polyphenols that are not only related to their

Table 3 Proposed mechanisms by which dietary phytochemicals may prevent cancer

Antioxidant activity
Scavenge free radicals and reduce oxidative stress
Inhibition of cell proliferation
Induction of cell differentiation
Inhibition of oncogene expression
Induction of tumor suppress gene expression
Induction of cell-cycle arrest
Induction of apoptosis
Inhibition of signal transduction pathways
Enzyme induction and enhancing detoxification
Phase II enzyme
Glutathione peroxidase
Catalase
Superoxide dismutase
Enzyme inhibition
Phase I enzyme (block activation of carcinogens)
Cyclooxygenase-2
Inducible nitric oxide synthase
Xanthine oxidase
Enhancement of immune functions and surveillance
Antiangiogenesis
Inhibition of cell adhesion and invasion
Inhibition of nitrosation and nitration
Prevention of DNA binding
Regulation of steroid hormone metabolism
Regulation of estrogen metabolism
Antibacterial and antiviral effects

direct antioxidant activity but also to their ability to bind cellular receptors and transporters and influence gene expression, cell signaling, and cell adhesion.

References

1. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. Br J Nutr 1998;80:77-112.
2. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Yamamoto A, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidative components isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). J Agric Food Chem 1994;42:2671- 4.
3. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. Chemical Physical Lipids 1987;45:337- 41.
4. Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries,spinach, red wine or vitamin C in elderly women. J Nutr 1998;128:2383-90.
5. Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and

the risk of gastric cancer in Spain. Cancer Causes Control 1999;10:71-5.
6. Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellovaara M, Teppo L, Pukkala E, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. Am J Epidemiol 1997;146:223-30.
7. Levine M, Rumsey SC, Daruwala S, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. JAMA 1999;281:1415-23.
8. Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer 2003;3:768-80.
9. Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. Science 2001;292:2083-6.
10. Lee KW, Lee HJ, Surh Y-J, Lee CY. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. Am J Clin Nutr 2003;78:1074-8.
11. Levi F. Cancer prevention: epidemiology and perspectives. Eur J Cancer Prev 1999;35:1046-58.
12. Sun J, Chu Y-F, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of fruits. J Agric Food Chem 2002;50:7449-54.
13. Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric 2000;80:1081-93.
14. Hollman, PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol 1999;37:937-42.
15. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World Rev Nutr Diet 1976;24:117-91.
16. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr Cancer 1993;20:21-9.
17. Adom KK, Liu RH. Antioxidant activity of grains. J Agric Food Chem 2002;50:6182-7.
18. Dewanto V, Wu X, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. J Agric Food Chem 2002;50:4959-64.
19. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review. Mutat Res 1995;339:73-89.
20. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. Mutat Res 1991;250:3-16.
21. Ames BN, Shigenaga MK, Gold LS. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: the three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. Environ Health Perspect 1993;101:35-44.
22. Chu Y-F, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of vegetables. J Agric Food Chem 2002;50:6910-6.
23. Wang H, Cao GH, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. J Agric Food Chem 1996;44:701-5.
24. Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L, Bose P. Phenolantioxidant quantity and quality in foods: fruits. J Agric Food Chem 2001;49:5315-21.
25. Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. Pharmacol Toxicol 1993;72:116-35.
26. Waladkhani AR, Clemens MR. Effect of dietary phytochemicals on cancer development. Int J Mol Med 1998;1:747-53.

วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม-กันยายน 2552

คำแนะนำการส่งต้นฉบับ เพื่อตีพิมพ์ในวารสารโรคมะเร็ง

วารสารโรคมะเร็งยินดีรับบทความทางวิชาการ หรือเรื่องราวที่น่าสนใจเกี่ยวกับโรคมะเร็ง เพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารของเรา โดยคณะผู้จัดทำวารสารโรคมะเร็งขอให้ผู้นิพนธ์ส่งต้นฉบับซึ่งจัดเตรียมถูกต้องตามคำแนะนำในเอกสารนี้ มายัง

บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง
กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์
ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400
หรือทาง E-mail : nci_journal@hotmail.com

ประเภทของบทความ

นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

ควรจะเขียนลำดับเป็นข้อๆ ได้แก่ บทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย) บทนำสั้นๆ (เหตุผลที่ทำการศึกษานี้ รวมทั้งวัตถุประสงค์) วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง

รายงานผู้ป่วย (Case Report)

ควรประกอบด้วยบทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษ และภาษาไทย) บทนำ รายงานผู้ป่วย บทวิจารณ์ ข้อคิดเห็น สรุป และเอกสารอ้างอิง

บทความทางวิชาการหรือบทฟื้นวิชาการ (Review Articles)

ควรเป็นบทความที่ให้ความรู้ รวบรวมสิ่งตรวจพบใหม่ หรือเรื่องที่น่าสนใจที่ผู้อ่านนำไปประยุกต์ได้ ประกอบด้วย บทนำ ความรู้เกี่ยวกับเรื่องที่เขียน และเอกสารอ้างอิง

การเตรียมต้นฉบับ

1. บทความที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ต้องส่งต้นฉบับ 2 ชุด (พร้อมไฟล์) และต้องไม่เคยตีพิมพ์หรือกำลังส่งตีพิมพ์ที่ใด

2. บทความที่พิมพ์รับทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ถ้าเป็นภาษาไทยควรหลีกเลี่ยงคำภาษาอังกฤษ ยกเว้นในกรณีจำเป็นเท่านั้น พยายามไม่ใช้คำย่อ นอกจากคำที่ยอมรับกันโดยทั่วไป

3. บทคัดย่อ ให้ย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษไม่ว่าเนื้อเรื่องจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ และมีคำสำคัญ (Key words) ด้วย

4. ชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน ต้องมีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ พร้อมด้วยสถาบันที่ทำงาน (ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) และระบุผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ (corresponding author)

5. ต้นฉบับต้องพิมพ์อย่างชัดเจนมีระยะ

ห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่อง พิมพ์หน้าเดียวในกระดาษ A4 โดยพิมพ์ห่างจากขอบทุกด้าน 1 นิ้ว โดยตลอดและใส่เลขหน้าทางมุมขวาบน

6. ภาพประกอบ ใช้ภาพขาวดำ ขนาดโปสการ์ด ผิวหน้าเรียบเป็นมัน กำกับหมายเลขภาพ ชื่อผู้เขียนไว้ด้านหลังภาพทุกภาพ พิมพ์คำบรรยายภาพเป็นลำดับแยกไว้ในกระดาษอีกแผ่น หรือเป็นรูปดิจิตอล file.jpeg ความละเอียด 600 dpi กำกับหมายเลขภาพ และคำบรรยาย ส่งเป็นไฟล์แยกต่างหากจากเนื้อเรื่อง

7. ตาราง พิมพ์แยกต่างหากโดยมีหัวข้อ (title) และเชิงอรรถ (foot note) พร้อมทั้งอธิบายตัวย่อในตารางตลอดจนบอกนัยสำคัญทางสถิติอย่างครบถ้วน

8. เอกสารอ้างอิง ใช้ระบบแวนคูเวอร์ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันอยู่ในวารสารทางการแพทย์ชั้นนำในขณะนี้ ให้กำกับการอ้างด้วยหมายเลขและเรียงลำดับการอ้างหมายเลขที่กำกับในรายชื่อเอกสารอ้างอิงจะต้องตรงกับหมายเลขในเนื้อเรื่องด้วย

การเขียนเอกสารอ้างอิง

8.1 จากวารสาร

วารสารภาษาอังกฤษ ประกอบด้วยชื่อผู้แต่ง (ถ้ามีผู้แต่งไม่เกิน 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคนแต่ถ้ามี 7 คนขึ้นไปให้ใส่เพียง 6 ชื่อแรก แล้วเติม et al.) ชื่อเต็มของบทความ ชื่อย่อวารสาร (ใช้ตาม Index Medicus) ปีที่พิมพ์; ปีที่:หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

วารสารภาษาไทย ให้เขียนแบบเดียวกับภาษาอังกฤษ เว้นแต่ชื่อผู้เขียนใช้ชื่อเต็มโดยใส่ชื่อตัวก่อนแล้วตามด้วยนามสกุลและใช้ปี พ.ศ.

