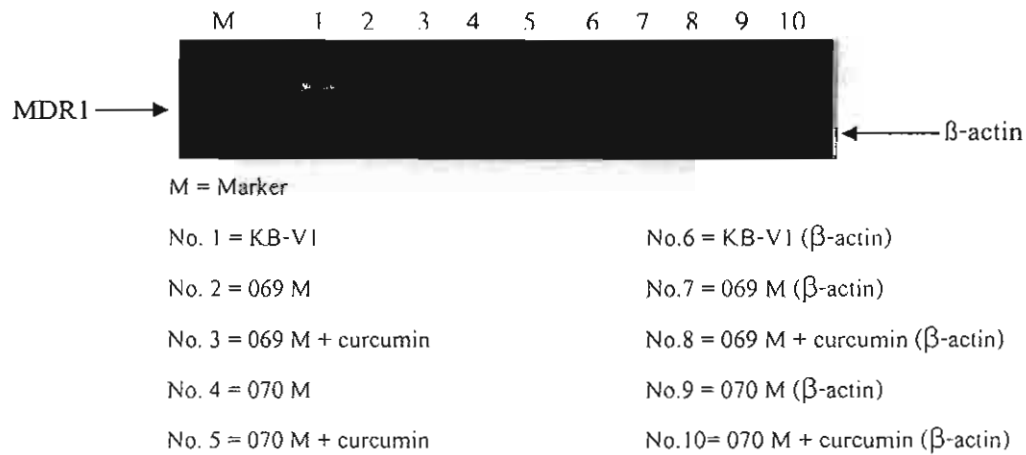
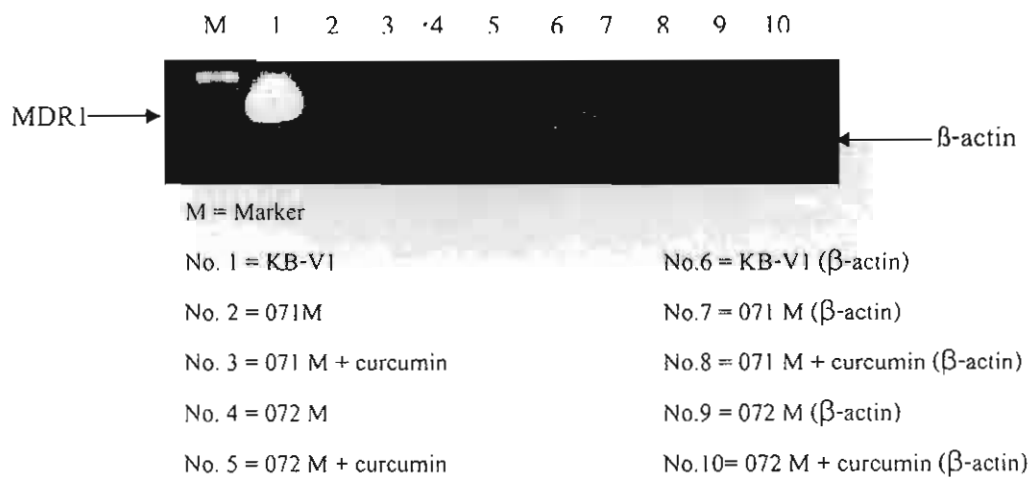
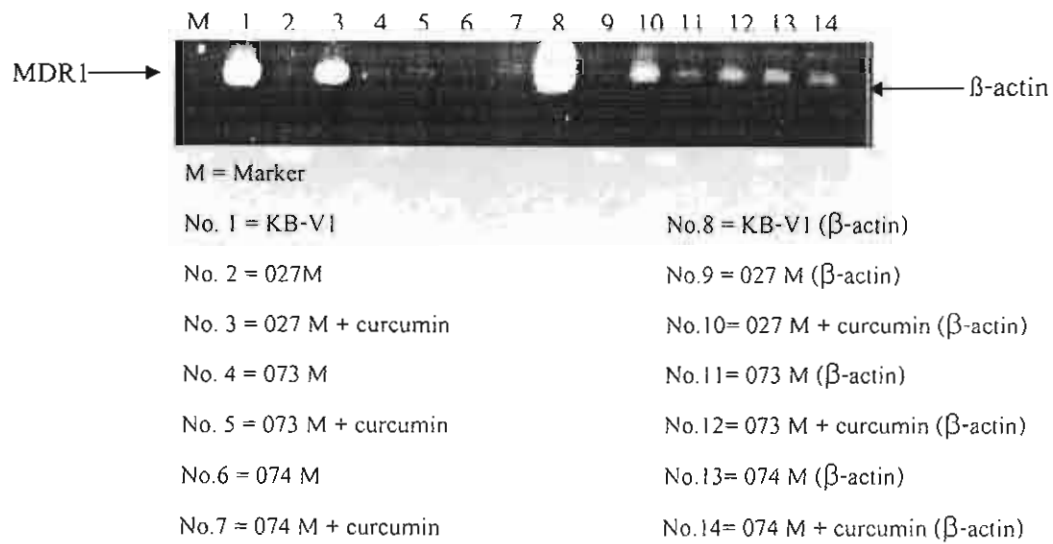




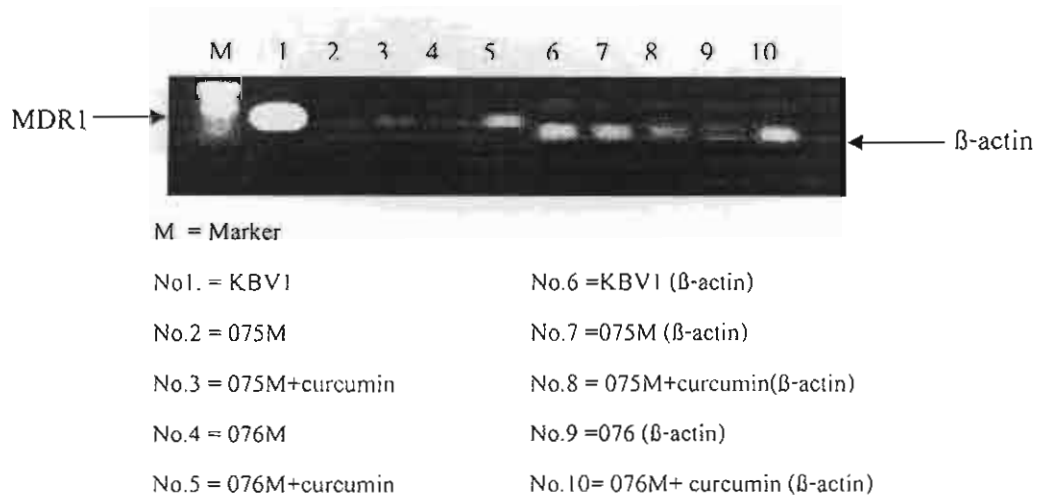
รูปที่ 40. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 069M และ 070M



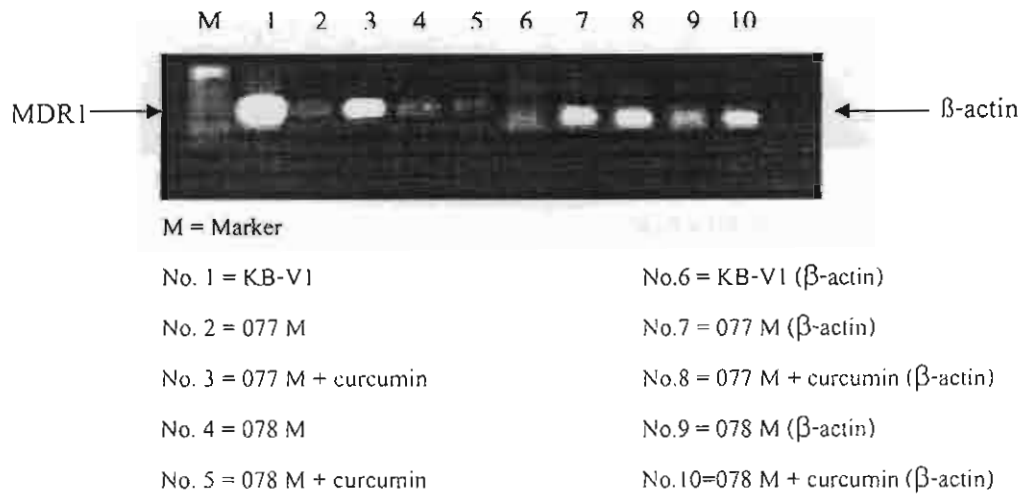
รูปที่ 41. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 071M และ 072M



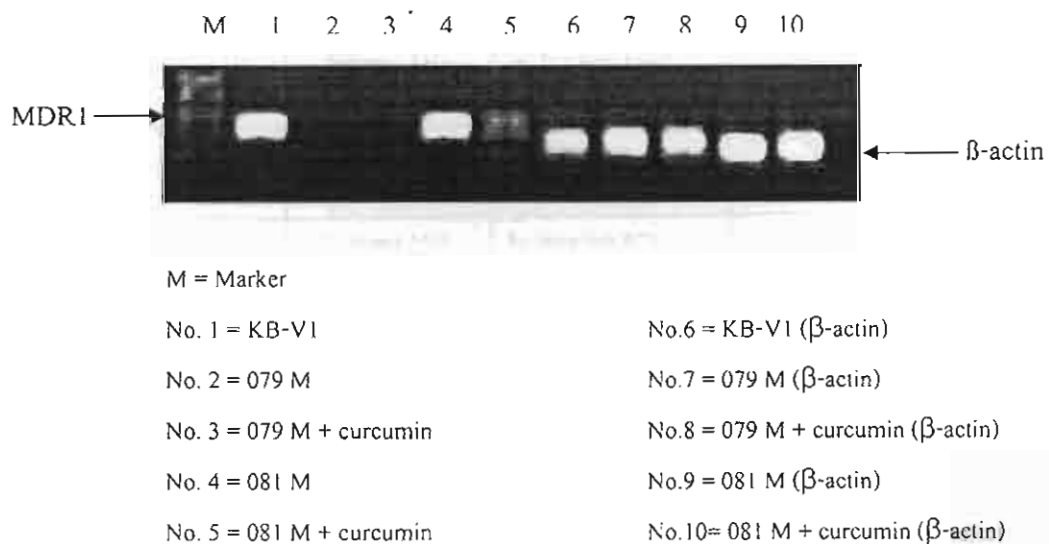
รูปที่ 42. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 027M, 073M และ 074M



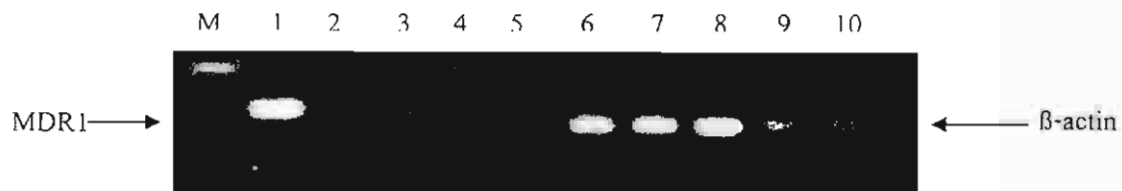
รูปที่ 43. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 075M และ 076M



รูปที่ 44. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 077M และ 078M



รูปที่ 45. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 079M และ 081M



M = Marker

No. 1 = KB-V1

No. 2 = 084 M

No. 3 = 084 M + curcumin

No. 4 = 085 M

No. 5 = 085 M + curcumin

No. 6 = KB-V1 (β-actin)

No. 7 = 084 M (β-actin)

No. 8 = 084 M + curcumin (β-actin)

No. 9 = 085 M (β-actin)

No. 10 = 085 M + curcumin (β-actin)

รูปที่ 46. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของยีน *MDR1* ของผู้ป่วยราย ที่ 084M และ 085Mตารางที่ 6 แสดงรายละเอียดของตัวอย่างจากผู้ป่วย, ประวัติ, และการแสดงออกของยีน *MDR1*

ตัวอย่างที่	เพศ	อายุ	ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	การได้รับยาเคมีบำบัด	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน <i>MDR1</i>	เปอร์เซ็นต์การลดลงของยีน <i>MDR1</i>
001 M	ชาย	11 ปี	Relapsed AML	ได้รับ VAPA จนถึง maintenance	35	81
001 M + C					6.5	
002 M	หญิง	4 ปี	ALL	New case	11.4	-
002 M + C		5 เดือน			11.5	
003 M	ชาย	16 ปี	Relapsed AML	Re-induction ครบ ไข้อย่า protocol ใหม่	4.4	-
003 M + C					20.7	
004 M	ชาย	11 ปี	ALL	New case	79	-
004 M + C		6 เดือน			89	
005 M	ชาย	5 ปี	ALL	Induction ครบ	16	-
005 M + C		7 เดือน			28	
006 M	หญิง	10 ปี	AML	เริ่ม maintenance	26	-
006 M + C		5 เดือน			36	
007 M	ชาย	16 ปี	ALL	ครบ Rx. จบการรักษาแล้ว	136	97
007 M + C					1.4	
008 M	ชาย	15 ปี	Relapsed ALL	Re-induction ครบ	25.8	-
008 M + C					44	
009 M*	ชาย	10 เดือน	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
009 M + C					ปริมาณน้อย	

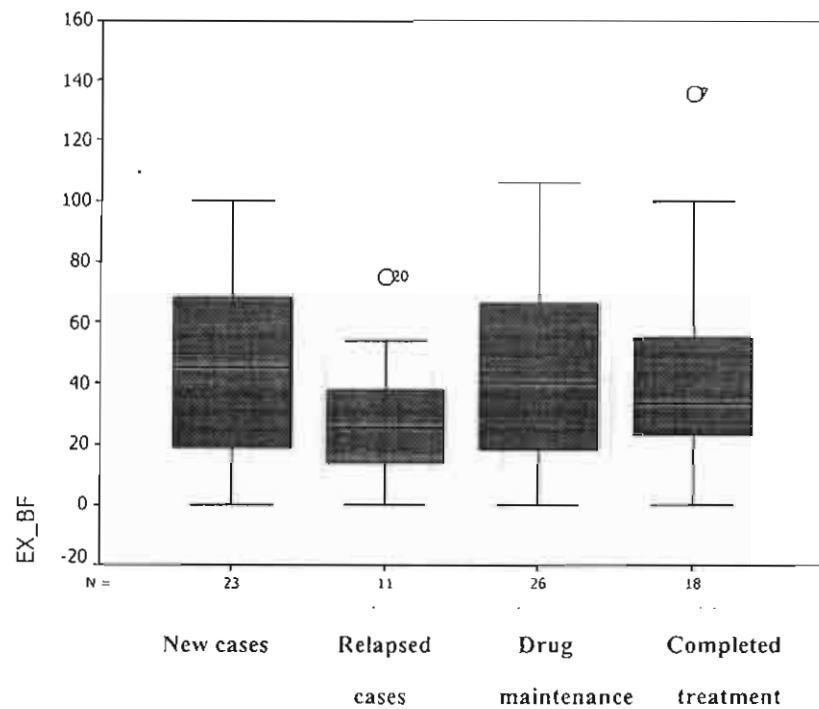
010 M ^r	ชาย	9 ปี	ALL	New case	20	-
010 M + C		1 เดือน			30	
011 M	ชาย	5 ปี	ALL	เริ่ม Phase IVa	0	-
011 M+C		3 เดือน			0	
012 M	ชาย	8 ปี	Relapsed ALL	Off Rx. แล้ว ประมาณ 1 ปี	54	33
012 M + C		7 เดือน			36	
013 M	ชาย	8 ปี	AML	Phase II ครบ	34	-
013 M + C					53	
014 M	ชาย	16 ปี	Relapsed ALL	ช่วง maintenance	40	58
014 M + C					17	
015 M	ชาย	9 ปี	ALL	ช่วง Phase IVa เปลี่ยนยา	39	15
015 M + C		7 เดือน			33	
016 M	ชาย	3 ปี	ALL	New case	53	-
016 M + C		8 เดือน			77	
017 M	หญิง	13 ปี	AML	New case	6	-
017 M + C		1 เดือน			5.7	
018 M	ชาย	15 ปี	Relapsed ALL	Induction ครั้งที่ 3 (relapse 3 รอบ)	14	-
018 M + C		10 เดือน			16	
019 M	หญิง	13 ปี	ALL	ครบ Rx. (Re induction)	30	43
019 M + C		9 เดือน			17	
020 M	หญิง	15 ปี	Relapsed ALL	Induction ครั้งที่ 2	75	19
020 M + C					61	
021 M	ชาย	15 ปี	ALL	Phase IVb	46	-
021 M + C		3 เดือน			63	
022 M	ชาย	1 ปี	ALL	New case (ได้รับ antibiotic)	81	22
022 M + C		11 เดือน			63	
023 M	หญิง	2 ปี	ALL	New case	56	30
023 M + C		9 เดือน			39	
024 M	ชาย	9 ปี	ALL	Phase IVb	84	25
024 M + C		3 เดือน			63	
025 M	ชาย	12 ปี	ALL	เริ่ม Phase IVa M ₁	106	56
025 M + C		9 เดือน			47	
026 M	ชาย	9 ปี	ALL	ครบ Phase I	20	60
026 M + C		4 เดือน			8	
027 M	ชาย	4 ปี	ALL	ครบ Phase I	100	37
027 M + C		6 เดือน			63	
028 M	หญิง	1 ปี	ALL	ครบ Phase I	42	2
028 M + C		9 เดือน			41	
029 M	ชาย	3 ปี	ALL	เริ่ม Phase IVb	17	18

029 M + C		9 เดือน			14	
030 M	ชาย	6 ปี	ALL	ช่วง Phase IVb	18	-
030 M + C		6 เดือน			20	
031 M	ชาย	10 ปี	Relapsed AML		13	-
031 M + C		7 เดือน			13	
032 M	ชาย	7 เดือน	AML	New case	14	7
032 M + C					13	
033 M	ชาย	9 ปี	ALL	ครบ Phase I	15	-
033 M + C		11 เดือน			29	
034 M	ชาย	2 ปี	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
034 M + C					ปริมาณน้อย	
035 M	ชาย	2 ปี	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
035 M + C		10 เดือน			ปริมาณน้อย	
036 M	หญิง	9 ปี	ALL	New case	66	12
036 M + C					58	
037 M	ชาย	5 ปี	ALL	ครบ Rx	42	31
037 M + C		9 เดือน			29	
038 M	หญิง	1 ปี	Relapsed AML	Induction AML I ครบ	25	36
038 M + C		4 เดือน			16	
039 M	ชาย	10 ปี	ALL	ระหว่าง Phase IVb	66	-
039 M + C		4 เดือน			69	
040 M	ชาย	8 ปี	ALL	เริ่ม Phase IVb	19	16
040 M + C		1 เดือน			16	
041 M	ชาย	12 ปี	CML	ได้รับ Hydrea แล้ว	94	-
041 M + C		9 เดือน		5 วัน	132	
042 M	ชาย	1 ปี	CML	New case	45	31
042 M + C		5 เดือน	Juvenile type		31	
043M	หญิง	2 ปี	ALL	เริ่ม Phase II	100	84
043M+C		3 เดือน			16	
044M	หญิง	10 ปี	ALL	ครบ Rx	86	-
044M+C		7 เดือน			186	
045M	หญิง	6 ปี	ALL	ครบ Rx	100	-
045M+C		11 เดือน			122	
046M	หญิง	7 ปี	ALL	New case	100	-
046M+C		5 เดือน		(ได้รับ antibiotic)	108	
047M	ชาย	12 ปี	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
047M+C		5 เดือน				
048M	ชาย	12 ปี	ALL	เริ่ม Phase II	100	21
048M+C		9 เดือน			79	

049M	ชาย	2 ปี	ALL	New case	32	25
049M+C					24	
050M	หญิง	4 ปี 11 เดือน	ALL	New case	29	34
050M+C					19	
051M	หญิง	9 ปี 1 เดือน	ALL	ครบ Rx	20	-
051M+C					22	
052M	ชาย	16 ปี 6 เดือน	ALL	ครบ Rx	0	-
052M+C					0	
053M	หญิง	6 เดือน	ALL	เริ่ม Phase II	15	-
053M+C					27	
054M	ชาย	12 ปี 9 เดือน	ALL	New case	17	
054M+C					17	
055M	ชาย	5 ปี 3 เดือน	ALL	ครบ Rx	55	13
055M+C					48	
056M	หญิง	4 ปี 5 เดือน	ALL	Relapsed CNS ALL	0	-
056M+C					0	
057M	หญิง	6 ปี	ALL	ครบ Rx	42	-
057M+C					44	
058M	หญิง	6 ปี 6 เดือน	ALL	ครบ Rx	46	-
058M+C					56	
059M	หญิง	4 ปี 9 เดือน	ALL	New case	0	-
059M+C					0	
060M	ชาย	7 ปี 11 เดือน	ALL	เริ่ม Phase Ivb	60	-
060M+C					69	
061M	ชาย	3 ปี 5 เดือน	ALL	เริ่ม Phase II	43	26
061M+C					32	
062M	หญิง	8 เดือน	ALL	New case	28	-
062M+C					41	
063M	ชาย	12 ปี 7 เดือน	AML	New case	70	17
063M+C					58	
064M	หญิง	-	AML	ครบ Rx	11	45
064M+C					6	
065M	หญิง	2 ปี 11 เดือน	ALL	New case	75	12
065M+C					66	
066M	หญิง	7 ปี 7 เดือน	AML	ครบ Rx	29	3
066M+C					28	
067M	ชาย	3 ปี 9 เดือน	ALL	New case (ได้รับ antibiotic)	92	10
067M+C					83	
068M	หญิง	12 ปี	AML	New case	58	5