ตัวอย่าง

1. Chariyalertsak S, Sirikulchayanonta V, Mayer D, Kopp-Schneider A, Fuerstenberger G, Marks F, et al. Aberrant cyclooxygenase isozyme expression in human intrahepatic cholangio carcinoma. Gut 2001;48:80-6.

2. สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, พงษ์กิตติ ฐิศุภกร, สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์. Proliferating Cell Nuclear Antigen ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม: บทบาทในการพยากรณ์โรค.วารสารโรคมะเร็ง 2542;25:1-6.

8.2 จากหนังสือและโมโนกราฟอย่างอื่น

8.2.1 ผู้นิพนธ์เป็นบุคคล ตัวอย่างเช่น

Getzen TE. Health economics: fundamental of funds. New York: John Wiley & Sons; 1997.

8.2.2 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประธานที่เป็นผู้นิพนธ์ ตัวอย่างเช่น

Millares M, editor. Applied drug information: strategies for information management. Vancouver, WA: Applied Therapeutics, Inc.; 1998.

8.2.3 บทหนึ่งในหนังสือหรือตำรา ตัวอย่างเช่น

Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. In: Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology. 6th ed. Norwalk, CN:Appleton and Lange; 1995. p. 361-80.

8.2.4 หนังสือที่เป็นชุด (series) ตัวอย่างเช่น

Bennett GL, Horuk R. Iodination of chemokines for use in receptor binding analysis. In:Horuk R, editor. Chemokine receptors. New York: Academic Press; 1997. p. 134-48. (Methods in enzymology; vol 288).

หมายเหตุ : Chemokine receptors = ชื่อหนังสือ
Methods in enzymology = ชื่อหัวข้อเรื่องของ series

8.2.5 หนังสือ proceeding ของการประชุม ตัวอย่างเช่น

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

8.2.6 เอกสารหรือแหล่งข้อมูลอื่น

เรื่องจาก หนังสือพิมพ์ ตัวอย่างเช่น

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution : study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A: 3 (col.5).

เรื่องจากวารสารใน internet ตัวอย่างเช่น

Laporte RE, Marler E, Akazawa S, Sauer F. The death of biomedical journals. BMJ [serial online]. 1995;310:1387-90. Available from: http://www.bmj.com/bmj/archive/6991ed2.htm. Accessed September 26, 1996.

เรื่องจาก web site ตัวอย่างเช่น

Health on the net foundation. Health on the net foundation code of conduct (HONcode) for medical and health web sites. Available at : http://www.hon.ch/conduct.html. Accessed June 30, 1998.

หนังสือแจ้งความจำนงลงโฆษณา ในวารสารโรคมะเร็ง

เขียนที่.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

ในนามของ.....เลขที่.....ถนน.....

ตำบล/แขวง.....อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....

รหัสไปรษณีย์.....โทรศัพท์.....โทรสาร.....

มีความประสงค์ลงโฆษณาในวารสารโรคมะเร็ง

- ❒ ฉบับที่ 1 เดือน มกราคม - มีนาคม
- ❒ ฉบับที่ 2 เดือน เมษายน - มิถุนายน
- ❒ ฉบับที่ 3 เดือน กรกฎาคม - กันยายน
- ❒ ฉบับที่ 4 เดือน ตุลาคม - ธันวาคม