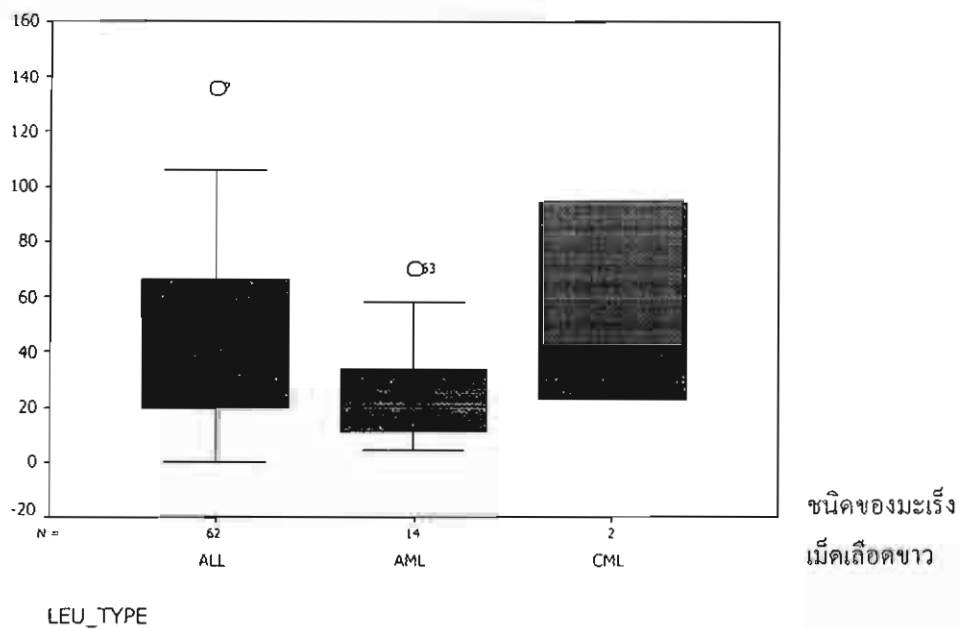
068M+C		3 เดือน			55	
069M	หญิง	2 ปี	ALL	ครบ Phase I	59	-
069M+C		8 เดือน			73	
070M	หญิง	7 ปี	ALL	ครบ Phase I	57	2
070M+C		9 เดือน			56	
071M	ชาย	10 ปี	ALL	ครบ Phase I	0	-
071M+C		2 เดือน			0	
072M	ชาย	8 ปี	ALL	ครบ Rx	24	-
072M+C		1 เดือน			40	
073M	ชาย	5 ปี	ALL	ครบ Rx	78	51
073M+C		3 เดือน			38	
074M	หญิง	12 ปี	CML	-	23	-
074M+C		8 เดือน			145	
075M	ชาย	7 ปี	ALL	ครบ Rx	29	-
075M+C		2 เดือน			35	
076M	หญิง	15 ปี	ALL	ครบ Rx	37	-
076M+C					47	
077M	ชาย	12 ปี	Relapsed AML	Maintenance phase	16	-
077M+C		11 เดือน			34	
078M	ชาย	8 ปี	ALL	ครบ Rx	23	39
078M+C		6 เดือน			14	
079M	ชาย	2 ปี	ALL	new case	0	-
079M+C		7 เดือน			0	
080M	ชาย	3 ปี	ALL	new case	ปริมาณน้อย	
080M+C		11 เดือน				
081M	หญิง	4 ปี	ALL	new case (ได้รับ antibiotic)	65	65
081M+C		11 เดือน			23	
082M	หญิง	9 ปี	ALL	ครบ Phase I	ปริมาณน้อย	
082M+C		5 เดือน				
083M	หญิง	1 ปี	AML	ครบ Phase I	ปริมาณน้อย	
083M+C		11 เดือน				
084M	หญิง	1 ปี	AML	ครบ Phase I	10	-
084M+C		6 เดือน			18	
085M	ชาย	10 ปี	ALL	new case	20	60
085M+C		1 เดือน			8	

เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *MDR1*



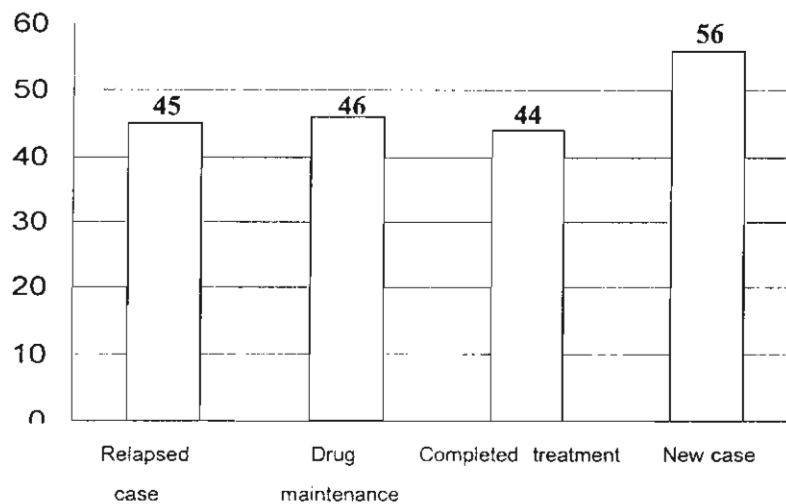
รูปที่ 47 แสดงเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *MDR1* กับผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวในกลุ่มต่างๆ

เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *MDR1*



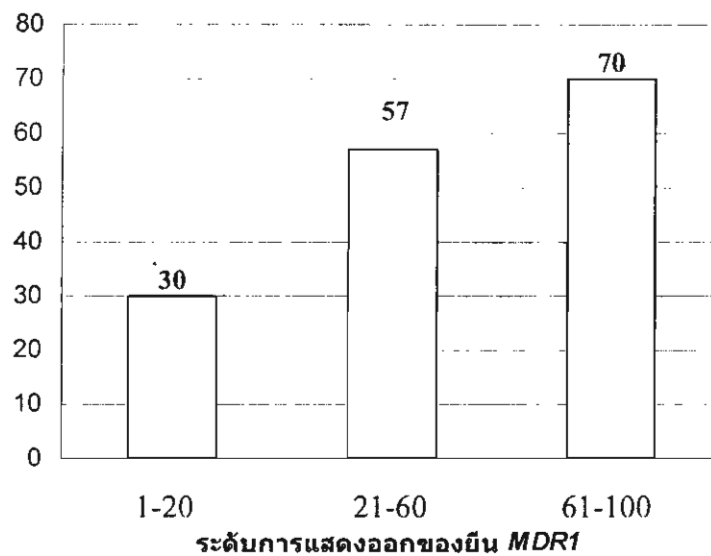
รูปที่ 48 แสดงเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *MDR1* ในผู้ป่วยลิวคีเมียชนิด ALL AML และ CML

เปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1*



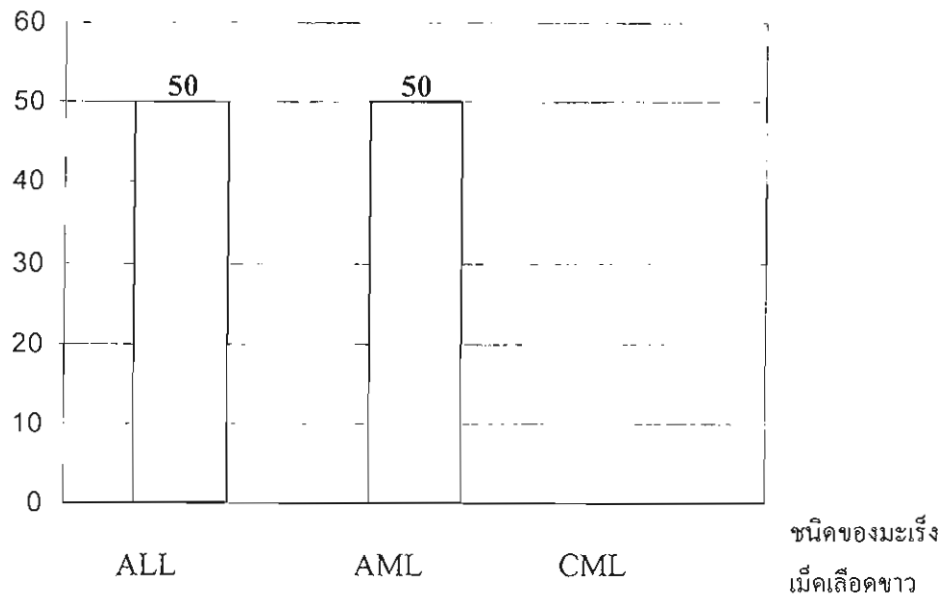
รูปที่ 49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1* เมื่อได้รับเคอร์คิวมิน เมื่อพิจารณาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มารับการรักษาในแต่ละกลุ่ม

เปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1*



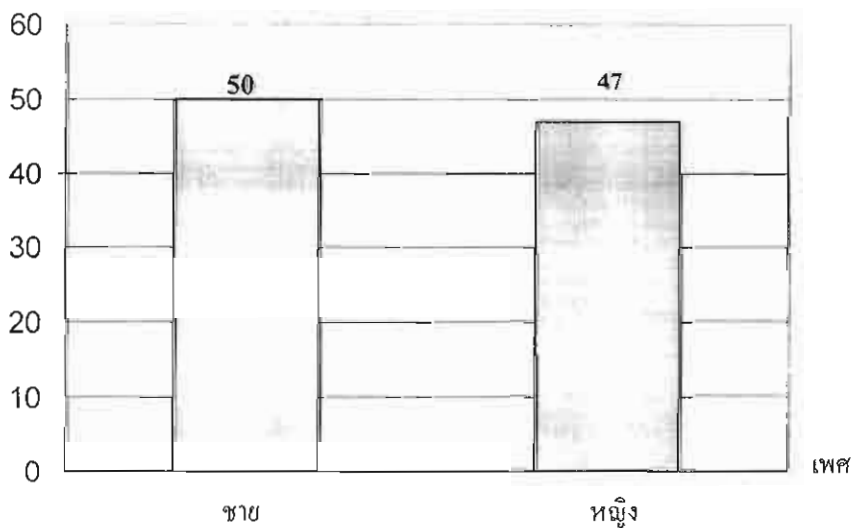
รูปที่ 50 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1* เมื่อได้รับเคอร์คิวมินกับระดับการแสดงออกของยีน *MDR1*

เปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1*

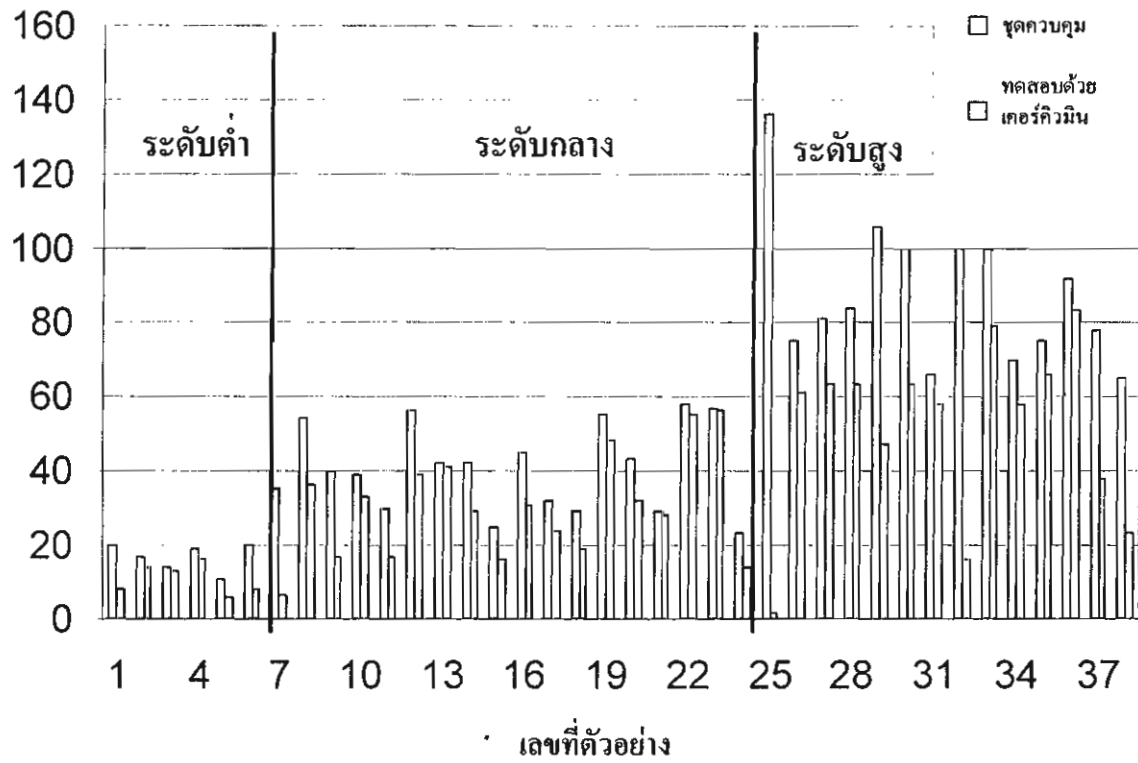


รูปที่ 51 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1* เมื่อได้รับเคอร์คิวมินกับชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

เปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1*



รูปที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของยีน *MDR1* เมื่อได้รับเคอร์คิวมินกับเพศ

% *MDR1* gene expression

รูปที่ 53 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในรายต่าง ๆ ที่ได้รับและไม่ได้รับเคอร์คิวมิน

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่มีการลดลงของการแสดงออกของยีน *MDR1* ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม
ที่ระดับการแสดงออกของยีนต่างกัน

ระดับการแสดงออก	กลุ่มผู้ป่วย	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
ต่ำ (1-20%)	New case	2	33.33
	Completed treatment	1	16.67
	Drug maintenance	3	50
	Relapsed case	0	0
กลาง (21-60%)	New case	5	27.78
	Completed treatment	5	27.78
	Drug maintenance	4	22.22
	Relapsed case	4	22.22
สูง (61-100%)	New case	6	42.86
	Completed treatment	2	14.29
	Drug maintenance	5	35.71
	Relapsed case	1	7.14

2. การศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วยเม็ดเลือดขาว

การศึกษาผลของเคอร์คิวมิน (เป็นเคอร์คิวมินอยด์รวมจากบริษัท Sigma-Aldrich ประกอบด้วย เคอร์คิวมิน, ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน, และบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ในสัดส่วนของเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 77 : 17 : 3) ต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งทำการตรวจสอบผลของการแสดงออกโดยวิธี semiquantitative RT-PCR การศึกษาครั้งนี้ได้นำเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจากไขกระดูกมาทำการเพาะเลี้ยงแบบ primary culture โดยทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินที่ ความเข้มข้น 10 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Anuchapreeda และคณะ (72) และ Limtrakul และคณะ (73) ซึ่งตัวอย่างผลการทดลองที่ได้หลังการ run agarose gel electrophoresis แสดงในรูปที่ 54

ผลการศึกษาในตัวอย่างจำนวน 70 ราย อายุอยู่ในช่วง 6 เดือนถึง 16 ปี 6 เดือน (ในรายที่มีอายุ 16 ปี 6 เดือนนั้นได้เข้ารับการรักษาดังแต่อายุ 15 ปี) ซึ่งการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อระดับของ *WT1* mRNA โดยใช้การแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์ K562 เป็น positive control (100%) พบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดระดับของ *WT1* mRNA ได้ในเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกของผู้ป่วยจำนวน 40 รายในผู้ป่วยทั้งหมด 70 ราย หรือคิดเทียบเป็น 57% โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ได้หลังจาก run agarose gel electrophoresis แสดงในรูปที่ 55-81 และเมื่อวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้เครื่อง scan densitometer (Gel doc BIO-RAD) โดยใช้ K562 เป็น positive control และปรับปริมาตรโดยใช้ β -actin พบว่าในแต่ละตัวอย่างจะได้ค่าการแสดงออกของยีน *WT1* ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 8 จากข้อมูลผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดนี้สามารถแยกพิจารณาผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีน *WT1* โดยแบ่งเป็น 1) เพศของผู้ป่วย 2) ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยแยกออกเป็น ALL, AML และ CML 3) กลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษาโดยแยกออกเป็นกลุ่มผู้ป่วยใหม่ (new cases), ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง (relapsed cases), ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด (drug maintenance) และกลุ่มผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม (completed treatment) 4) ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ ต่ำ (1-20%), ปานกลาง (21-60%) และสูง (61-100%) เช่นเดียวกันกับการทดลองในยีน *MDR1*

จากผลการทดลอง เมื่อพิจารณาตามเพศของผู้ป่วย คือ เพศชายและเพศหญิง (แสดงระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ดังในรูปที่ 82) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมินเท่ากับ 49 และ 69% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 83 ซึ่งเมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีนในเพศชายและหญิง พบว่าเพศชายมีการกระจายตัวของระดับการแสดงออกของ

ขึ้น *WT1* ที่น้อยกว่าเพศหญิง แต่มีค่ามัธยฐาน (median) ที่สูงกว่าเพศหญิงเล็กน้อยซึ่งไม่ถือว่าไม่มีความแตกต่าง แต่พบว่าเพศหญิงมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่าเพศชายถึง 20 % ซึ่งจะต้องศึกษาต่อไป ถึงปัจจัยที่ทำให้เพศหญิงดูเหมือนจะมีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่าเพศชาย

เมื่อแยกพิจารณาตามชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยแยกเป็นผู้ป่วย ALL, AML และ CML (แสดงระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ดังในรูปที่ 84) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 60%, 40% และ 50% ตามลำดับโดยเทียบกับจำนวนทั้งหมดในแต่ละชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 85 ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลองนี้ พบว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL การกระจายตัวของระดับการแสดงออกของยีน *WT1* และค่ามัธยฐานที่มากกว่า AML และ CML ตามลำดับแต่ถือว่าไม่มีความแตกต่าง เมื่อพิจารณาชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่า ALL มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่า CML และ AML ตามลำดับ ซึ่ง ALL มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่า AML ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะต้องศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น หรือศึกษาถึงปัจจัยที่ทำให้ ALL มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินที่ดีกว่า AML ต่อไป

เมื่อพิจารณาในกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา โดยแยกเป็นผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด และผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม (แสดงระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ดังในรูปที่ 86) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 64%, 50%, 58% และ 50% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 87 เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา พบว่าการกระจายตัวของระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้งที่มากกว่าผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด ตามลำดับ โดยค่ามัธยฐานของผู้ป่วยใหม่และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้งมีระดับที่สูงกว่าผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด และผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรมแล้ว ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด โดยอาจเกิดจากยาเคมีบำบัดไปมีผลลดระดับและ/หรือทำลายเซลล์ตัวอ่อนซึ่งจะมีการแสดงออกของยีน *WT1* ที่สูงเนื่องจาก *WT1* มีส่วนส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (cell differentiation) ดังนั้นเมื่อมีเซลล์ตัวอ่อนลดลงจึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ลดลงและลดลงอย่างเห็นได้ชัดในผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ในตัวอย่างพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือพบเซลล์ตัวแก่มากขึ้นรวมทั้งมีการกระจายของเซลล์เม็ดเลือดขาวใกล้เคียงกับคนปกติ นั่นคือมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงใกล้เคียงระดับปกติและยังพบเซลล์ที่แตก

สลายแล้ว (smudge cell และ basket cell) กระจายอยู่ทั่วสไลด์ และเมื่อพิจารณารูปที่ 87 พบว่าผู้ป่วยในทุกกลุ่มมีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในระดับที่ใกล้เคียงกัน จึงอาจจะเป็นไปได้ที่จะนำเคอร์คิวมินมาใช้รักษาผู้ป่วยได้ทุกกลุ่ม โดยจะต้องทำการศึกษาต่อไป

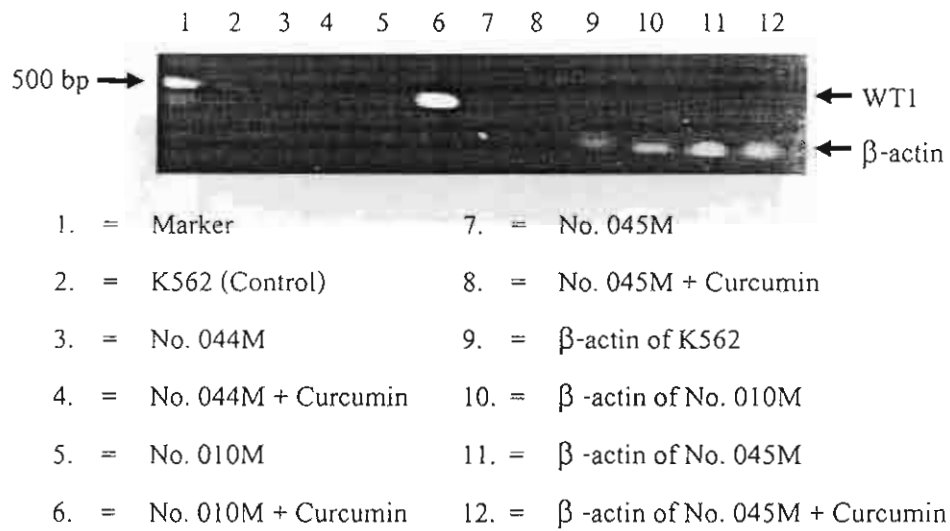
เมื่อแยกการพิจารณาระดับของการแสดงออกของยีน *WT1* ออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ, ปานกลาง และสูง (แสดงระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ดังในรูปที่ 88-90 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบเฉพาะตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน) ซึ่งได้จากชุดควบคุมที่ยังไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างของเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกที่มีปริมาณของ *WT1* mRNA ลดลงเท่ากับ 40%, 67% และ 78% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 91 โดยได้แสดงรายละเอียดของตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *WT1* จำนวน 6 รายไว้ในตารางที่ 13 เมื่อพิจารณารูปที่ 91 พบว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของยีนที่ต่ำนั้น มีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่ตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน น้อยกว่าระดับปานกลางและสูงอย่างเห็นได้ชัด โดยในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนที่ต่ำนั้น พบว่าจำนวนส่วนใหญ่ที่ตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน อยู่ในกลุ่มของผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด, ผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง ตามลำดับ ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับปานกลาง พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด รองลงมาคือผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง ตามลำดับ เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนที่ต่ำ ส่วนผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับสูง พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 14 และสามารถพิจารณาเพิ่มเติมระหว่างระดับการแสดงออกของยีนใน 3 ระดับนี้กับชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในตารางที่ 15 ซึ่งพบว่าในทุกระดับ ALL มีจำนวนที่ตอบสนองมากกว่า AML หรือ CML แล้วแต่กรณี ดังนั้นควรศึกษาในผู้ป่วยจำนวนรายที่มากกว่านี้ โดยเฉพาะ CML นอกจากนี้ยังสามารถพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *WT1* ในกลุ่มชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวกับกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษาได้ในตารางที่ 12 ซึ่งจะพิจารณาเฉพาะใน ALL เนื่องจากมีจำนวนมากพอที่จะวิเคราะห์ผลได้ โดยจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในผู้ป่วย ALL ไม่ว่าจะเป็นผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด หรือผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรมต่างมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในระดับที่ใกล้เคียงกัน

โดยรวมแล้วพบว่า ในแต่ละกลุ่มที่ได้ทำการแยกพิจารณาไม่มีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน ยกเว้นกลุ่มที่พิจารณาในส่วนของการแสดงออกของยีน *WT1*

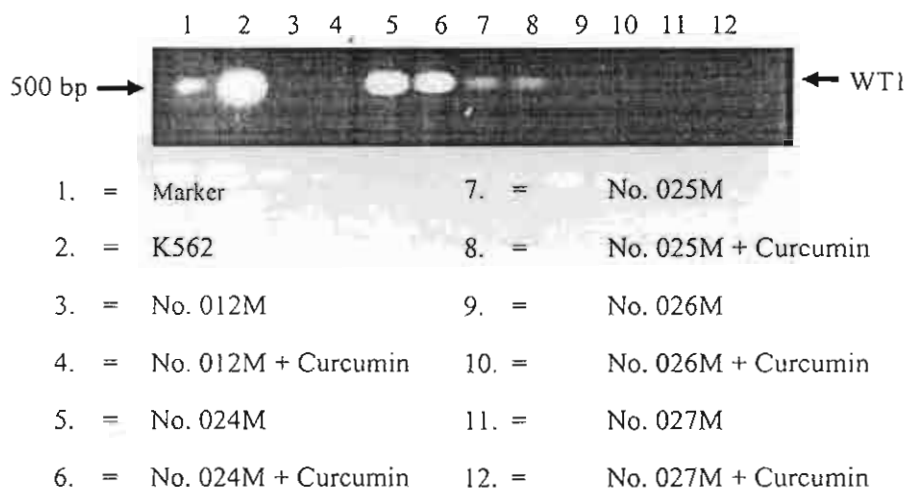


1. = Marker (1 kb ladder)
2. = ---
3. = K562 (WT1)
4. = ตัวอย่างที่ 084M (WT1)
5. = ตัวอย่างที่ 084M + Curcumin (WT1)
6. = ตัวอย่างที่ 085M (WT1)
7. = ตัวอย่างที่ 085M + Curcumin (WT1)
8. = K562 (β-actin)
9. = ตัวอย่างที่ 084M (β-actin)
10. = ตัวอย่างที่ 084M + Curcumin (β-actin)
11. = ตัวอย่างที่ 085M (β-actin)
12. = ตัวอย่างที่ 085M + Curcumin (β-actin)

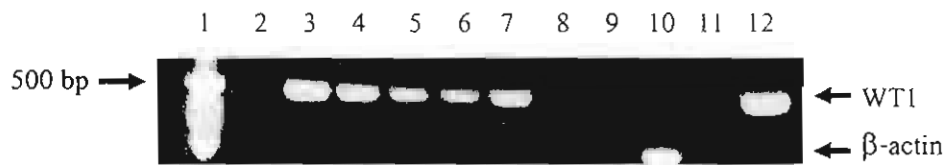
รูปที่ 54. แสดงตัวอย่างของการทำ electrophoresis ในตัวอย่างที่ 084M และ 085M เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ด้วยวิธี RT-PCR โดยวัดระดับ *WT1* mRNA ด้วยการนำไปวิ่งใน 0.75% Agarose gel ซึ่ง *WT1* มีขนาด 474 bp และ β-actin มีขนาด 201 bp



รูปที่ 55. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 010M, 044M และ 045M

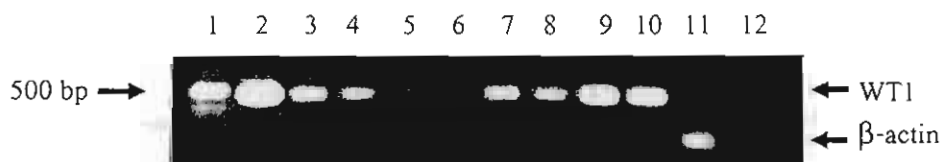


รูปที่ 56. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 012M, 024M, 025M, 026M และ 027M



- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1. = Marker | 7. = No. 018M + Curcumin |
| 2. = --- | 8. = No. 019M |
| 3. = K562 | 9. = No. 019M + Curcumin |
| 4. = No. 017M | 10. = β-actin of K562 |
| 5. = No. 017M + Curcumin | 11. = --- |
| 6. = No. 018M | 12. = K562 |

รูปที่ 57. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 017M, 018M และ 019M



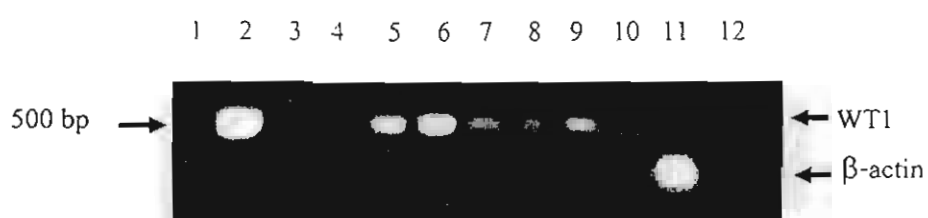
- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 7. = Marker | 1. = No. 022M |
| 8. = K562 | 2. = No. 022M + Curcumin |
| 9. = No. 020M | 3. = No. 023M |
| 10. = No. 020M + Curcumin | 4. = No. 023M + Curcumin |
| 11. = No. 021M | 5. = β-actin of K562 |
| 12. = No. 021M + Curcumin | 6. = H ₂ O |

รูปที่ 58. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 020M, 021M, 022M และ 023M



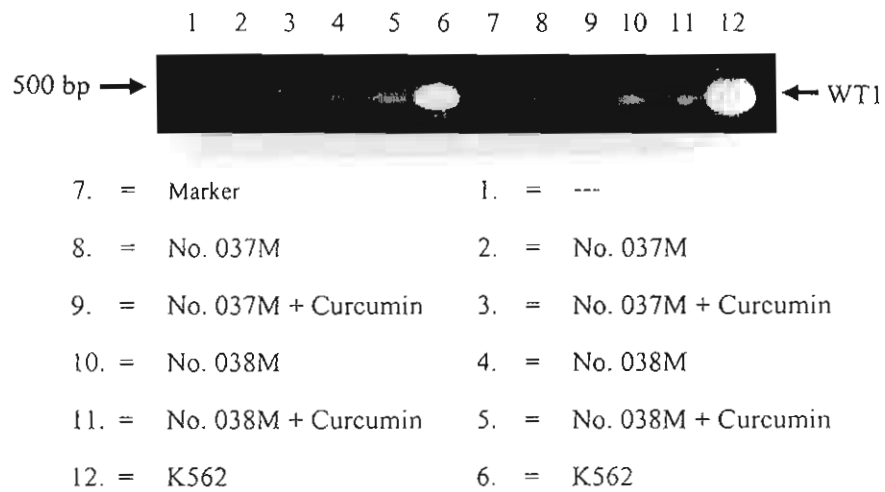
- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1. = Marker | 7. = No. 030M |
| 2. = K562 | 8. = No. 030M + Curcumin |
| 3. = No. 028M | 9. = No. 031M |
| 4. = No. 028M + Curcumin | 10. = No. 031M + Curcumin |
| 5. = No. 029M | 11. = No. 032M |
| 6. = No. 029M + Curcumin | 12. = No. 032M + Curcumin |

รูปที่ 59. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 028M, 029M, 030M, 031M และ 032M

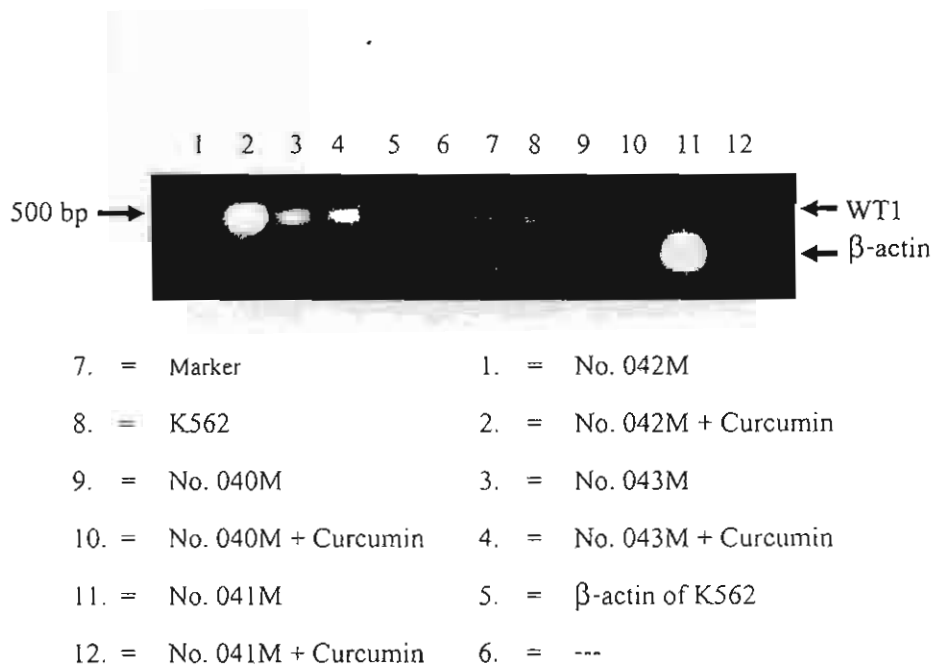


- | | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 7. = Marker | 1. = No. 036M |
| 8. = K562 | 2. = No. 036M + Curcumin |
| 9. = No. 033M | 3. = No. 039M |
| 10. = No. 033M + Curcumin | 4. = No. 039M + Curcumin |
| 11. = No. 035M | 5. = β -actin of K562 |
| 12. = No. 035M + Curcumin | 6. = --- |

รูปที่ 60. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 033M, 035M, 036M และ 039M



รูปที่ 61. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 037M และ 038M

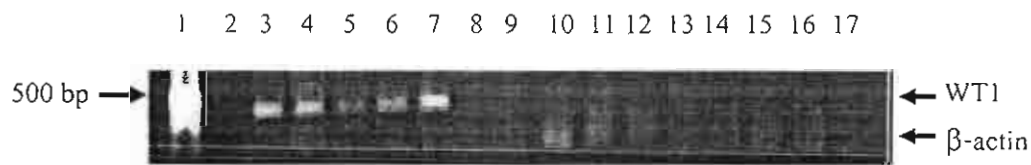


รูปที่ 62. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 040M, 041M, 042M และ 043M



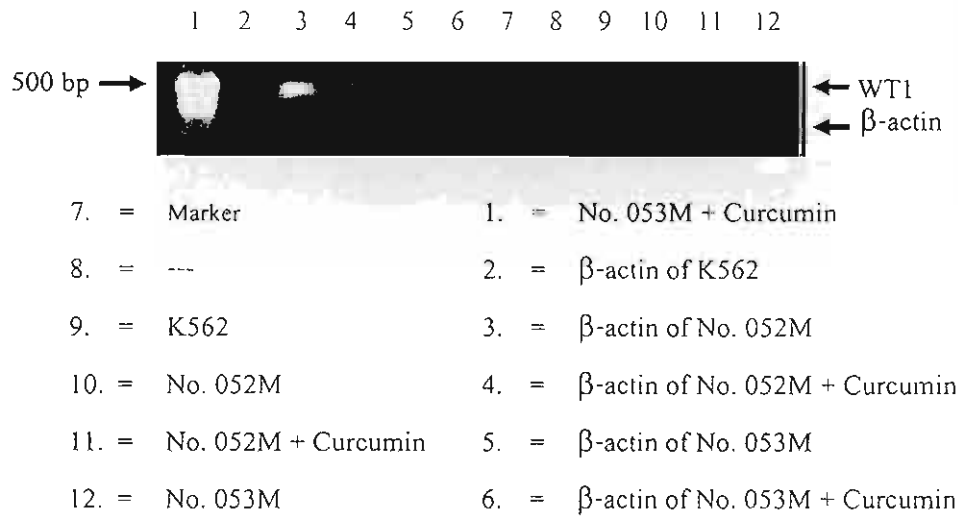
- | | |
|--------------------------|---|
| 1. = Marker | 7. = No. 048M + Curcumin |
| 2. = K562 | 8. = β -actin of K562 |
| 3. = --- | 9. = β -actin of No. 046M |
| 4. = No. 046M | 10. = β -actin of No. 046M + Curcumin |
| 5. = No. 046M + Curcumin | 11. = β -actin of No. 048M |
| 6. = No. 048M | 12. = β -actin of No. 048M + Curcumin |

รูปที่ 63. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 046M และ 048M

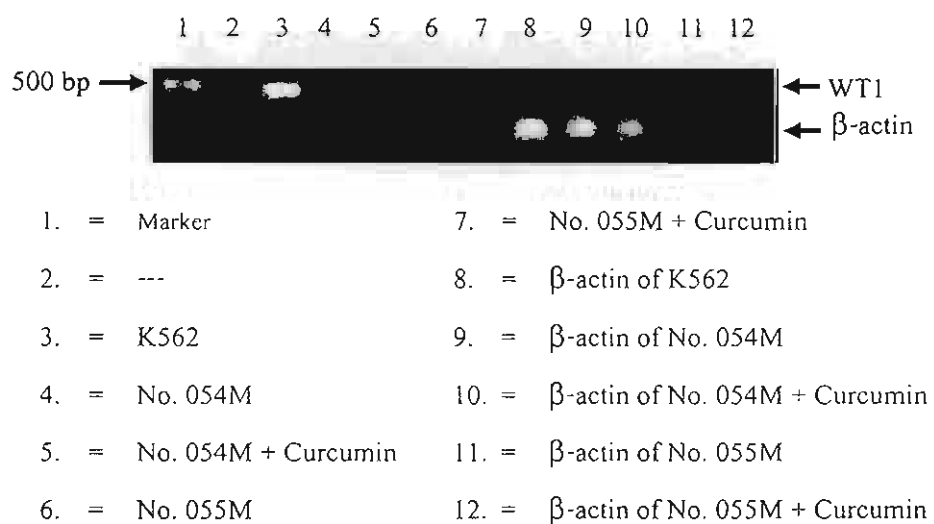


- | | |
|--------------------------|---|
| 1. = Marker | 9. = No. 051M + Curcumin |
| 2. = --- | 10. = β -actin of K562 |
| 3. = K562 | 11. = β -actin of No. 049M |
| 4. = No. 049M | 12. = β -actin of No. 049M + Curcumin |
| 5. = No. 049M + Curcumin | 13. = β -actin of No. 050M |
| 6. = No. 050M | 14. = β -actin of No. 050M + Curcumin |
| 7. = No. 050M + Curcumin | 15. = β -actin of No. 051M |
| 8. = No. 051M | 16. = β -actin of No. 051M + Curcumin |
| | 17. = --- |

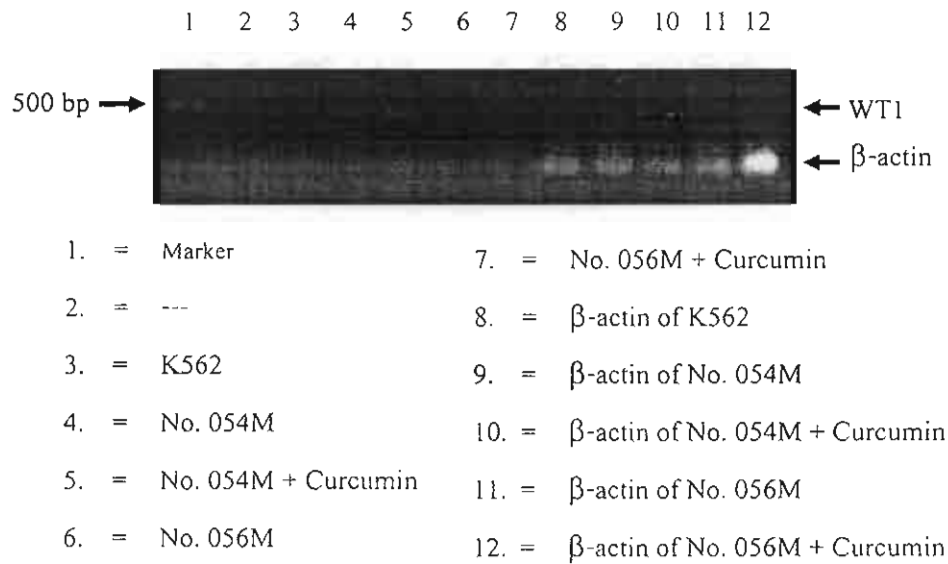
รูปที่ 64. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 049M, 050M และ 051M



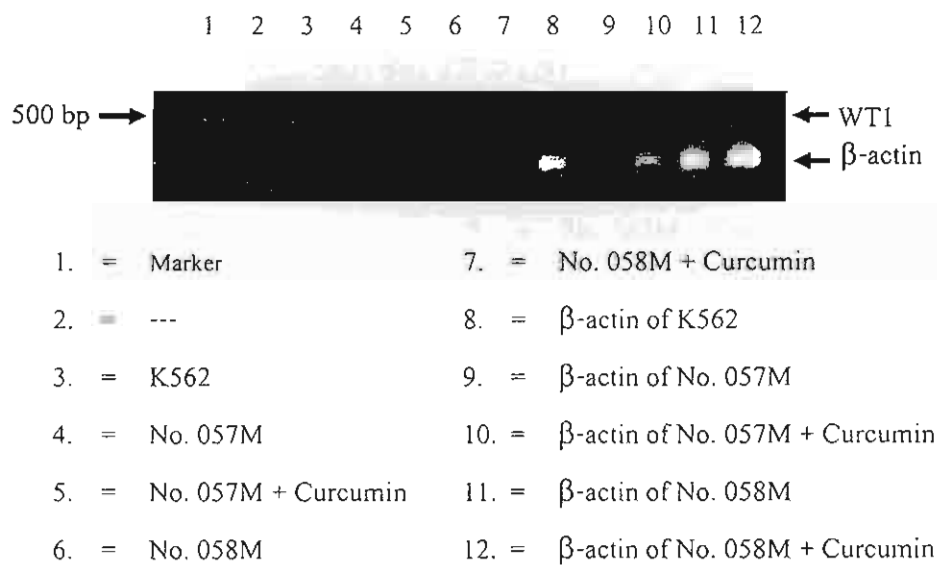
รูปที่ 65. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 052M และ 053M



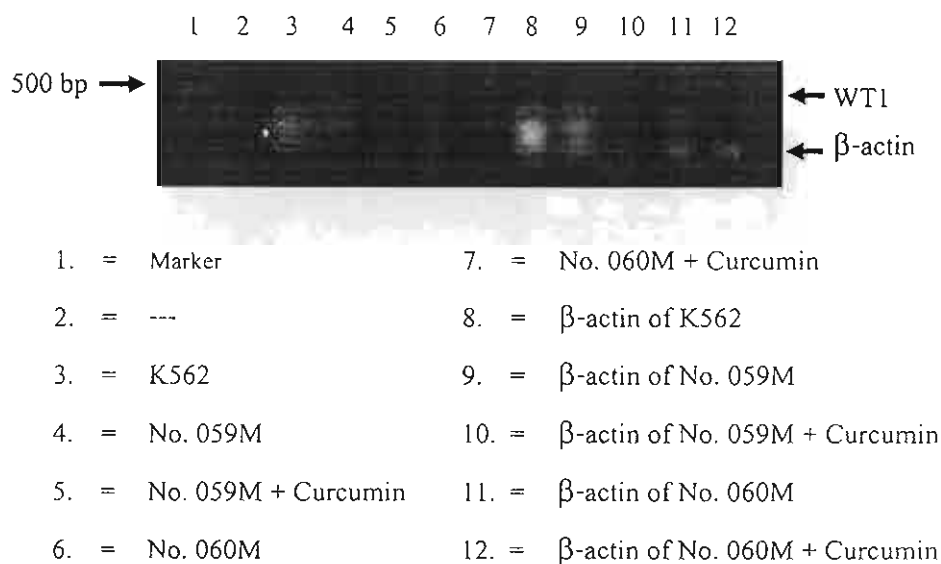
รูปที่ 66. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 054M และ 055M



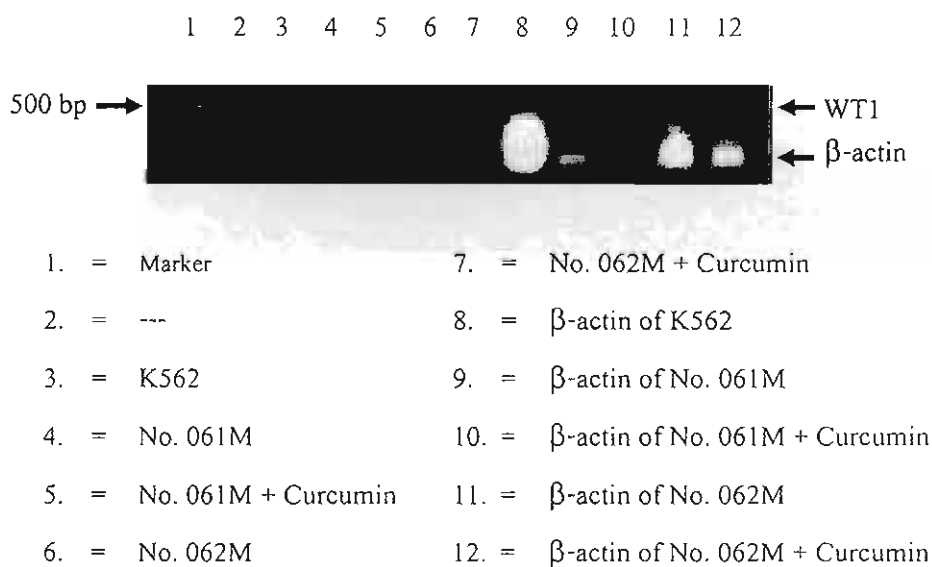
รูปที่ 67. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 054M และ 056M



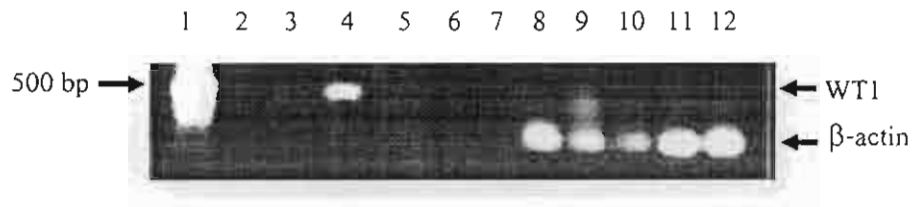
รูปที่ 68. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 057M และ 058M