รวม.....ฉบับ

โดยลงโฆษณาในลักษณะ

- ❒ พิมพ์เนื้อใน 1/2 หน้า อัตรา 5,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- ❒ พิมพ์เนื้อในเต็มหน้า อัตรา 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- ❒ พิมพ์ปกหลังด้านใน 1/2 หน้า อัตรา 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- ❒ พิมพ์ปกหลังด้านในเต็มหน้า อัตรา 20,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- ❒ พิมพ์ปกหลังด้านนอกเต็มหน้า อัตรา 35,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- ❒ ใบแทรก อัตรา 6,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- ❒ พิมพ์สี จ่ายค่าเพลทและค่าพิมพ์เพิ่ม 10,000 บาท

รวมเป็นเงินทั้งสิ้นจำนวน.....บาท

ตัวอักษร (.....) บาท

ลงนาม.....ผู้สั่งโฆษณา

(.....)

หมายเหตุ ถ้าลงโฆษณาทั้งปี (4 ฉบับ) จะลดค่าโฆษณาให้ 10 %

ส่งอาร์ตเวิร์ค / ข้อความโฆษณาทาง E-mail : nci_journal@hotmail.com

การชำระค่าโฆษณา ให้เขียนเช็คสั่งจ่ายในนาม "มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ"

sanofi aventis

Because health matters

Legalon® 70/140

Improves liver function
Protects against liver damage

Legalon®

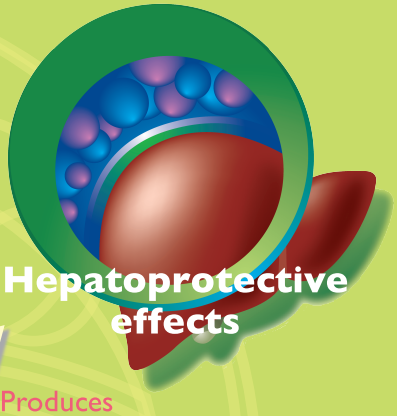
Contains

Silymarin MZ 80
A special milk thistle
(*Silybum marianum*)
fruit extract

Activated into

Silibinin
Active ingredient

Produces



Legalon® has been clinically proven to exert **significant hepatoprotective effects** due to its **high silibinin** content.

- Clinically proven hepatoprotective effects in:
  - Acute and chronic hepatitis
  - Toxic metabolic liver damage
  - Fatty liver
  - Liver cirrhosis
- Good safety record [1]
- Minimal side effects

Prescribing information

Composition
1 cap **Legalon**® 70 contains 70 mg silymarin
1 cap **Legalon**® 140 contains 140 mg silymarin

Mode of action
The liver has several vital functions in the human body such as metabolism of sugar, proteins and fats, bile secretion during digestion and detoxification of waste products. Any form of liver damage causes change in the liver cell membrane and impairs the functional capacity of the liver. Silymarin, the active ingredient of **Legalon**®, acts as a cell membrane stabilizer and protects the hepatic outer cell membrane. It also blocks lipid peroxidation and counteracts the liver damage caused by free radicals. Moreover, silymarin stimulates protein biosynthesis and regeneration of damaged liver tissue, reduces inflammation (by inhibiting the production of inflammatory mediators such as leukotrienes) and has antifibrotic effects (slows down progression of fibrosis and restores damaged liver cells).

Indications
For acute and chronic hepatitis, hepatic cirrhosis, toxic metabolic liver damage (eg, alcoholic fatty liver, drug-induced liver damage, poisoning and radiation exposure)

Recommended dosage

	Legalon® 70 mg capsule	**Legalon**® 140 mg capsule
Therapeutic dose	2 cap, 3x daily	1 cap, 3x daily
Maintenance dose	1 cap, 3x daily	1 cap, 2x daily

References
1 Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001;61:2035-2063.

Side effect
A mild laxative action has been observed in isolated cases.

Presentation
Legalon® 70 cap 70 mg x 10 x 10's.
Legalon® 140 cap 140 mg x 4 x 10's.

Store medicines carefully.
Keep out of the reach of children.

ใบอนุญาตโฆษณาเลขที่ ฆศ 908/48

ROTTAPHARM | MADAUS

OHI