รูปที่ 69. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 059M และ 060M

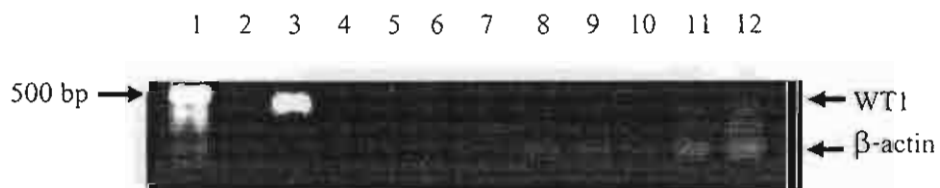


รูปที่ 70. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 061M และ 062M



- | | |
|--------------------------|---|
| 1. = Marker | 7. = No. 064M + Curcumin |
| 2. = --- | 8. = β -actin of K562 |
| 3. = K562 | 9. = β -actin of No. 063M |
| 4. = No. 063M | 10. = β -actin of No. 063M + Curcumin |
| 5. = No. 063M + Curcumin | 11. = β -actin of No. 064M |
| 6. = No. 064M | 12. = β -actin of No. 064M + Curcumin |

รูปที่ 71. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 063M และ 064M



- | | |
|--------------------------|---|
| 1. = Marker | 7. = No. 066M + Curcumin |
| 2. = --- | 8. = β -actin of K562 |
| 3. = K562 | 9. = β -actin of No. 065M |
| 4. = No. 065M | 10. = β -actin of No. 065M + Curcumin |
| 5. = No. 065M + Curcumin | 11. = β -actin of No. 066M |
| 6. = No. 066M | 12. = β -actin of No. 066M + Curcumin |

รูปที่ 72. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 065M และ 066M



- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. = Marker | 7. = No. 070M + Curcumin |
| 2. = --- | 8. = β-actin of K562 |
| 3. = K562 | 9. = β-actin of No. 067M |
| 4. = No. 067M | 10. = β-actin of No. 067M + Curcumin |
| 5. = No. 067M + Curcumin | 11. = β-actin of No. 070M |
| 6. = No. 070M | 12. = β-actin of No. 070M + Curcumin |

รูปที่ 73. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 067M และ 070M



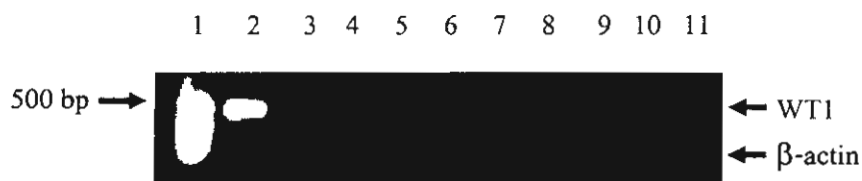
- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. = Marker | 7. = β-actin of K562 |
| 2. = K562 | 8. = β-actin of No. 068M |
| 3. = No. 068M | 9. = β-actin of No. 068M + Curcumin |
| 4. = No. 068M + Curcumin | 10. = β-actin of No. 069M |
| 5. = No. 069M | 11. = β-actin of No. 069M + Curcumin |
| 6. = No. 069M + Curcumin | 12. = K562 |

รูปที่ 74. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 068M และ 069M



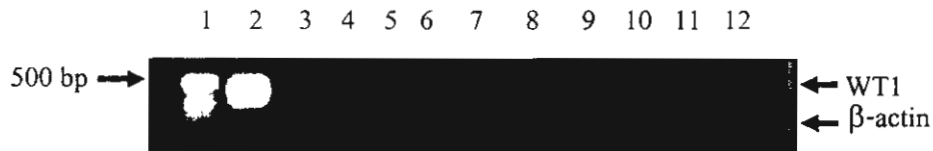
- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. = Marker | 7. = β-actin of K562 |
| 2. = K562 | 8. = β-actin of No. 070M |
| 3. = No. 070M | 9. = β-actin of No. 070M + Curcumin |
| 4. = No. 070M + Curcumin | 10. = β-actin of No. 071M |
| 5. = No. 071M | 11. = β-actin of No. 071M + Curcumin |
| 6. = No. 071M + Curcumin | 12. = K562 |

รูปที่ 75. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 070M และ 071M



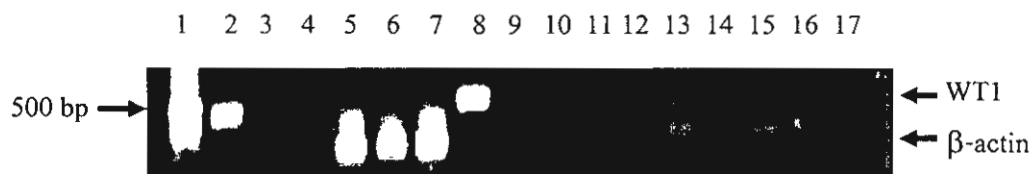
- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. = Marker | 7. = β-actin of K562 |
| 2. = K562 | 8. = β-actin of No. 072M |
| 3. = No. 072M | 9. = β-actin of No. 072M + Curcumin |
| 4. = No. 072M + Curcumin | 10. = β-actin of No. 073M |
| 5. = No. 073M | 11. = β-actin of No. 073M + Curcumin |
| 6. = No. 073M + Curcumin | |

รูปที่ 76. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 072M และ 073M



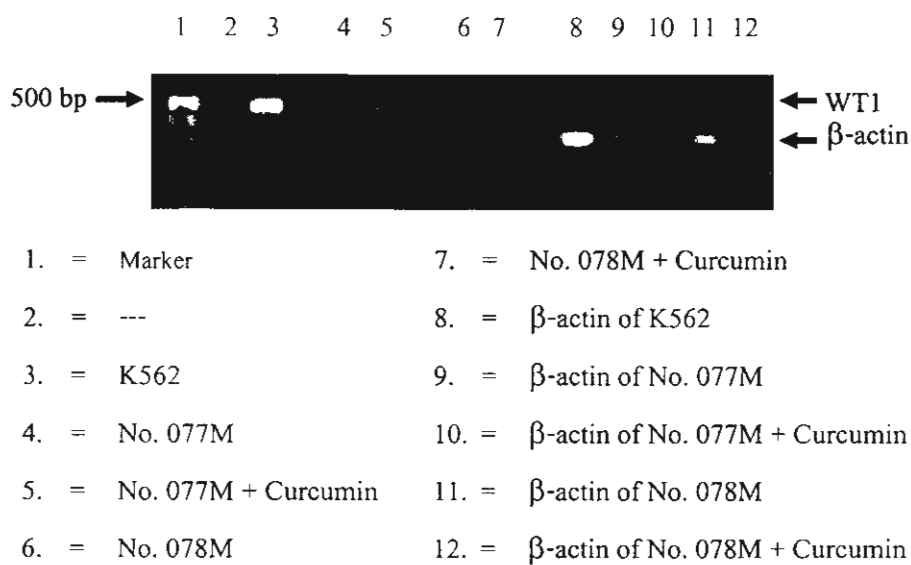
- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. = Marker | 7. = β-actin of K562 |
| 2. = K562 | 8. = β-actin of No. 074M |
| 3. = No. 074M | 9. = β-actin of No. 074M + Curcumin |
| 4. = No. 074M + Curcumin | 10. = β-actin of No. 075M |
| 5. = No. 075M | 11. = β-actin of No. 075M + Curcumin |
| 6. = No. 075M + Curcumin | 12. = β-actin of K562 |

รูปที่ 77. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 074M และ 075M

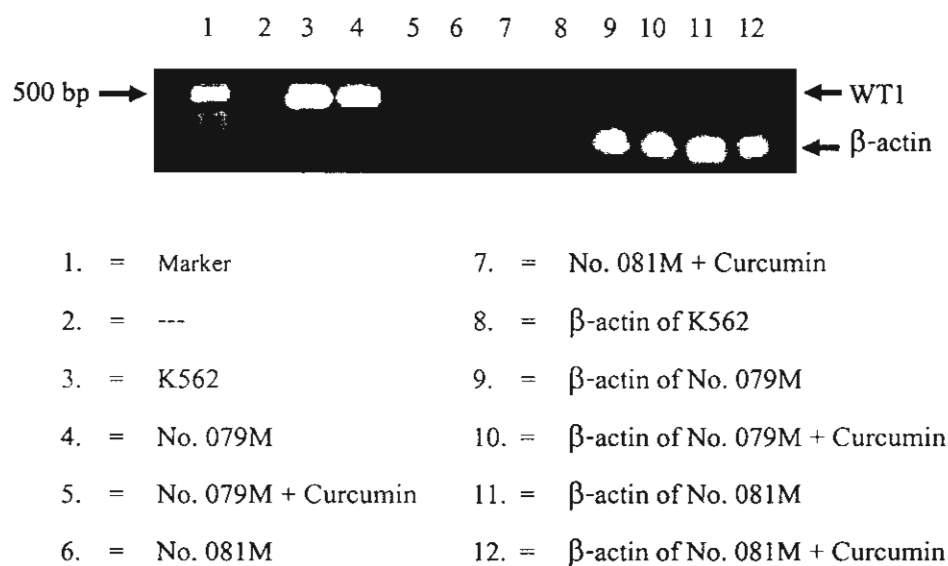


- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. = Marker | 9. = No. 075M |
| 2. = K562 | 10. = No. 075M + Curcumin |
| 3. = No. 075M | 11. = No. 076M |
| 4. = No. 075M + Curcumin | 12. = No. 076M + Curcumin |
| 5. = β-actin of K562 | 13. = β-actin of K562 |
| 6. = β-actin of No. 075M | 14. = β-actin of No. 075M |
| 7. = β-actin of No. 075M + Curcumin | 15. = β-actin of No. 075M + Curcumin |
| 8. = K562 | 16. = β-actin of No. 076M |
| | 17. = β-actin of No. 076M + Curcumin |

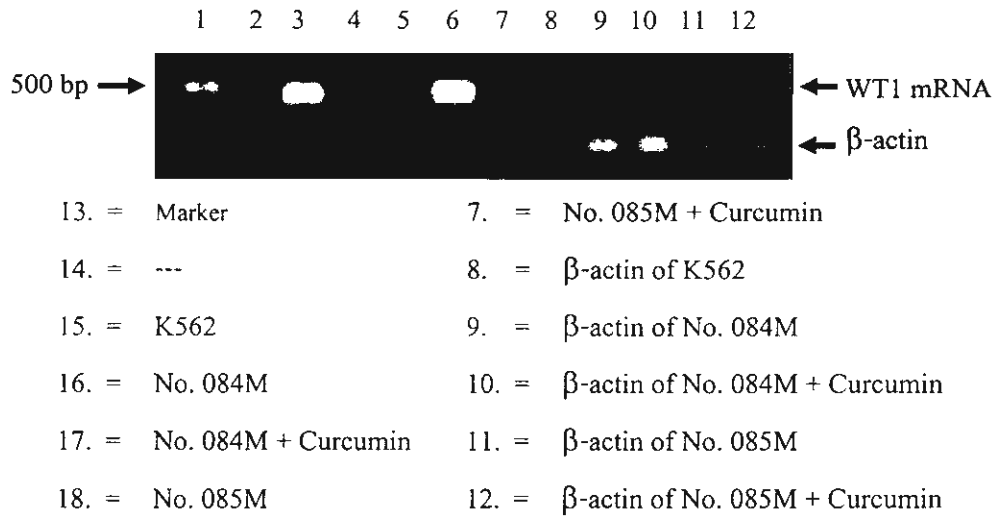
รูปที่ 78. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 075M และ 076M



รูปที่ 79. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 077M และ 078M



รูปที่ 80. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 079M และ 081M



รูปที่ 81. แสดงผลของการทำ electrophoresis ของตัวอย่างที่ 084M และ 085M

จากผลการศึกษานี้ ได้รับตัวอย่างที่เป็นไขกระดูกจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจำนวนทั้งหมด 85 ราย ได้แก่

1. ตัวอย่างที่ไม่สามารถ set PCR ได้ จำนวน	10	ราย
2. ตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยเกินกว่า จะสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ จำนวน	5	ราย
3. ตัวอย่างที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ จำนวน	70	ราย
รวม	85	ราย

หมายเหตุ :

- 1) ตัวอย่างที่ไม่สามารถ set PCR ได้ จำนวน 10 ราย ได้แก่ 001M, 002M, 003M, 004M, 005M, 006M, 007M, 008M, 009M, และ 011M
- 2) ตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมากจนไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ จำนวน 5 ราย ได้แก่ 034M, 047M, 080M, 082M และ 083M

ตัวอย่างทั้งหมด 70 ราย ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ สามารถแบ่งได้เป็น

1.เพศของผู้ป่วย

■ ชาย	41	ราย	คิดเป็น 59%
■ หญิง	29	ราย	คิดเป็น 41%
รวม	70	ราย	คิดเป็น 100%

2. ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

ALL	58	ราย	คิดเป็น 83%
AML	10	ราย	คิดเป็น 14%
CML	2	ราย	คิดเป็น 3%
รวม	70	ราย	คิดเป็น 100%

3. กลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา

■ ผู้ป่วยใหม่	22 ราย	คิดเป็น 31%
■ ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง	8 ราย	คิดเป็น 12%
■ ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด	24 ราย	คิดเป็น 34%
■ ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม	16 ราย	คิดเป็น 23%
รวม	70	ราย คิดเป็น 100%

4. ระดับการแสดงออกของยีน *WT1*

■ ไม่มีการแสดงออก	6	ราย	คิดเป็น 9%
■ ระดับต่ำ (1-20%)	20	ราย	คิดเป็น 28%
■ ระดับปานกลาง (21-60%)	21	ราย	คิดเป็น 30%
■ ระดับสูง (61-100%)	23	ราย	คิดเป็น 33%
รวม	70	ราย	คิดเป็น 100%

ตารางที่ 8. แสดงรายละเอียดของตัวอย่างจากผู้ป่วย, ประวัติผู้ป่วย และการแสดงออกของยีน *WT1*

ตัวอย่างที่	เพศ	อายุ		ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	การได้รับยาเคมีบำบัด	%การแสดงออกของยีน <i>WT1</i>	%การลดลงของยีน <i>WT1</i>
		ปี	เดือน				
010M	ชาย	9	1	ALL	New case	96	-
010M+C						230	
012M	ชาย	8	7	Relapsed ALL	Off Rx. แล้วประมาณ 1 ปี	12	48
012M+C						7	
013M	ชาย	8	-	AML	ครบ Phase II	0	-
013M+C						0	
014M	ชาย	16	-	Relapsed ALL	ช่วง maintenance	0	-
014M+C						0	

015M	ชาย	9	7	ALL	ช่วง Phase IVa เปลี่ยนยา	24	29
015M+C						17	
016M	ชาย	3	8	ALL	New case	0	-
016M+C						0	
017M	หญิง	13	1	AML	New case	91	37
017M+C						57	
018M	ชาย	15	10	Relapsed ALL	Induction ครั้งที่ 3 (relapse 3 รอบ)	100	-
018M+C						111	
019M	หญิง	13	9	ALL	ครบ Rx. (Re induction)	30	87
019M+C						4	
020M	หญิง	15	-	Relapsed ALL	induction ครั้งที่ 2	70	17
020M+C						58	
021M	ชาย	15	3	ALL	Phase IVb	67	-
021M+C						71	
022M	ชาย	1	11	ALL	New case	70	7
022M+C						65	
023M	หญิง	2	9	ALL	New case	89	21
023M+C						70	
024M	ชาย	9	3	ALL	Phase IVb	77	26
024M+C						57	
025M	ชาย	12	9	ALL	เริ่ม Phase IVa M1	39	64
025M+C						14	
026M	ชาย	9	4	ALL	ครบ Phase I	2	100
026M+C						0	
027M	ชาย	4	6	ALL	ครบ Phase I	0	-
027M+C						0	
028M	หญิง	1	9	ALL	ครบ Phase I	100	69
028M+C						31	
029M	ชาย	3	9	ALL	เริ่ม Phase IVb	98	66
029M+C						33	

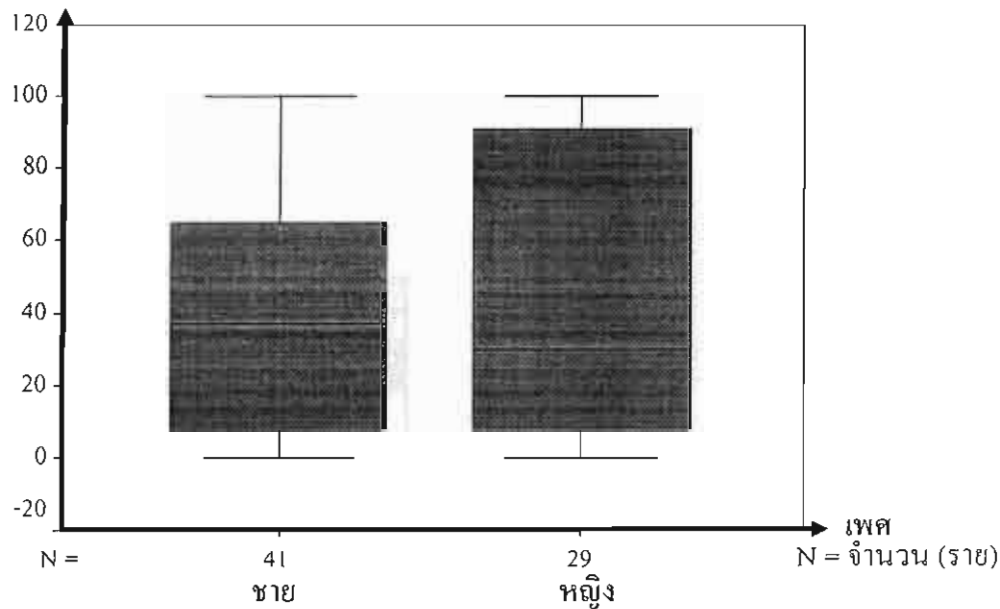
030M	ชาย	6	6	ALL	ช่วง Phase IVb	14	-
030M+C						45	
031M	ชาย	10	7	Relapsed AML	ช่วง drug maintenance	100	-
031M+C						121	
032M	ชาย	-	7	AML	New case	20	-
032M+C						31	
033M	ชาย	9	11	ALL	ครบ Phase I	3	-
033M+C						1	
034M	ชาย	2	-	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
034M+C						ปริมาณน้อย	
035M	ชาย	2	10	ALL	New case	47	-
035M+C						64	
036M	หญิง	9	-	ALL	New case	18	19
036M+C						15	
037M	ชาย	5	9	ALL	ครบ Rx.	13	28
037M+C						9	
038M	หญิง	1	4	Relapsed AML	Induction AML 1 ครบ	25	24
038M+C						19	
039M	ชาย	10	4	ALL	ระหว่าง Phase IVb	33	45
039M+C						18	
040M	ชาย	8	1	ALL	ระหว่าง Phase IVb	45	17
040M+C						37	
041M	ชาย	12	9	CML	ได้รับ Hydrea แล้ว 5 วัน	47	-
041M+C						61	
042M	ชาย	1	5	ALL	New case	21	-
042M+C						24	
043M	หญิง	2	3	ALL	เริ่ม Phase II	9	24
043M+C						7	
044M	หญิง	10	7	ALL	ครบ Rx.	100	2
044M+C						98	

045M	หญิง	6	11	ALL	ครบ Rx.	100	-
045M+C						102	
046M	หญิง	7	5	ALL	New case	57	5
046M+C						54	
047M	ชาย	12	5	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
047M+C						ปริมาณน้อย	
048M	ชาย	12	9	ALL	เริ่ม Phase II	56	23
048M+C						43	
049M	ชาย	2	-	ALL	New case	100	38
049M+C						62	
050M	หญิง	4	11	ALL	New case	100	19
050M+C						81	
051M	หญิง	9	1	ALL	ครบ Rx.	8	57
051M+C						4	
052M	ชาย	16	6	ALL	ครบ Rx.	38	-
052M+C						43	
053M	หญิง	-	6	ALL	เริ่ม Phase II	54	9
053M+C						50	
054M	ชาย	12	9	ALL	New case	41	3
054M+C						39	
055M	ชาย	5	3	ALL	ครบ Rx.	65	7
055M+C						61	
056M	หญิง	4	5	ALL	Relapsed CNS ALL	100	27
056M+C						73	
057M	หญิง	6	-	ALL	ครบ Rx.	100	39
057M+C						61	
058M	หญิง	6	6	ALL	ครบ Rx.	91	4
058M+C						88	
059M	หญิง	4	9	ALL	New case	100	61
059M+C						39	

060M	ชาย	7	11	ALL	เริ่ม Phase IVb	100	13
060M+C						87	
061M	ชาย	3	5	ALL	เริ่ม Phase II	5	-
061M+C						7	
062M	หญิง	-	8	ALL	New case	7	-
062M+C						7	
063M	ชาย	12	7	AML	New case	50	51
063M+C						25	
064M	หญิง	-	-	ALL	ครบ Rx.	4	-
064M+C						3	
065M	หญิง	2	11	ALL	New case	7	-
065M+C						7	
066M	หญิง	7	7	AML	ครบ Rx.	7	-
066M+C						8	
067M	ชาย	3	9	ALL	New case	8	59
067M+C						3	
068M	หญิง	12	3	AML	New case	55	2
068M+C						54	
069M	หญิง	2	8	ALL	Phase I ครบ	27	15
069M+C						23	
070M	หญิง	7	9	ALL	Phase I ครบ	0	-
070M+C						0	
071M	ชาย	10	2	ALL	Phase I ครบ	37	-
071M+C						38	
072M	ชาย	8	1	ALL	ครบ Rx.	5	-
072M+C						5	
073M	ชาย	5	3	ALL	ครบ Rx.	0	-
073M+C						0	
074M	หญิง	12	8	CML	ช่วง drug maintenance	7	90
074M+C						1	

075M	ชาย	7	2	ALL	ครบ Rx.	6	-
075M+C						21	
076M	หญิง	15	-	ALL	ครบ Rx.	8	-
076M+C						30	
077M	ชาย	12	11	Relapsed AML	ได้รับยาถึง maintenance phase	36	-
077M+C						38	
078M	ชาย	8	6	ALL	ครบ Rx.	26	19
078M+C						21	
079M	ชาย	2	7	ALL	New case	62	54
079M+C						28	
080M	ชาย	3	11	ALL	New case	ปริมาณน้อย	-
080M+C						ปริมาณน้อย	
081M	หญิง	4	11	ALL	New case	29	-
081M+C						29	
082M	หญิง	9	5	ALL	Phase I ครบ	ปริมาณน้อย	-
082M+C						ปริมาณน้อย	
083M	หญิง	1	11	AML	Phase I ครบ (4 weeks)	ปริมาณน้อย	-
083M+C						ปริมาณน้อย	
084M	หญิง	1	6	AML	Phase I ครบ (6 weeks)	4	-
084M+C						9	
085M	ชาย	10	1	ALL	New case	100	78
085M+C						22	

หมายเหตุ : การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การแสดงออก (% expression) ของยีน *WT1* นั้นใช้วิธีการเทียบค่าจากเซลล์ K562 ที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* สูง (100%) และใช้ β -actin เป็นตัวปรับปริมาณ (normalization)

ระดับของ *WT1* mRNA (%) ในตัวอย่าง

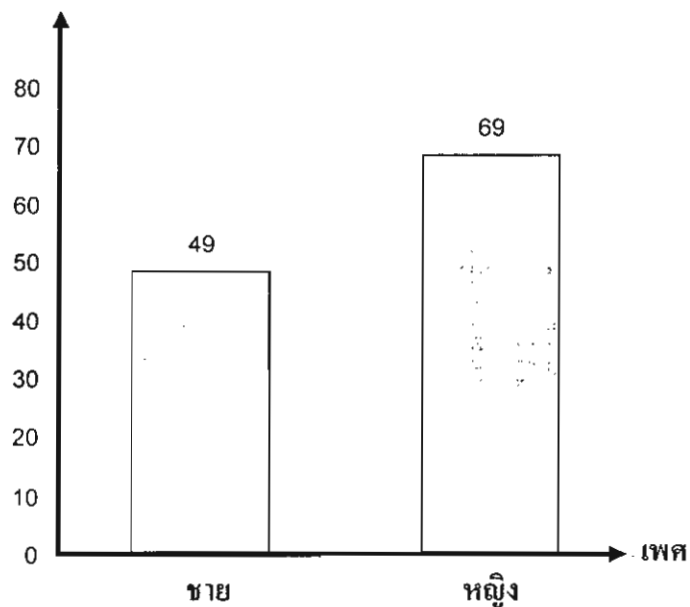
รูปที่ 82. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ในตัวอย่าง โดยศึกษาจากระดับของ *WT1* mRNA (%) ในตัวอย่างไขกระดูกของผู้ป่วยกับเพศของผู้ป่วย

ตารางที่ 9. แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน เมื่อพิจารณาตามเพศของผู้ป่วย

เพศ	จำนวนทั้งหมด (ราย)	จำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน <i>WT1</i> ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ราย)	เปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม
ชาย	41	20	49*
หญิง	29	20	69**
รวม	70	40	57***

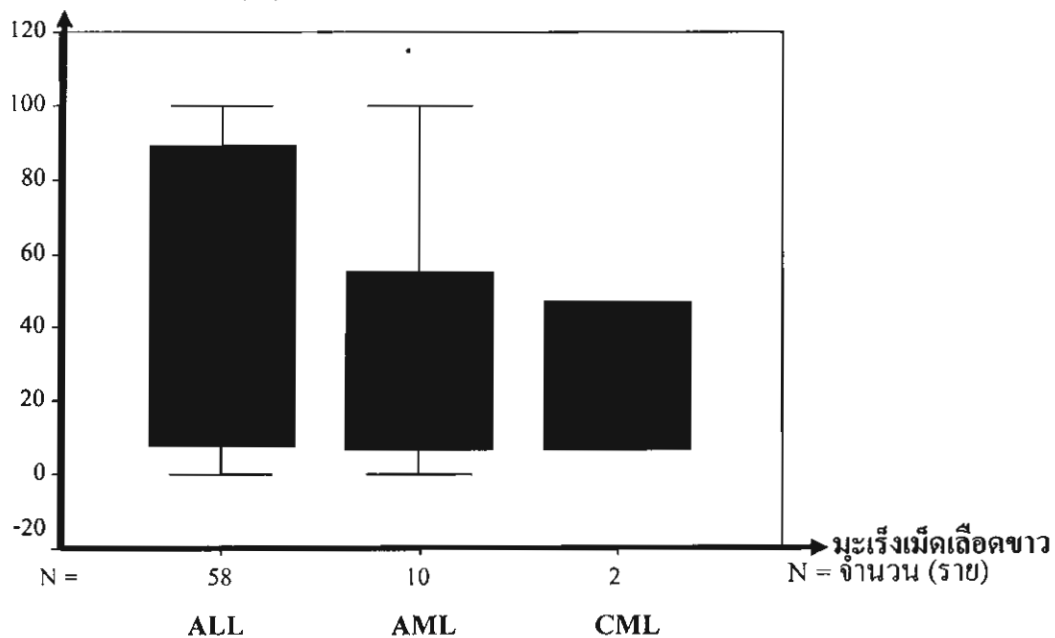
หมายเหตุ : วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม คือ 49^* คำนวณจาก $(20 \times 100) / 41$, 69^{**} คำนวณจาก $(20 \times 100) / 29$ และ 57^{***} คำนวณจาก $(40 \times 100) / 70$

จำนวนผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อเคมีบำบัดในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วย (%)



รูปที่ 83. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยเมื่อเทียบกับในแต่ละกลุ่มที่มีระดับ WT1 mRNA ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคมีบำบัดกับเพศของผู้ป่วย

ระดับของ WT1 mRNA (%) ในตัวอย่าง



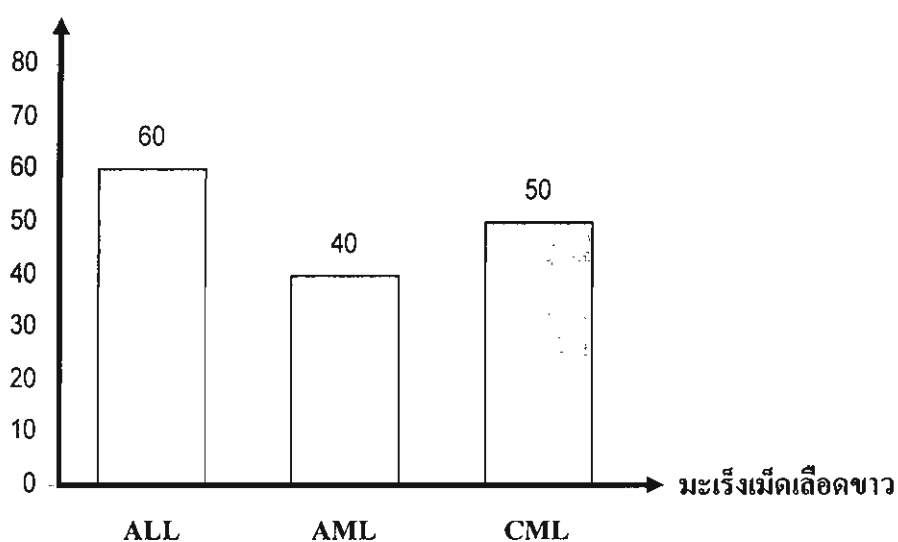
รูปที่ 84. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ในตัวอย่าง โดยศึกษาจากระดับของ WT1 mRNA (%) ในตัวอย่างไขกระดูกของผู้ป่วยกับชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย

ตารางที่ 10. แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อพิจารณาตามชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

ชนิดของ มะเร็งเม็ด เลือดขาว	จำนวน ทั้งหมด (ราย)	จำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออก ของยีน <i>WT1</i> ลดลงเมื่อทดสอบ ด้วยเคอร์คิวมิน (ราย)	เปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มี การตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม
ALL	58	35	60
AML	10	4	40
CML	2	1	50
รวม	70	40	57

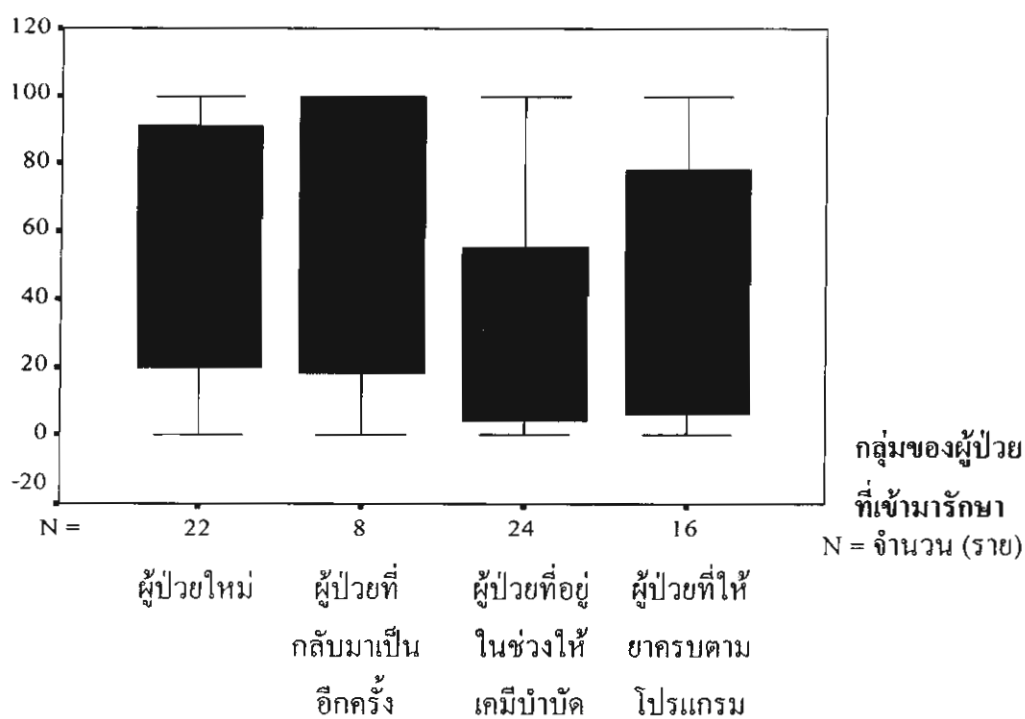
หมายเหตุ : วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกับในตารางที่ 5

จำนวนผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วย (%)



รูปที่ 85. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยเมื่อเทียบกับในแต่ละกลุ่มที่มีระดับ *WT1* mRNA ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมินกับชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย

ระดับของ WT1 mRNA (%) ในตัวอย่าง



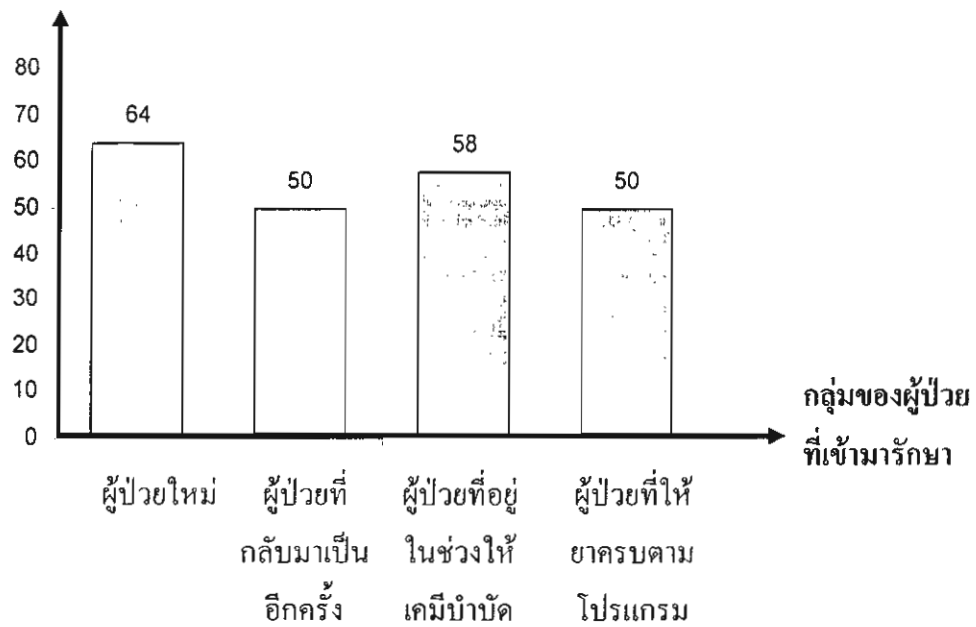
รูปที่ 86. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ในตัวอย่าง โดยศึกษาจากระดับของ WT1 mRNA (%) ในตัวอย่างไขกระดูกของผู้ป่วยกับกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา

ตารางที่ 11. แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อพิจารณาตามกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา

กลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา	จำนวนทั้งหมด (ราย)	จำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน <i>WT1</i> ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ราย)	เปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม
ผู้ป่วยใหม่	22	14	64
ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง	8	4	50
ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด	24	14	58
ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม	16	8	50
รวม	70	40	57

หมายเหตุ : วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกับในตารางที่ 5

จำนวนผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อเคมีบำบัดในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วย (%)

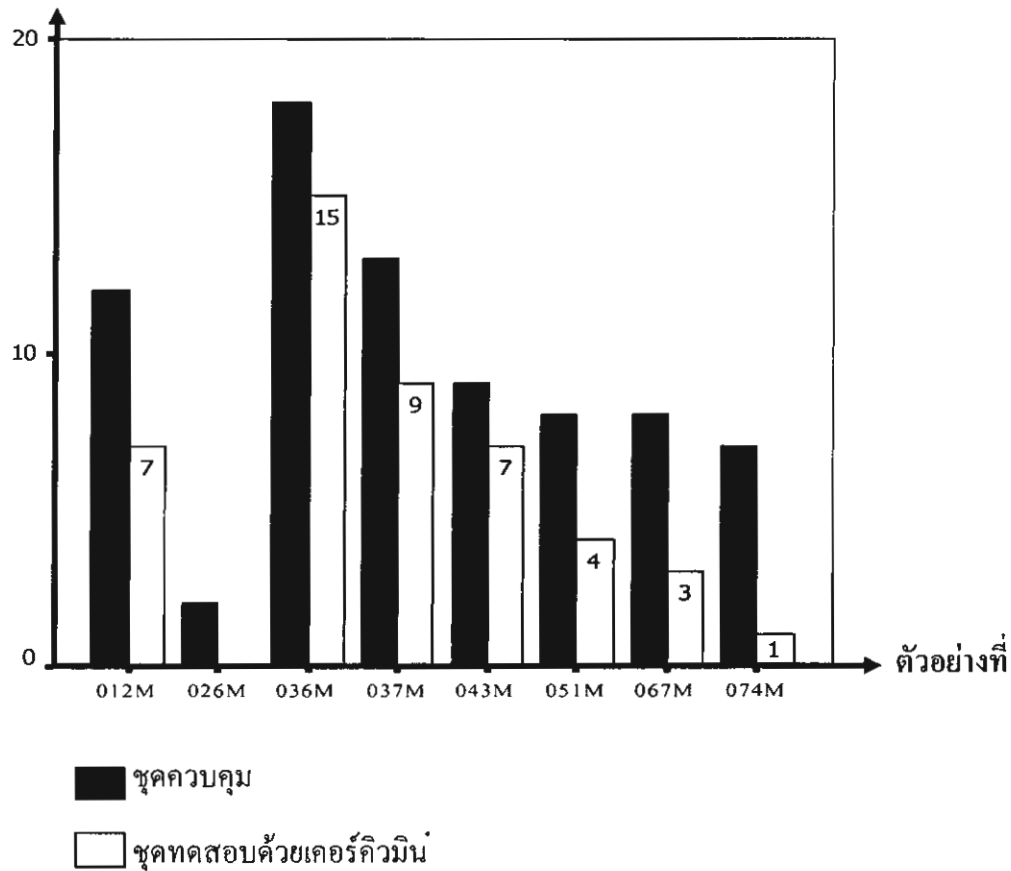


รูปที่ 87. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยเมื่อเทียบกับในแต่ละกลุ่มที่มีระดับ WT1 mRNA ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคมีบำบัดกับกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา

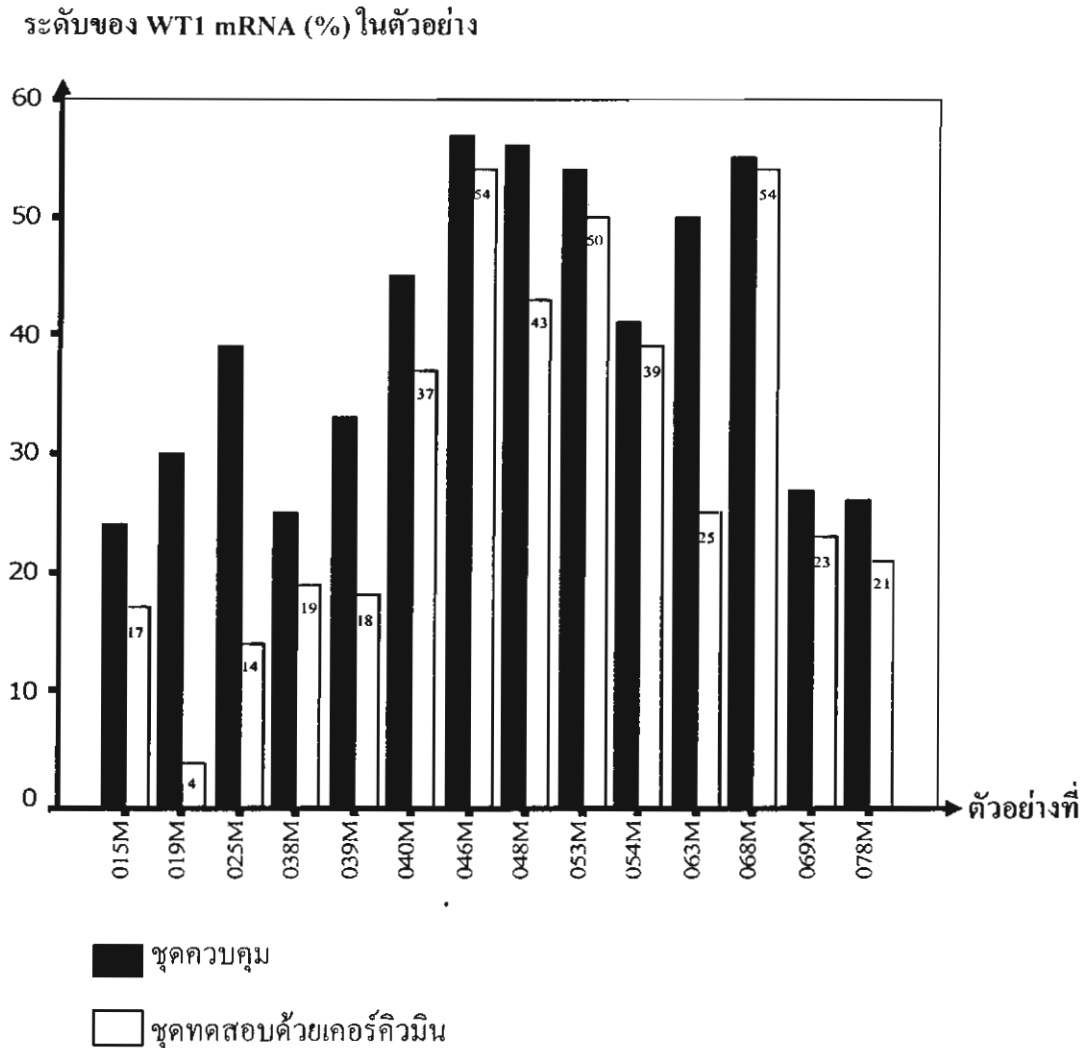
ตารางที่ 12. แสดงรายละเอียดของตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *WT1* จำนวน 6 ราย

ตัวอย่างที่	เพศ	ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	กลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา
013M	ชาย	AML	ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด
014M	ชาย	ALL	ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง
016M	ชาย	ALL	ผู้ป่วยใหม่
027M	ชาย	ALL	ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด
070M	หญิง	ALL	ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด
073M	ชาย	ALL	ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม

ระดับของ WT1 mRNA (%) ในตัวอย่าง

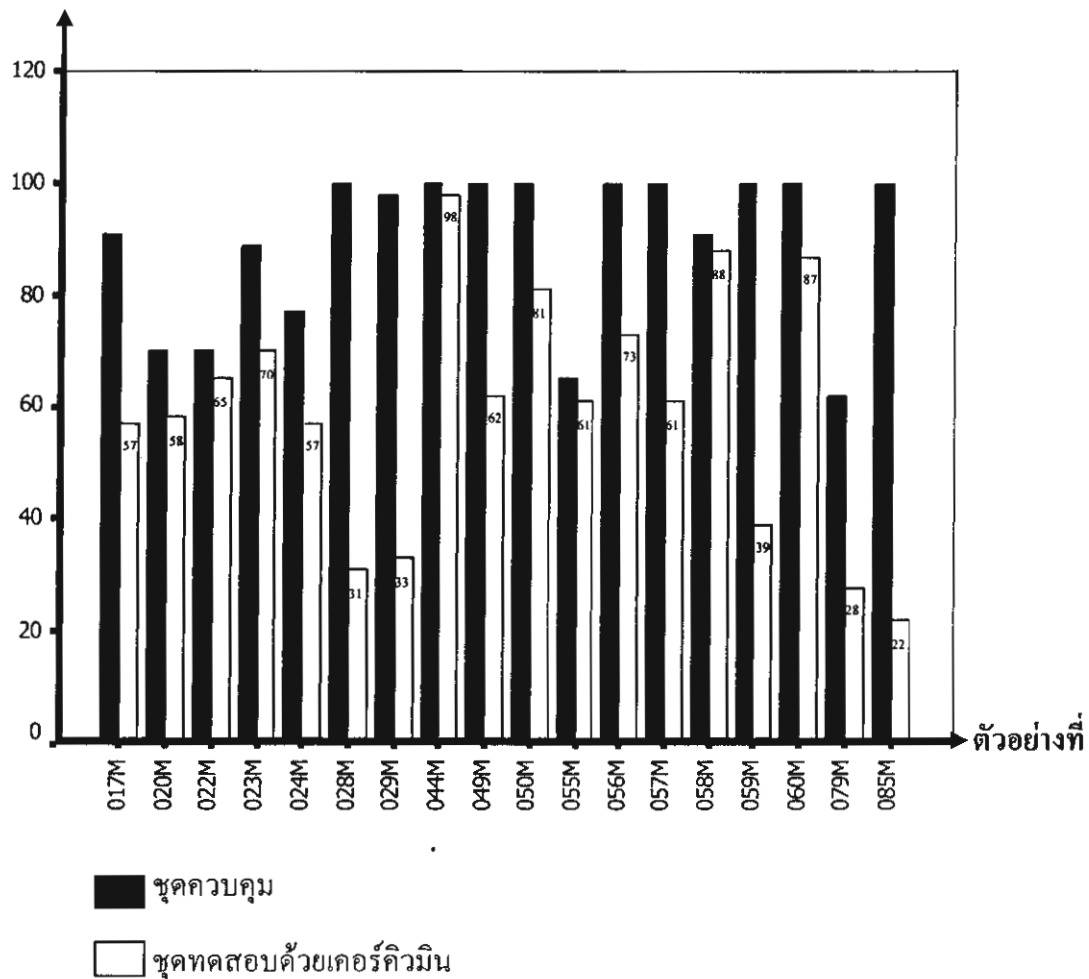


รูปที่ 88. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *WT1* ในตัวอย่างรายที่มีระดับต่ำ (1-20%) และมีการการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน คือ มีการลดลงของ *WT1* mRNA เมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน จำนวน 8 รายใน 20 รายของตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับต่ำทั้งหมดโดยเปรียบเทียบระดับ *WT1* mRNA ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ชุดควบคุม) กับที่ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน



รูปที่ 89. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *WT1* ในตัวอย่างรายที่มีระดับปานกลาง (21-60%) และมีการการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน คือ มีการลดลงของ *WT1* mRNA เมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน จำนวน 14 รายใน 21 รายของตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับปานกลางทั้งหมดโดยเปรียบเทียบระดับ *WT1* mRNA ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ชุดควบคุม) กับที่ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน

ระดับของ WT1 mRNA (%) ในตัวอย่าง



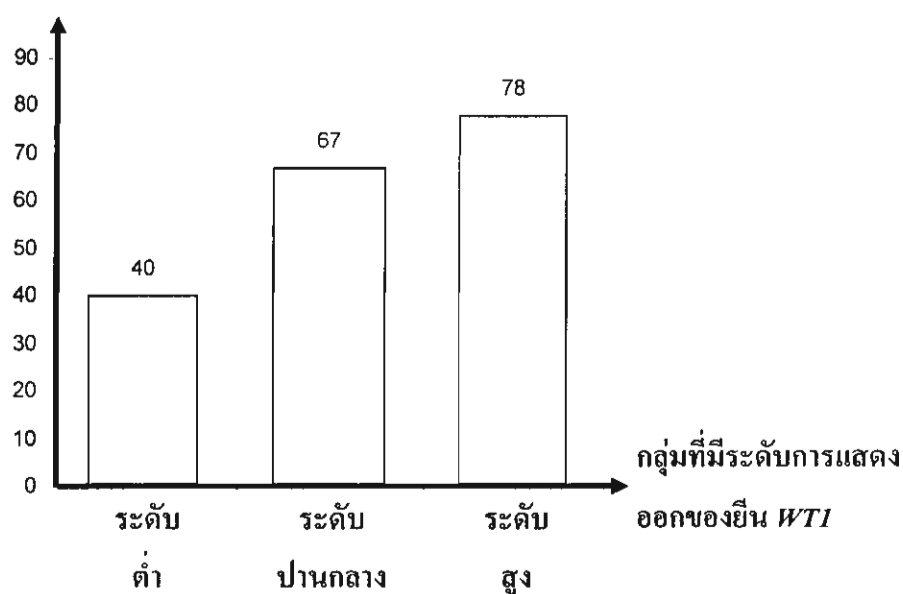
รูปที่ 90. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *WT1* ในตัวอย่างรายที่มีระดับสูง (61-100%) และมีการการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน คือ มีการลดลงของ *WT1* mRNA เมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน จำนวน 18 รายใน 23 รายของตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับสูงทั้งหมดโดยเปรียบเทียบระดับ *WT1* mRNA ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ชุดควบคุม) กับที่ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน

ตารางที่ 13. แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน เมื่อพิจารณาตามระดับการแสดงออกของยีน *WT1*

ระดับการแสดงออกของยีน <i>WT1</i>	จำนวน ทั้งหมด (ราย)	จำนวนตัวอย่างที่มีการ แสดงออกของยีน <i>WT1</i> ลดลงเมื่อทดสอบ ด้วยเคอร์คิวมิน (ราย)	เปอร์เซ็นต์จำนวนตัว อย่างที่มีตอบสนอง ต่อเคอร์คิวมินเมื่อ เทียบในแต่ละกลุ่ม
ไม่มีการแสดงออก	6	0	0
ระดับต่ำ	20	8	40
ระดับปานกลาง	21	14	67
ระดับสูง	23	18	78
รวม	70	40	57

หมายเหตุ : วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกับในตารางที่ 5

จำนวนผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วย (%)



รูปที่ 91. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์จำนวนผู้ป่วยเมื่อเทียบกับในแต่ละกลุ่มที่มีระดับ *WT1* mRNA ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมินกับกลุ่มที่มีการแสดงออกของยีน *WT1*

ตารางที่ 14. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ใน 3 ระดับกับกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา

	ระดับต่ำ			ระดับปานกลาง			ระดับสูง			รวม R
	รวม	ลด	% ลด	รวม	ลด	% ลด	รวม	ลด	% ลด	
NC	5	2	40*	7	4	57**	9	8	89***	21
RC	1	1	100	2	1	50	4	2	50	7
DM	7	3	43	9	7	78	5	4	80	21
CT	7	2	29	3	2	67	5	4	80	15
รวม C	20	8	40	21	14	67	23	18	78	64

หมายเหตุ : ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ใน 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ, ระดับปานกลางและระดับสูง รวม หมายถึงจำนวนทั้งหมด (ราย), ลด หมายถึงจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ราย), % ลด หมายถึงเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม, NC หมายถึงผู้ป่วยใหม่, RC หมายถึงผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, DM หมายถึงผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด, CT หมายถึงผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม, รวม C หมายถึงจำนวนตัวอย่างรวมในแต่ละสคัมภ์ และรวม R หมายถึงจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในสคัมภ์ 'รวม' ของแต่ละแถว ซึ่งจำนวนตัวอย่างรวมทั้งหมด 64 ราย เนื่องจากมีตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *WT1* จำนวน 6 ราย โดยตัวอย่างวิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม คือ 40* คิดจาก $(2 \times 100) / 5$, 57** คิดจาก $(4 \times 100) / 7$ และ 89*** คิดจาก $(8 \times 100) / 9$

ตารางที่ 15. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ใน 3 ระดับกับชนิดของ มะเร็งเม็ดเลือดขาว

	ระดับต่ำ			ระดับปานกลาง			ระดับสูง			รวม R
	รวม	ลบ	% ลบ	รวม	ลบ	% ลบ	รวม	ลบ	% ลบ	
ALL	16	7	44	16	11	69	21	17	81	53
AML	3	0	0	4	3	75	2	1	50	9
CML	1	1	100	1	0	0	0	0	0	2
รวม C	20	8	40	21	14	67	23	18	78	64

หมายเหตุ : ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ใน 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ, ระดับปานกลางและระดับสูง รวม หมายถึงจำนวนทั้งหมด (ราย), ลบ หมายถึงจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ราย), % ลบ หมายถึงเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม, ALL AML และ CML คือชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว, รวม C หมายถึงจำนวนตัวอย่างรวมในแต่ละสคัมภ์ และรวม R หมายถึงจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในสคัมภ์ 'รวม' ของแต่ละแถว ซึ่งจำนวนตัวอย่างรวมทั้งหมด 64 ราย เนื่องจากมีตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *WT1* จำนวน 6 ราย โดยตัวอย่างวิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกับในตารางที่ 10

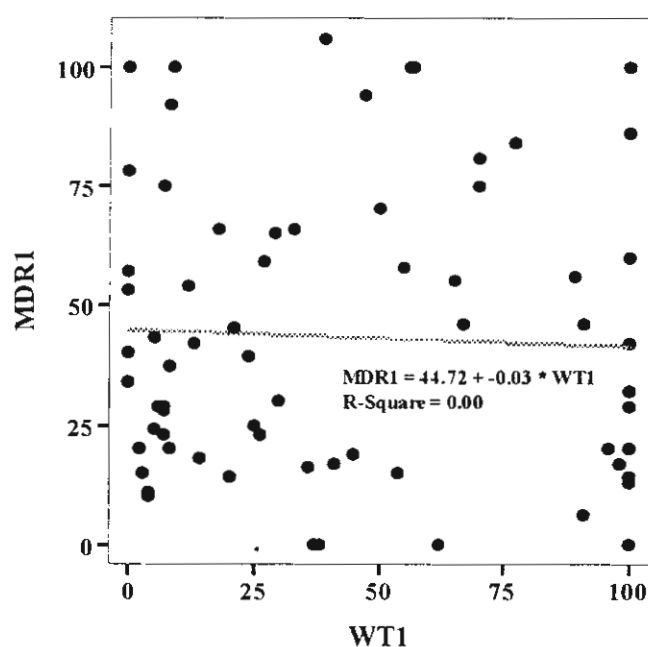
ตารางที่ 16. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวกับกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามา
รักษา

	ALL			AML			CML			รวม R
	รวม	ลด	% ลด	รวม	ลด	% ลด	รวม	ลด	% ลด	
NC	18	11	61	4	3	75	0	0	0	22
RC	5	3	60	3	1	33	0	0	0	8
DM	20	13	65	2	0	0	2	1	50	24
CT	15	8	53	1	0	0	0	0	0	16
รวม C	58	35	60	10	4	40	2	1	50	70

หมายเหตุ : ALL AML และ CML คือชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว, รวม หมายถึงจำนวนทั้งหมด (ราย), ลด หมายถึงจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (ราย), % ลด หมายถึงเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม, NC หมายถึงผู้ป่วยใหม่, RC หมายถึงผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, DM หมายถึงผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด, CT หมายถึงผู้ป่วยที่ให้อาครตามโปรแกรม, รวมC หมายถึงจำนวนตัวอย่างรวมในแต่ละสคัมภ์ และรวม R หมายถึงจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในสคัมภ์ “รวม” ของแต่ละแถว โดยตัวอย่างวิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกับในตารางที่ 10

3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *WT1*

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน พบว่า ยีนทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน เมื่อพิจารณาจากกราฟที่ได้ พบว่าการกระจายข้อมูลนั้นมีการกระจายข้อมูลค่อนข้างมาก และไม่ไปตามทฤษฎีที่ว่าด้วยความสัมพันธ์ระหว่างยีนทั้ง 2 และค่าความสัมพันธ์ คือค่า R มีค่าเท่ากับ 0.00 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความไม่สัมพันธ์กันของข้อมูลที่ได้ ดังแสดงรูปที่ 92



รูปที่ 92 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *WT1*

บทวิจารณ์

จากการทดลองทั้งหมดนี้ พบว่าการแสดงออกของยีน *MDR1* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว มีความแตกต่างกันในแต่ละราย อาจเนื่องมาจากการรักษาที่แตกต่างกัน ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว รวมทั้งความแตกต่างระหว่างบุคคล ซึ่งส่งผลทำให้เกิดความแตกต่างของการแสดงออกของยีนได้ โดยความแตกต่างเหล่านี้เกิดจาก polymorphism ของยีน *MDR1* มีผลทำให้การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด หรือต่อเคอร์คิวมินนั้นแตกต่างกันออกไป Mickley ในปี 1998 (76) ได้พบว่า ยีน *MDR1* ในมนุษย์นั้นมี polymorphisms ในส่วนที่เป็น SNPs (Single nucleotide polymorphisms) ที่ exons 21 และ 24 ในผู้ป่วยมะเร็ง, drug resistant cell lines, ในเซลล์ refractory malignant maligomas รวมทั้งอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีด้วย ลักษณะของ polymorphism ของ drug transporter นี้สามารถใช้เพื่ออธิบายการตอบสนองต่อยาที่มีความแตกต่างกันในคนไข้ได้เป็นอย่างดี เมื่อพิจารณาในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วยพบว่า ผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มที่กำลังให้ยาเคมีบำบัด มีแนวโน้มของการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่สูงกว่าในกลุ่มที่ให้ยาครบตามโปรแกรม, กลุ่มที่กลับมาเป็นใหม่ ส่วนกลุ่มคนไข้ใหม่นั้นมีการแสดงออกของยีน *MDR1* ในระดับที่สูงกว่าทั้ง 3 กลุ่ม ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า กลุ่มคนไข้ใหม่ที่กำลังเข้าทำการรักษาในโรงพยาบาลมหาสารคามครั้งนี้ พบว่าอาจจะได้รับการกระตุ้นจากสารเคมีที่ใช้ในการรักษามะเร็งมาก่อนหน้าที่จะเข้ารับการรักษาก็เป็นได้ โดยทางโรงพยาบาลไม่ทราบประวัติมาก่อนซึ่งต้องทำการซักประวัติผู้ป่วยใหม่ให้ละเอียดอีกครั้งหนึ่ง เมื่อทำการสอบถามประวัติ พบว่าผู้ป่วยหลายรายก่อนที่จะเข้ามารับการรักษา มีอาการไข้หรือไม่สบายมาก่อน ดังนั้นจึงมีการรับประทานยาทั้งที่เป็นยาลดไข้ หรือยาปฏิชีวนะหลายชนิดมาก่อนหน้าที่จะเข้ามารับการรักษา และยังพบอีกว่าในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML มีการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าชนิด ALL และ AML แต่ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวในจำนวนที่ไม่เท่ากัน การแปลผลอาจเกิดความผิดพลาดได้ ซึ่งจากรายงานที่เคยมี พบว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML มีการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่ค่อนข้างสูงกว่า ALL และ CML (77) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยนั้นส่วนใหญ่เป็น ALL และมีปริมาณของตัวอย่างในแต่ละชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไม่เท่ากัน จึงทำให้ไม่สามารถสรุปในส่วนนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามเราสามารถกล่าวได้ว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของยีน *MDR1* สูงจึงมีแนวโน้มที่จะเกิดการดื้อยาก่อนข้างสูง เนื่องจากยาสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *MDR1* และเมื่อทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้เคอร์คิวมินจากบริษัท Sigma-Aldrich ที่ความเข้มข้น 10 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นความเข้มข้นที่ยังอิงมาจากการศึกษาเคอร์คิวมินในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (72,73) และเมื่อทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากการทดสอบด้วย เคอร์คิวมินพบ

ว่าเซลล์มีชีวิตรอดเท่ากับ $86 \pm 13\%$ โดยการทดสอบด้วยวิธี MTT assay การทดลองพบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของยีน *MDR1* ได้ใน 49% ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยที่ไม่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินอีก 51% (หรือประมาณครึ่งหนึ่ง) เป็นไปได้ว่าผู้ป่วยรายนั้นอาจมีการแสดงออกของ drug transporter ชนิดอื่นร่วมอยู่ด้วย เช่น Multidrug resistance associated protein (MRP) เป็นต้น หรือการที่ยีน *MDR1* มีลักษณะของ polymorphisms ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงทำให้เซลล์มะเร็งของผู้ป่วยในกลุ่มนี้ไม่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินก็อาจจะเป็นไปได้ จากการศึกษายังพบอีกว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นใหม่มีจำนวนรายหลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน ลดลงเฉลี่ย 45 %, กลุ่มที่อยู่ในช่วงให้ยาเคมีบำบัด 46%, ให้ยาครบตามโปรแกรม 44% และกลุ่มผู้ป่วยใหม่ 56% ของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม และเมื่อพิจารณาเป็นระดับการแสดงออกของยีนพบว่าที่ระดับต่ำ (1-20%) เคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของยีนได้ 30%, ระดับกลาง (21-60%) 57% และระดับสูง (60-100%) 70% ของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีนในระดับที่ต่ำ สามารถตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้น้อย ซึ่งน่าจะเป็นผลที่น่าพอใจ เนื่องจากเมื่อมีการแสดงออกของยีนที่สูงขึ้น จะทำให้เคอร์คิวมินมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนมากขึ้น ทำให้เป็นแนวทางที่ดีที่จะสามารถนำเคอร์คิวมินมาใช้ เพื่อลดปริมาณของการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่ระดับปานกลางและสูงได้เป็นอย่างดี โดยระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ลดลงตั้งแต่ 2-97% ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างมาก แต่จะมีการยับยั้งมากเมื่อมีการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่ระดับปานกลางและสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะความแตกต่างของผู้ป่วยแต่ละคน ไม่ว่าจะเป็นการได้รับยาเคมีบำบัด ระยะของการเป็นโรค ส่งผลทำให้เคอร์คิวมินลดการแสดงออกของยีนได้แตกต่างกัน

ดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อพิจารณาในส่วนของคุณสมบัติของมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ากลุ่มของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL, AML และ CML สามารถตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ในระดับที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ รวมถึงในส่วนของความแตกต่างทางเพศ พบว่าทั้งในเพศหญิง และเพศชาย มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในระดับที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน ดังนั้น จึงพบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของยีน *MDR1* ได้ในทุกกลุ่มที่นำมาพิจารณาคือ กลุ่มของผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นใหม่, กลุ่มผู้ป่วยใหม่, กลุ่มที่อยู่ในระหว่างการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด และ กลุ่มที่รักษาด้วยเคมีบำบัดครบตามโปรแกรม, กลุ่มที่มีการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ระดับ, กลุ่มของชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว และ เพศ

ผลการศึกษาในตัวอย่างจำนวน 70 ราย อายุอยู่ในช่วง 6 เดือนถึง 16 ปี 6 เดือน ซึ่งการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อระดับของ WT1 mRNA โดยใช้การแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์ K562 เป็น positive control (100%) พบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดระดับของ *WT1* mRNA ได้ใน

เซลล์มะเร็งจากไขกระดูกของผู้ป่วยจำนวน 40 รายในผู้ป่วยทั้งหมด 70 รายหรือคิดเทียบเป็น 57% จากข้อมูลผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดนี้ สามารถแยกพิจารณาผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีน *WT1* โดยแบ่งเป็น 1) เพศของผู้ป่วย 2) ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยแยกออกเป็น ALL, AML และ CML 3) กลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษาโดยแยกออกเป็นกลุ่มผู้ป่วยใหม่ (new cases), ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง (relapsed cases), ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด (drug maintenance) และกลุ่มผู้ป่วยที่หายครบบตามโปรแกรม (completed treatment) 4) ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ ต่ำ (1-20%), ปานกลาง (21-60%) และสูง (61-100%) เช่นเดียวกับการศึกษาในยีน *MDR1*

จากผลการทดลอง เมื่อพิจารณาตามเพศของผู้ป่วย คือ เพศชายและเพศหญิง (แสดงระดับการแสดงออกของยีน *WT1* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมินเท่ากับ 49 และ 69% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละกลุ่ม พบว่าเพศชายมีการกระจายตัวของระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ที่น้อยกว่าเพศหญิง แต่มีค่ามัธยฐาน (median) ที่สูงกว่าเพศหญิงเล็กน้อยซึ่งไม่ถือว่าไม่มีความแตกต่าง นอกจากนี้พบว่าเพศหญิงมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่าเพศชายถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะต้องศึกษาต่อไปถึงปัจจัยที่ทำให้เพศหญิงดูเหมือนจะมีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่าเพศชาย

เมื่อแยกพิจารณาตามชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยแยกเป็นผู้ป่วย ALL, AML และ CML พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 60, 40 และ 50% ตามลำดับโดยเทียบกับจำนวนทั้งหมด ในแต่ละชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งไม่แตกต่างกัน และพบว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL มีการกระจายตัวของระดับการแสดงออกของยีน *WT1* และค่ามัธยฐานที่มากกว่า AML และ CML ตามลำดับแต่ถือว่าไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่า CML และ AML ตามลำดับ ซึ่ง ALL มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินได้ดีกว่า AML ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะต้องศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นเนื่องจากตัวอย่างที่ได้ส่วนใหญ่เป็น ALL หรือศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลทำให้ ALL มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินที่ดีกว่า AML ต่อไป ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับ polymorphisms ของยีน *WT1* ด้วย

เมื่อพิจารณาในกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา โดยแยกเป็นผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด และผู้ป่วยที่หายครบบตามโปรแกรม มีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 64, 50, 58 และ 50% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละกลุ่ม มีการกระจายตัวของระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้งที่มากกว่าผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่หายครบบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่อยู่

ในช่วงให้เคมีบำบัด ตามลำดับ โดยค่ามัธยฐานของผู้ป่วยใหม่และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้งมีระดับที่สูงกว่าผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด และผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรมแล้ว ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด โดยอาจเกิดจากยาเคมีบำบัดไปมีผลลดระดับและ/หรือทำลายเซลล์ตัวอ่อนซึ่งจะมีการแสดงออกของยีน *WT1* ที่สูงเนื่องจาก *WT1* มีส่วนส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (cell differentiation) ดังนั้น เมื่อมีเซลล์ตัวอ่อนลดลงจึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ลดลงและลดลงอย่างเห็นได้ชัดในผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ในตัวอย่างพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือพบเซลล์ตัวแก่มากขึ้นรวมทั้งมีการกระจายของเซลล์เม็ดเลือดขาวใกล้เคียงกับคนปกติ นั่นคือมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงใกล้เคียงระดับปกติ และยังพบเซลล์ที่แตกสลายแล้ว (smudge cell และ basket cell) กระจายอยู่ทั่วสไลด์ ผู้ป่วยในทุกกลุ่มมีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในระดับที่ใกล้เคียงกัน จึงอาจจะเป็นไปได้ที่จะนำเคอร์คิวมินมาใช้รักษาผู้ป่วยได้ทุกกลุ่ม โดยจะต้องทำการศึกษาค่อยไป

เมื่อแยกการพิจารณาระดับของการแสดงออกของยีน *WT1* ออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ, ปานกลาง และสูง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างของเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกที่มีปริมาณของ *WT1* mRNA ลดลงเท่ากับ 40, 67 และ 78% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ผลการทดลองนี้ได้ผลที่เหมือนกันกับการศึกษาในยีน *MDR1* และกลุ่มที่มีการแสดงออกของยีนที่ต่ำนั้น มีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่ตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน น้อยกว่าระดับปานกลางและสูงอย่างเห็นได้ชัด โดยในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนที่ต่ำนั้น พบว่าจำนวนส่วนใหญ่ที่ตอบสนองต่อเคอร์คิวมินอยู่ในกลุ่มของผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด, ผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง ตามลำดับ ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับปานกลาง พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด รองลงมาคือผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง ตามลำดับ เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนที่ต่ำ ส่วนผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับสูง พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด, ผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง ในทุกระดับ ALL มีจำนวนที่ตอบสนองมากกว่า AML หรือ CML แล้วแต่กรณี ดังนั้นควรศึกษาในผู้ป่วยจำนวนรายที่มากกว่านี้ โดยเฉพาะ CML นอกจากนี้ยังสามารถพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *WT1* ในกลุ่มของชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวกับกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา ซึ่งพิจารณาเฉพาะใน ALL เนื่องจากมีจำนวนมากพอที่จะวิเคราะห์ผลได้ โดยจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในผู้ป่วย ALL ไม่ว่าจะเป็นผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมี

บำบัด หรือผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรมต่างมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในระดับที่ใกล้เคียงกัน

โดยรวมแล้วพบว่า ในแต่ละกลุ่มที่ได้ทำการแยกพิจารณาไม่มีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมิน ยกเว้นกลุ่มที่พิจารณาในส่วนของระดับการแสดงออกของยีน *WT1* เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *MDR1* และ *WT1* พบว่าไม่สัมพันธ์กัน ซึ่งการทดลองนี้เป็นการทดลองที่ได้พิสูจน์ข้อสันนิษฐานของ Hirose M และคณะ ในปี 1998 (78) ว่า p53 อาจจะมีข้องเกี่ยวกับโดยตรง หรือทางอ้อมกับการแสดงออกของยีน *MDR1* ผ่าน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อยา โดยการแสดงออกของยีน *WT1* จะสัมพันธ์กับระดับของการดื้อยา แต่จากการทดลองในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมียพบว่ายีนทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งการทดลองนั้นไปสอดคล้องกับการศึกษาของ Tokura Y และคณะ ในปี 2002 (79) ที่พบว่า *WT1* เป็น negative regulation ของยีน *MDR1* ในเซลล์ K562 ที่กระตุ้นด้วย TPA

บทสรุป

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *MDR1* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าผู้ป่วย ALL และ AML แต่ในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสามชนิดไม่เท่ากัน การเปรียบเทียบผลอาจผิดพลาดได้ เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีน *MDR1* เป็นกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดต่างกันพบว่าในกลุ่มที่เป็นคนไข้ใหม่และ กลุ่มที่อยู่ในช่วงให้ยาเคมีบำบัด มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่ากลุ่มที่กลับมาเป็นใหม่และกลุ่มที่ให้ยาครบตามโปรแกรม โดยเฉลี่ยแล้วเท่าๆกัน และ ในการศึกษาผลของสารสกัด เคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีน *MDR1* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ายีน *MDR1* มีการแสดงออกที่ลดลง โดยที่ระดับการลดลงของยีนไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว รวมถึงระยะที่ได้รับยาเคมีบำบัด ซึ่งระดับการลดลงของการแสดงออกของยีนจะมีค่ามาก น้อยแตกต่างกันไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในเซลล์ KB-V1 (Anuchapreeda และ คณะ 2002) พบว่าผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน สามารถลดการแสดงออกของยีน *MDR1* ได้เช่นกัน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *WT1* ตามเพศและชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของการแสดงออก แต่เมื่อพิจารณาในกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา พบว่าการแสดงออกของยีน *WT1* ในผู้ป่วยใหม่และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้งมีระดับที่สูงกว่าผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด และผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรมแล้ว ตามลำดับ ซึ่งมีลดลงของการแสดงออกของยีนอย่างเห็นได้ชัดในผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ในตัวอย่างพบว่าให้ที่ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นจึงอาจจะใช้ระดับการแสดงออกของยีน *WT1* ในไขกระดูกผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพื่อช่วยในการทำนายความรุนแรงของโรค (prognosis) หรือการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้

จากการทดลองเพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมิน (จากบริษัท Sigma-Aldrich) ต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากไขกระดูกผู้ป่วยพบว่า เมื่อพิจารณาตามเพศของผู้ป่วยคือเพศชายและเพศหญิง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเมื่อทดสอบด้วยเคอร์คิวมินเท่ากับ 49 และ 69% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละกลุ่ม เมื่อพิจารณาตามชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งแยกเป็นผู้ป่วย ALL, AML และ CML พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 60, 40 และ 50% ตามลำดับโดยเทียบกับจำนวนทั้งหมดในแต่ละชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อพิจารณาในกลุ่มของผู้ป่วยที่เข้ามารักษา โดยแยกเป็นผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัด และผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม มีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1*

mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 64, 50, 58 และ 50% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละกลุ่ม และเมื่อแยกการพิจารณาระดับของการแสดงออกของยีน *WT1* ออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ซึ่งได้จากชุดควบคุมที่ยังไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอย่างของเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกที่มีปริมาณของ *WT1* mRNA ลดลงเท่ากับ 40, 67 และ 78% ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละระดับการแสดงออกของยีน *WT1* จะเห็นว่าทุกกลุ่มที่แยกพิจารณามีการตอบสนองต่อเคอร์คิวมินในระดับที่แตกต่างกันไปดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่จะนำเคอร์คิวมินมาใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต ซึ่งจะต้องทำศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en/>
2. http://www.nso.go.th/thai/state_23/toc_4/
3. http://redhole1.nso.go.th/detail_cwd/start.htm
4. International Agency for Research on Cancer World Health organization. Cancer in Thailand. Vol. II, 1992-1994, IARC Technical Report No. 34. Bangkok, Thailand. IARC Library Cataloguing in Publication Data. 1999.
5. นิสารัตน์ โอภาสเกียรติกุลและคณะ.พยาธิวิทยาคลินิก Clinical Pathology. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เรือนแก้ว, 2545.
6. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haper DA, *et al.* Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 60:609-20, 1990.
7. Lewis WH, Yeger H, Bonetta L, Chan HSL, Kang J, Junien C, *et al.* Homozygous deletion of a DNA marker form chromosome 11p13 in sporadic Wilms' tumor. *Genomics*. 3:25-31. 1998.
8. Kikuchi H, Akasaka Y, Najai T, Umezawa A, Iri H, Kato S, *et al.* Genomic changes in the WT gene (*WT1*) in Wilms' tumors and their correlation with histology. *Am J Pathol*. 140:781-6. 1992.
9. Sugiyama H. Wilms' tumor gene *WT1*: Its oncogenic fuction and clinical application. *Int J Hematol*. 73:177-187. 2001.
10. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H *et al.* WT1 as a new pergnostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 84:3071-9. 1994.
11. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: Oncogene or tumor suppressor gene?. *Int Rev Cytol*. 181:151-212. 1998.
12. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, *et al.* Presence of Wilms' tumor gene (*WT1*) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*. 9: 1060-7. 1995.

13. Gue X, Xu S, Dong Z. *WT1* gene expression in leukemia patients and its correlation with prognosis and Multidrug resistance. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 20: 69-72. 1999.
14. Krishnamurthy N, Mathew AG, Nambudiri ES, Shivashanker S, Lewis YS, Natarajan CP. Tropical Science, London Her Majesty's Stationary office. 18: 37-45. 1976.
15. เสี่ยงม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทย. กรมวิทยาศาสตร์ โรงพิมพ์เกษมบรรณกิจ หน้า 91-4, 2514.
16. The MERCK Index, 9th ed. MERK & CO. Inc. 384. 1976.
17. Dictionary of organic compound, 4th ed. Richard Clay Ltd. 2:262. 1965.
18. Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr Cancer*. 17(1): 77-83. 1992.
19. Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Carcinogenesis*. 13(11): 2183-6. 1992.
20. Nagabhushan M, Amonkar AJ, Bhide SV. In vitro anti-mutagenicity of curcumin against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol*. 25(7):545-7. 1987.
21. Nagabhushan M, Bhide SV. Curcumin as an inhibitor of cancer. *J Am Coll Nutr*. 11:192-198. 1992.
22. ปัญจะ กุลพงษ์. CLINICAL PEDIATRIC ONCOLOGY โรคมะเร็งในเด็ก. เชียงใหม่: ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2540.
23. ขวลิต กฤษเพชรรัตน์ และนพมาศ เข้มทองกลาง. มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia). เชียงใหม่: ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2539.
24. สาคกร พรประเสริฐ. มะเร็งเม็ดเลือดขาว. เชียงใหม่ : ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2542.
25. Matsunaga E. Genetics of Wilms' tumor. *Hum. Genet*. 57, 231-246, 1981.
26. Breslow NE, Langholz B. Childhood-cancer incidence-Geographical and temporal variations. *Int. J. Cancer*. 32:703-716. 1983.

27. Machin GA, McCaughey WT. A new precursor lesion of Wilms' tumor (nephroblastoma): intralobar multifocal nephroblastomatosis. *Histopathology*. 8(1):35-53. 1984.
28. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haper DA, *et al*. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 60:609-20. 1990.
29. Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, Rauscher FJ III, Collins T, Sukhatme VP. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:10984. 1992.
30. Kent J, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND, Vanheyningen V. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene*. 11:1781-1792. 1995.
31. Rauscher III FJ. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *Adv. Exp. Med. Biol.* 348:23-29. 1993.
32. Madden SL, Cook DM, Rauscher III FJ. A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene*. 8: 1713-1720. 1993.
33. Reddy JC, Morris JC, Wang J, English MA, Haber DA, Shi Y, Licht JD. WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 10878-10884. 1995.
34. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber DA. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J*. 14: 4662-4675. 1995a.
35. Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF. WT1, the Wilms' tumor suppressor gene product, represses transcription through an interactive nuclear protein. *Oncogene*. 10: 415-422. 1995b.
36. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene *WT1*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 88: 9618-9622. 1991.

37. Morris JF, Hromas R, Rauscher III FJ. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger gene MZF-1: Two independent DNA binding domains recognize two distinct DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1786-1795. 1994.
38. Rauscher III FJ, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T. Binding of the Wilms tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*. 250: 1259-1262. 1990.
39. Bickmore WA, Oghene W, Little MH, Seawright A, Van Heyningen V, Hastie ND. Modulation of DNA Binding Specificity by Alternative Splicing of the Wilms' Tumour WT1 Gene Transcript. *Science*. 257: 235-237. 1992.
40. Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, Housman DE. Sequence and structural requirements for high affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Molecular and Cellular Biology*. 15:1489-1498. 1995.
41. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The Wilms tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J. Biol. Chem.* 268: 9172-9175. 1993.
42. Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor—a case of disrupted development. *Annu. Rev. Genet.* 28: 523-558. 1994.
43. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a ZIF268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 252: 809-817. 1991.
44. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* 40: 85-97. 1992.
45. Rackley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BR. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene *Wt1* during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ.* 4: 1023-1031. 1993.
46. Jinno Y, Yun K, Nishiwaki K, Kubota T, Ogawa O, Reeve AE, Niikawa N. Mosaic and polymorphic imprinting of the WT1 gene in humans. *Nat. Genet.* 6: 305-309. 1994.

47. Pritchard-Jones K, *et al.* The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*. 346: 194–197. 1990.
48. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, *et al.* A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol*. 16:6945. 1996.
49. Brenner B, Wildhardt G, Schneider S, Royer-Pokora B. RNA polymerase chain reation detects different levels of four alternative spliced WT1 transcripts in Wilms' tumors. *Oncogene*. 7: 1431-1433. 1992.
50. Huang A, Campbell CE, Bonetta L, McAndrews-Hill MS, Chilton-MacNeill S, Coppes MJ, *et al.* Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms' tumor. *Science*. 250: 991-994. 1990.
51. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, *et al.* WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 84:3071. 1994.
52. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT1 is required for early kidney development. *Cell*. 74: 679–691. 1993.
53. Devriendt K, Deloof E, Moerman P, Leguis E, Vanhole C, De Zegher F, Peosmans W, Devlieger H. Diaphragmatic hernia in Denys-Frash syndrome. *Am J. Med. Genet*. 57: 97-101. 1995.
54. Pelletier J, Schalling M, Buckler A, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene *Wt1* in the murine urogenital system. *Genes Dev*. 5: 1345–1356. 1991.
55. Francke U, Holmes LB, Atkins L, Riccardi VM. Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet. Cell Genet*. 24: 185-192. 1979.
56. junqueira LC, Carneiro J. "Functionele Histologie." Wetenschappenlijke Uitgeverij Bunge. Utrecht. 1984.
57. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I. Expression of the candidate Wilms' tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia* 7:970. 1993.

58. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemia. *Leukemia* 6:405. 1992.
59. ทรงยศ อนุชปรีดา : การคื้อยาในมะเร็งเม็ดเลือดขาว. วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ ปีที่ 35, 2 (พฤษภาคม 2545) : 117-125
60. Nethsingha C and Paskaranathan U. Turmeric: a literature survey. Celon Institute of Scientific and Industrial Research. *Srilanka*: 1-28. 1976.
61. ภาควิชาพัฒนการกรรมวิธีปรับปรุงและควบคุมคุณภาพสมุนไพรเพื่อใช้ในประเทศและส่งออก กลุ่มือสมุนไพรหมื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย หน้า 28, 2525.
62. Ravindranth V, Satuanarayana MN. *Phytochemistry*. 19:2301-2, 1980.
63. Conney AH, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Manchand PS, Laskin JD, Huang MT. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Cancer Research*. 52:P385-96. 1992.
64. Kato R, Nakadate T, Yamamoto S, Sujimura T. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induce tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipooxygenase inhibition. *Carcinogenesis (London)*. 4:1301-5. 1983.
65. Fisher SM, Mills GD, Slaga JJ. Inhibition of mouse skin tumor promotion by several inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Carcinogenesis (London)*. 3:1243-5. 1982.
66. Limtrakul P, Chearware W, Anuchapreeda S. The effects of curcumin on the proliferation of cancer cell lines. *Chiang Mai Med Bull*. 38: 55-61. 1999.
67. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn F.W. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Letters*. 116: 197-203. 1997.
68. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Lipigorngoson S, Dunn F.W. Inhibitory of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos oncogenes expression by dietary curcumin. *BMC cancer*. 1: 1-7. 2001.

69. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Lipigorngoson S, Dunn F.W. Curcumin Inhibits of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos oncogenes expression and protein kinase C activity in mouse skin. *BMC. Chiang Mai Med Bull.* 40: 127-37. 2001.
70. Romiti N., Tongiani R., Cervelli F., Chiell E. Effect of curcumin on P-glycoprotein in primary cultdres of rat hepatocytes. *Life Sci.* 1998. 62:2349-58
71. Fujimaki S, Funato T, Harigae H, Fujiwara J, Kameoka J, Meeguro K, et al. Quantitative analysis of a *MDR1* Transcript for Prediction of Drug Resistance in Acute Leukemia. *Clinical Chemistry* 2002;48(6):811-7
72. Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith MM, Ambudkar SV, Limtrakul P. Modulation of P-glycoprotein Expression and Function by Curcumin in Multidrug-Resistant in Human KB cells. *Biochem Phamacol* 2002;64:573-82
73. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Buddhasukh D. Modulation of human multidrug-resistance *MDR-1* gene by naturae curcuminoids. *BMC cancer* 2004; 4(13):1-6
74. Chearwae W, Anuchapreeda S, Nandiqama K, Ambudkar SV, Limtrakul P. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder. *Biochem Pharmacol* 2004;68: 2043-52
75. <http://ccm.ucdavis.edu/cpl/Tech%20updates/RT-PCR%20folder/RT-PCRweb.jpg>
76. Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, Bates SE, Fojo T. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug selected cell lines and human tumors. *Blood* 1998; 91: 1749-56.
77. Hayashi T, Kobayashi H, Miyashi H, Ohshima T, Ujiiye T, Kawase M, Hotta T, Takemura Y. A competitive nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantification of human MDR1 transcript in leukemia cells. *Chlinica Chimica Acta* 2004;342:115-26.
78. Hirose M, Kuroda Y. p53 may mediate the *mdr-1* expression via the *WT1* gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines. *Cancer Letters* 1998; 129: 165-71.
79. Tokura Y, Shikami M, Miwa H, Masaya W, Sugamura K, Wakabayashi M, Satoh A, Imamura A, Mihara H, Katoh Y, Kita K, Nitta M. Augmented expression of P-gp/multi-drug resistance gene by all-trans retinoic acid in monocytic leukemic cells. *Leukemia research* 2002; 26: 29-36.

Output ที่ได้จากโครงการ

- (1) ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง (กำลังอยู่ในระหว่างการ submitted)
- (2) มีนักศึกษาปริญญาตรีร่วมในโครงการนี้ จำนวน 3 คน คือ
 - นายสมโภช เสอาอิน
 - นางสาวนิศรวิภา วิกัน
 - นางสาวอรุณี จันทน์นัม
- (3) ประโยชน์ต่อวงการวิทยาศาสตร์ผลงานวิจัย ที่ได้คาดว่าจะช่วยให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย
 - i. เมื่อมีการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินมีผลต่อการลดการแสดงออกของยีน *MDR1* และยีน *WT1*
 - ii. ผลของเคอร์คิวมินต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน *MDR1* นั้น พบว่ามีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับการลดลงของยีน *WT1* แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 - iii. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา เป็นข้อมูลที่สำคัญในการใช้ประเมินอุบัติการณ์ของการดื้อยาจากผู้ป่วย และช่วยให้แพทย์ตัดสินใจในการใช้เคมีบำบัดในการรักษา ได้
 - iv. จากผลงานวิจัยที่ได้จะเป็นพื้นฐานในการวิจัยแก่คณะผู้วิจัยต่อไป เช่น ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *WT1* ซึ่งเป็น transcription factor กับการแสดงออกของยีน *MDR1* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว และ ความเป็นไปได้ของ signal cascade ที่มี PKC และ PKA เข้ามาเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน *WT1* ต่อการแสดงออกของยีน *MDR1* นอกจากนี้ยังสนใจที่จะศึกษาการยับยั้งการทำงานของ CML-AML protein ที่ส่งเสริมให้เกิด signal transduction ของ tyrosine kinase โดยใช้เคอร์คิวมิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ภาคผนวก

.

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

การเตรียม RPMI 1640 medium สำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์

1. เทผง RPMI 1640 ใส่ลงในภาชนะขนาด 1 ลิตรที่มี deionized distilled water อยู่ประมาณ 800 ml
2. ใช้ Deionized distilled water ล้างผง RPMI-1640 ที่เหลือลงไปในภาชนะ 2-3 ครั้ง
3. ชั่ง HEPES ปริมาณ 3.57 g เติมลงไปคนให้เข้ากัน
4. เติม NaHCO_3 ที่ชั่งแล้วปริมาณ 2 g เติมลงไปคนให้เข้ากัน
5. เติม Mercaptoethanol จาก stock (mercaptoethanol 34 μl /deionized distilled water ปริมาณ 10 mL) ลงไป 1ml คนให้เข้ากัน
6. ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 ด้วย 1N HCl แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้เป็น 1ลิตร
7. นำไปกรองด้วย suction filter โดยใช้กระดาษกรองขนาด 2 μm ในตู้ปลอดเชื้อ
8. แบ่งอาหารที่ได้ (เป็น incomplete medium) ใส่ขวดปริมาตร 500 ml เก็บในตู้เย็น 4 °C

การเตรียม DMEM medium สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์

1. เทผง DMEM จากซองใส่ภาชนะขนาด 1 ลิตร ที่มี deionized distilled water อยู่ประมาณ 800 ml คนให้เข้ากัน
2. ใช้ deionized distilled water ล้าง DMEM ที่เหลือในซองลงไปประมาณ 2-3 ครั้ง
3. ชั่ง HEPES ปริมาณ 2.603 g เติมลงไปคนให้เข้ากัน
4. ชั่ง NaHCO_3 ปริมาณ 3.7 g เติมลงไปคนให้เข้ากัน
5. ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 ด้วย 1N HCl แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้เป็น 1ลิตร
6. นำไปกรองด้วย suction filter โดยใช้กระดาษกรองขนาด 2 μm ในตู้ปลอดเชื้อ

7. แบ่งอาหารที่ได้ (เป็น incomplete medium) ใส่ขวดปริมาตร 500 ml เก็บในตู้เย็น 4 °C

การเตรียม Completed medium (เตรียมขวดละ 100 ml ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

1. นำ RPMI 1640 medium มา 88.5 ml ใส่ในขวดปริมาตร 100 ml
2. เติม Pen/Strep 1 ml จาก stock (Penicillin/Streptomycin mixture 10,000 units/ml) ลงในขวด และ เติม L-glutamine 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน
3. ดูด FCS (Fetal Calf Serum) ซึ่งเป็นแหล่งให้ Growth factor ใส่ลงไปประมาณ 10 ml
4. ใช้ pasture pipette แบบอัดโนมัตี ดูด medium ที่เตรียมได้ (complete medium) ปริมาณ 5 ml ใส่ในงานทดลองขนาดเล็ก (60 x15 mm) นำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ (5%) เพื่อทำ sterility test อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือจะนำไปเก็บที่ 4 °C

หมายเหตุ การเตรียม completed medium DMEM จะไม่ใส่ L-glutamine

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

Phosphate buffer saline (PBS)

KH_2PO_4	0.12	g
Na_2HPO_4	0.72	g
NaCl	4.0	g
KCl	0.1	g

- นำสารทั้งหมดละลายด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาณ 100 mL
- ปรับ pH ให้ได้ 7.4
- ปรับปริมาตรให้ได้ 500 mL
- นำไปทำการหมักฆ่าเชื้อ (autoclave)

Hypotonic solution

NH_4Cl	0.829	g
EDTA	0.037	g
KH_2CO_3	0.100	g

- ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย NaOH
- ปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

- นำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาด 0.2 millipore
- นำไปเช็ค sterility

50 X TAE

Tris-base	18.61	g
น้ำปลอตก๊อออน	100	mL

ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH

0.75% agarose gel

Agarose gel	0.75	g
1 X TAE	100	mL
Ethidium bromide	10	μ L

นำไปทำให้ละลายให้หมดด้วยเตาไมโครเวฟ หรือ hot plate
ประมาณ 1-1.30 นาที

6X loading dye

Bromphenol blue	0.0025	g
Sucrose	0.4	g
DEPC-treated water	1.0	mL

- การเติม sucrose ควรเติมก่อนเติม Bromphenol blue
- เก็บไว้ที่ 4 °C ในที่มืด

DEPC treated water

Deionized distilled water	4	L
Diethylpyrocarbonate	400	μ L

- เขย่าอย่างแรง
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ค้างคืน หรือ นำไป autoclave เพื่อกำจัด DEPC

1 mg/mL Ethidium bromide

Ethidium bromide	0.001	g
DEPC-treated water	1	mL

เก็บไว้ที่ 4 °C ในที่มืด

Wright-Giemsa stain Dye solution

Powdered Wright stain	3	g
Powdered Giemsa stain	0.33	g
Glycerol	40	mL
Methyl alcohol (absolute anhydrous)	1,000	mL

- นำไปไว้ในตู้เย็น 40C นาน 1 สัปดาห์หรือจนกว่าจะลองย้อมดูแล้วให้ผลดี (ในขณะที่ทำการอบ ให้เขย่าขวดสีให้ทั่วถึงทุกวัน อย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง)
- นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ลงในขวดสีน้ำตาล

Phosphate buffer pH 6.4

Monopotassium phosphate (anhydrous)	6.63	g
Disodium phosphate (anhydrous)	2.56	g
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	mL

ภาคผนวก ข.

เอกสารตีพิมพ์

1. **Anuchapreeda S**, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P, Limtrakul P. Effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. *Leukemia Research*, submitted.
2. **Anuchapreeda S**, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Limtrakul P. Inhibitory effect of curcumin on MDR1 gene expression in patient leukemic cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, submitted.
3. ทรงยศ อнуชปรีดา ภัทธา ธนรัตนกร สมใจ สิทธิปรีชาชาญ พรงาม ลี้มตระกูล ผลของ เคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย ลิวคีเมีย วารสารเทคนิคการแพทย์ (เสนอเพื่อลงตีพิมพ์แล้ว)
4. **Anuchapreeda S**, Sadjapong W, Limtrakul P. The cytotoxic effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on leukemic cell lines. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci*, submitted

เอกสารตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการ

1. ทรงยศ อнуชปรีดา บทความเรื่อง “Leukemia from cellular of molecular diagnosis” ใน หนังสืองานประชุมวิชาการคณะเทคนิคการแพทย์ เนื่องในโอกาสครบรอบ 40 ปี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 21 มกราคม 2547 ณ โรงแรมปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ หน้า 74-85
2. **Anuchapreeda S** “Detection and modulation of multidrug resistance gene of cancer cells”. 10th Asean Conference in Medical Laboratory Technology. April 26-30, 2004. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai, Thailand.
3. **Anuchapreeda S**, Saoin S, Limtrakul P. Effect of curcuminoids on multidrug resistance I (MDR1) gene expression in leukemic patients. 10th Asean Conference in Medical Laboratory Technology. April 26-30, 2004. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai, Thailand.
4. **Songyot Anuchapreeda** Prasit Chanarat, Pattri Thanarattanakorn, Somjai Sittipreechacharn, Pornngarm Limtrakul. Effect of turmeric curcuminoids on WT1 gene

- expression in patient leukemic cells and K562 cell line. International Colloquium 2004. Health Benefits and Applications of Polyphenols. November 25th – 26th, 2004. 40-51.
5. ทรงยศ อนุชปรีดา ภัทรา ธนรัตนกร สมใจ สิริธิปริชาชาญ พรงาม ลิ่มตระกูล เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง ผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการแสดงออกของยีนวิลท์ทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด K562 งานมหิดลประจำปี 2547 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 40
 6. Songyot Anuchapreeda Prasit Chanarat, Pattra Thanarattanakorn, Somjai Sittipreechacharn, Pornngarm Limtrakul. Effect of curcumin on multidrug resistance 1 (MDR1) gene and Wilms' tumor gene (WT1) in blood cells of leukemic patients. หนังสือการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย หน้า 155
 7. ทรงยศ อนุชปรีดา นิตวรา วิกัน ภัทรา ธนรัตนกร สมใจ สิริธิปริชาชาญ สิงห์คำ ธิมา พรงาม ลิ่มตระกูล ผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีนวิลท์ทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย วารสารเทคนิคการแพทย์ ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 (ฉบับเสริม) เมษายน 2548 หน้า 192.

ผลงานโปสเตอร์

1. ทรงยศ อนุชปรีดา วิทวัส สัจจาพงษ์ พรงาม ลิ่มตระกูล เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง “ผลของเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินต่อการทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว” งานประชุมวิชาการคณะเทคนิคการแพทย์ เนื่องในโอกาสครบรอบ 40 ปีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 19-22 มกราคม 2547ณ. โรงแรมปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่
2. Anuchapreeda S, Saoin S, Limtrakul P. Effect of curcuminoids on multidrug resistance 1 (MDR1) gene expression in leukemic patients. Poster presentation in 10th Asean Conference in Medical Laboratory Technology. April 26-30, 2004. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai, Thailand.
3. ทรงยศ อนุชปรีดา ภัทรา ธนรัตนกร สมใจ สิริธิปริชาชาญ พรงาม ลิ่มตระกูล เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง ผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการแสดงออกของยีนวิลท์ทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด K562 งานมหิดลประจำปี 2547 วันที่ 24 กันยายน 2547 ณ. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. **Songyot Anuchapreeda** Prasit Chanarat, Pattri Thanarattanakorn, Somjai Sittipreechacham, Pornngarm Limtrakul. Effect of curcumin on multidrug resistance1 (MDR1) gene and Wilms' tumor gene (WT1) in blood cells of leukemic patients. เสนอผลงานโปสเตอร์ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 14-16 มกราคม 2548 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี
5. **ทรงยศ อнуชปรีดา** นิตวรา วิกัน ภัทรา ธนรัตนกร สมใจ สิทธิปรีชาชาญ สิงห์คำ ธิมา พรงาม ถัมตระกุล ผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีนวิลมส์ทูเมอร์1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ การประชุมวิชาการประจำปีสมาคมเทคนิคการแพทย์: การบูรณาการเพื่อสุขภาพ 27-29 เมษายน 2548 โรงแรมไดมอนด์พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี

เสนอผลงานด้วยวาจา

1. **ทรงยศ อнуชปรีดา** "Leukemia from cellular of molecular diagnosis" งานประชุมวิชาการ คณะเทคนิคการแพทย์ เนื่องในโอกาสครบรอบ 40 ปีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 21 มกราคม 2547 ณ โรงแรมปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่
2. **Anuchapreeda S** "Detection and modulation of multidrug resistance gene of cancer cells". 10th Asean Conference in Medical Laboratory Technology. April 26-30, 2004. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai, Thailand.
3. **Songyot Anuchapreeda** Effect of turmeric curcuminoids on WT1 gene expression in patient leukemic cells and K562 cell line. International Colloquium 2004. Health Benefits and Applications of Polyphenols. November 25th – 26th, 2004.



ประชุมวิชาการคณะเทคนิคการแพทย์

**เนื่องในโอกาสครบรอบ 40 ปี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
และครบรอบ 20 ปี ภาควิชากายภาพบำบัด
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์



**ระหว่างวันที่ 20-22 มกราคม 2547
ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่**

ผลของเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีนเอ็มดีอาร์ 1 และหน้าที่ของพี-กลัยโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์*

ทรงยศ อนุชปรีดา¹, พรงาม ถัมตระกุล²

¹ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษานี้ได้ทำการแยกเคอร์คิวมินอยด์ 3 ชนิด (เคอร์คิวมิน ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ซิลิกาเจล 60 คอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิด จึงทำการทดสอบผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อระดับของพี-กลัยโคโปรตีนและ MDR1 mRNA พบว่าบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ลดทั้งระดับ พี-กลัยโคโปรตีนและ mRNA ซึ่งทำการศึกษาดังกล่าวด้วยวิธี Western blotting และ RT-PCR ตามลำดับ (ดังรูปที่ 1 แสดงเฉพาะระดับ พี-กลัยโคโปรตีน) การศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน MDR1 จำเป็นต้องศึกษาเพื่อความเข้าใจถึงกลไกการคือยีนในเซลล์มะเร็ง โดยยีน *MDR1* เป็นยีนที่สร้างพี-กลัยโคโปรตีน และมีส่วนของโปรโมเตอร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีตำแหน่ง -84 ถึง -65 ประกอบด้วยลำดับเบสคือ GGCTGATTGGC TGGGCAGGA การจับกันของดีเอ็นเอกับโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการทดลองในระดับชีวโมเลกุลชั้นสูงทำให้ทราบว่าบริเวณโปรโมเตอร์ที่ศึกษานี้มีความจำเพาะต่อการจับของโปรตีนจากนิวเคลียส (ทรานสคริปชันแฟกเตอร์) จากนั้นทำการศึกษานิวเคลียสของโปรตีนจากนิวเคลียส โดยวิธีการที่มีความจำเพาะสูงที่เรียกว่า competitive electrophoretic mobility shift assay โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยสารรังสี คือ SP1, AP1, AP2, OCT1, NF- κ B และ CREB ผลการทดลองพบว่า CREB สามารถแย่งจับกับ ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ชนิดที่สามารถจับได้ดีกับตัวติดตามที่ติดฉลากด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยสารรังสี ดังนั้นการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า CREB เป็น ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่จับกับโปรโมเตอร์ของยีน *MDR1* ที่ตำแหน่ง -65 ถึง -84 และผลการทดลองนี้ได้ทำการทดลองยืนยันอีกครั้งด้วยวิธีการที่ให้ความแม่นยำสูงโดยวิธี Supershift โดยใช้แอนติบอดีต่อ CREB นอกจากนี้ได้ทำการทดลองผลของบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ต่อการยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *MDR1* ผลการทดลองพบว่า บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมินให้ผลในการยับยั้งที่ดีที่สุด (รูปที่ 3B) การทดลองนี้ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่สรุปได้ว่าบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมินให้ผลดีที่สุดในการปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีน *MDR1* ส่วนผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีน ทำการศึกษาโดยดูการสะสมและการขับไล่ Rhodamine123 (Rh123) ของเซลล์ KB-V1 พบว่าเคอร์คิวมินเพิ่มการสะสม Rh123 และยับยั้งการขับ Rh123 ได้ดีที่สุด ซึ่งการเพิ่มการสะสมเป็นแบบเพิ่มการสะสมขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน (1.8-20.3 μ g/mL หรือ ประมาณ 5-55 μ M) จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อความไวต่อการเป็นพิษของยาวิโนบลาสติน พบว่าเคอร์คิวมินสามารถเพิ่มความไวต่อการเป็นพิษของยาวิโนบลาสตินในเซลล์ปากมดลูกของมนุษย์ที่คือยา ซึ่งมีผลของการทดลองที่ไปในทางเดียวกันกับผลของการสะสมของ Rh123

*งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์บัณฑิตศึกษาภายในประเทศของ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และทุนวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

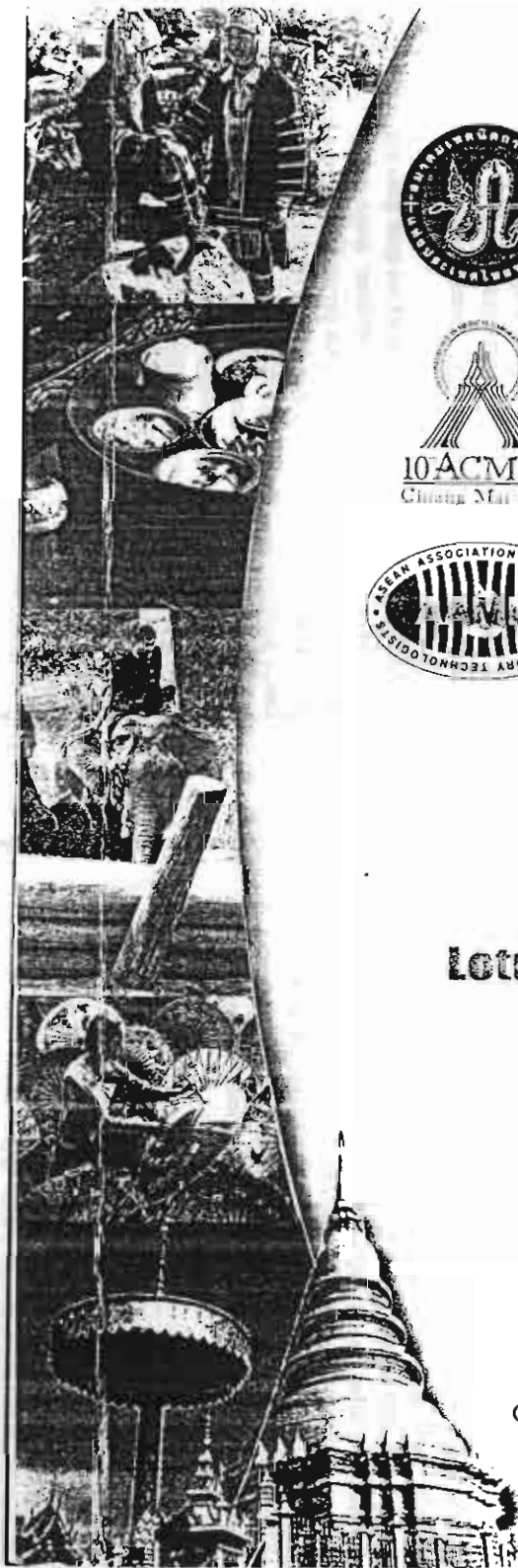
ผลของเคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินและบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว"

ทรงยศ อนุชปรีดา*, วิทวัส ตั้งจำพงค์*, รศ. ดร. พงงาม ถัมตระกุล*

*ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิด คือ เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ที่แยกได้จากมันชันต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (human promyeloid leukemia), U937 (monocytic leukemia) และ HL60 (human erythroid leukemia) ทำการศึกษาโดยวิธี MTT เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ในการศึกษาต่อการนำไปวิจัยทางคลินิก (clinical trial) แล้วนำไปใช้เป็นยาด้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อพัฒนาตัวยาในเชิงอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต ในการสกัดเคอร์คิวมินอยด์เองในประเทศ เมื่อทำการศึกษาผลทางชีวภาพของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด HL60, K562 และ U937 โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ต่างระยะเวลากัน (3 time independent study) พบว่าเคอร์คิวมินอยด์ชนิด ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน มีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60 ที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $9.8 \mu\text{g/mL}$ ส่วนบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และเคอร์คิวมิน นั้นมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.3 และ $11.2 \mu\text{g/mL}$ โดยค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดลองนี้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน ในเซลล์ U937 พบว่าบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน เป็นเคอร์คิวมินอยด์ที่มีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเคอร์คิวมินและดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7, 8.6 และ $8.7 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งเคอร์คิวมินและดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีค่าที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับทางสถิติพบว่า บิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินและดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ในเซลล์ K562 พบว่าดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเคอร์คิวมินและบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.7, 25.9 และ $27.4 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยเฉพาะในเซลล์ K562 นั้นต้องใช้ปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์ในการทดสอบปริมาณที่มากกว่า HL60 และ U937 ถึงประมาณ 2 เท่า ($0-100 \mu\text{g/mL}$) ถึงจะเห็นผลได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์รวมจากบริษัทชิกมา-อัคริช ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม ต่อการทำลายเซลล์ทั้ง 3 ชนิด (HL60, U937 และ K562) พบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีการตอบสนองต่อ เคอร์คิวมินอยด์รวมจากบริษัทชิกมา-อัคริช ซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกับเคอร์คิวมินอยด์บริสุทธิ์ในแต่ละชนิด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดอาจมีการเสริมฤทธิ์กัน ทำให้มีผลต่อการทำลายมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดี เพราะจากการทดลองจะเห็นได้ชัดว่าเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดให้ผลในการทำลายมะเร็งเม็ดเลือดขาวในระดับที่พอ ๆ กัน



ดร. นงนุช



**10th
ASEAN
Conference in
Medical
Laboratory
Technology**

April 26-30, 2004

**Lotus Hotel Pang Suan Kaew
Chiang Mai
Proceedings**

To be held in conjunction with
the 28th Annual Meeting
of the Association
of Medical Technologists of Thailand

DETECTION AND MODULATION OF MULTIDRUG RESISTANCE GENE OF CANCER CELLS

Songyot Anuchapreeda

Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University.

1. Cancer and drug resistant

Cancer is a major health concern. An estimated 6 million new cases are diagnosed each year worldwide [1]. Cancer is third only to heart disease and accident as a cause of death in Thailand [2]. Almost half of the new cases of cancer are diagnosed early enough to be treated with surgery or radiotherapy. In the remaining cases, however, the cancer has metastasized and must be treated with chemotherapy. Chemotherapy can effectively cure several cancers, such as leukemia, lymphomas, choriocarcinoma, and testicular cancers. Chemotherapy can improve the long-term survival for patients with breast cancer, the most common malignancy in women.

When patients with cancer are treated with a cytotoxic agent, the pharmacological goal is to deliver as much active drug as possible to the molecular target in cancer cells in order to cause sufficient molecular damage to kill of the cells. On the other hand, the occurrence of drug resistance renders cells resistant not only to the drug used in the chemotherapy but also to a broad spectrum of unrelated cytotoxic drugs as well. Cancer cells may develop the multidrug resistance phenotype. When human tumor cells express this phenotype, they often overexpress the drug export protein called plasma membrane P-glycoprotein (Pgp) with a molecular weight of approximately 150-170 kDa. This plasma membrane phosphoglycoprotein, which belongs to the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters, consists of two homologous halves that share a high degree of sequence similarity [3].

Uptake and/or efflux of isotope-labeled drugs or rhodamine 123 (Rh123) are frequently used for functional assay of Pgp in tumor cells. Several classes of compounds that inhibit efflux by Pgp and enhance the accumulation and efficacy of anticancer compounds have been identified. MDR-reversing agents include calcium channel blockers (verapamil), calmodulin inhibitors (phenothiazines), and indole alkaloids (reserpines) and nonpolar cyclic oligopeptides with immunosuppressant activity (cyclosporin A) [4]. Although Pgp mediates the transport of many structurally and functionally diverse compounds, many potent MDR-inhibiting compounds share common physical characteristics such as cyclicity, lipophilicity and a positive or

neutral charge at physiological pH. Many synthetic MDR modulators, including reversins 121 and 205 [5] and cyclosporin D analog, valspodar (PSC 833) [6], successfully reversed the MDR phenotype *in vitro*.

2. Drug resistance

Multidrug resistance (MDR) is the main cause of cancer chemotherapy failure, where tumors have become resistant or were initially resistant to the chemotherapy treatment. In cancer cells, the MDR pump ejects cell-killing chemotherapy molecules. This is a victory for the cell, but, of course, not for the patient, who must then rely on some other form of treatment to keep the cancer at bay. The MDR pump is active in a broad spectrum of human cancers, including lymphoma, leukemia, breast, lung and ovarian cancer. Scientists have not yet fully understood why some cancer cells are packed with MDR and some appear to have little or none at all, but they do know that chemotherapy drugs themselves can sometimes induce MDR production within a select group of cancer cells in the body. When that happens, those cells have a distinct growth advantage and quickly take over, preventing the drug from attacking the tumor.

Resistance can be intrinsic or acquired. Tumors with intrinsic (or *de novo*) resistance fail to respond to the first chemotherapy drug given. In acquired resistance, tumors initially respond to chemotherapy but eventually progress in spite of treatment. In both scenarios, tumors are often found to be refractory to a variety of drugs with different structures and functions. A similar experimental phenomenon has been termed multidrug resistance, MDR [7]. Various molecular mechanisms have been associated with MDR in experimental tumor models. These include: (a) enhanced efflux of drugs by transporter protein such as P-glycoprotein (P-gp) or the human multidrug resistance-associated protein MRP [8], alterations in drug targets, such as DNA topoisomerase II (TopoII) [9], (b) increased detoxification of compounds, e.g. by the glutathione (GSH) system [10], and (c) overexpression of the human major vault protein LRP [11, 12], which might play a role in vesicular sequestration of drugs.

Table 1 shows the terms used in this article to refer to particular MDR mechanisms and phenotypes. The term "MDR" as used herein refers to a phenotype of simultaneous resistance to multiple agents which differ in structure (and not necessarily function), without implying any particular mechanism. If applicable, these are specified by prefix, as in Pgp-MDR or topoII-MDR. The terms "apoptosis-MDR" and "clinical MDR" are also used herein. Alterations in apoptosis pathways have been shown to result in resistance to a variety of cytotoxic agents. Thus, it seems appropriate to refer to apoptosis-related chemotherapy resistance as a type of MDR.

Table 1. Terms used in this article for various type of MDR [13]

Term	Mechanism	Characteristics
Pgp-MDR	Overexpression of <i>MDR1</i> / <i>Pgp</i>	Resistance to natural product drugs which differ in structure and function; reduced drug accumulation due to enhanced efflux. Can be reversed by chemosensitizers such as verapamil or cyclosporins
MRP-MDR	Overexpression of MRP	Phenotype similar to Pgp-MDR but little resistance to taxanes; changes in cellular pharmacology variable. Amphipathic cations need to be conjugated prior to transport. Low activity of typical Pgp-inhibitors.
TopoII-MDR	Diminished content or activity of topoII α	Resistance to topo II drugs (i.e. drugs which differ in structure but not in function)
GSH-MDR	Increased content of GSH and/or increased activity of GSH S-transferases	Resistance to melphalan, cyclophosphamide, chlorambucil, BCNU, thiotepa (and possibly other drugs such as cisplatin and doxorubicin) Increased phase II metabolism of drugs.
Apoptosis-MDR	Blocked apoptosis; dysfunction of genes involved in apoptosis	Resistance to most (all?) cytotoxic agents.
Clinical MDR	Can be multifactorial; cellular mechanisms possible	Clinical resistance to multiple cytotoxic drugs which differ in structure (and possibly function)

3. Overexpression of *MDR1*/*Pgp* in clinical tumors

In various cancer types, such as acute myeloid leukemia, various childhood tumors and locoregionally advanced breast cancer, overexpression of *MDR1*-*Pgp* has been found to correlate with poor outcome in patients treated with chemotherapy [14]. These findings have been interpreted as an indication of Pgp-mediated drug resistance. However, this interpretation seems premature. Various clinical studies have suggested that Pgp-positivity is associated with more aggressive tumor behavior. In colon cancer, Pgp was found to be expressed predominantly in the tumor cells at the invading edge of primary tumors, and Pgp-positivity in primary tumors was associated with a higher incidence of lymph node metastases [15]. In renal cell carcinoma, Pgp-positivity was found significantly more often in invasive than in non-invasive tumors [16]. In primary

breast cancer, overexpression of *MDR1*/*Pgp* seems to be more common in advanced locoregional disease than it is in small tumors [17]

In a substantial number of tumors MDR is caused by a cell membrane protein, P-glycoprotein (Pgp), which pumps out anticancer drugs from the cells. The overexpression of P-glycoprotein (Pgp) on the surface of tumor cells causes multidrug resistance (MDR). This protein acts as an energy-dependent drug efflux pump, reducing the intracellular concentration of structurally unrelated drugs.

Overexpression of class I P-glycoprotein causes cancer cells to become resistant to a variety of anticancer drugs (e.g. vinblastine, vincristine, daunorubicin, etoposide, teniposide and paclitaxel), as well as many other cytotoxic agents (Table 2).

Table 2. Compounds which interact with P-glycoprotein [13]

Anticancer drugs	Other cytotoxic agents	MDR reversing agents	Cyclic and linear peptides
Dauorubicin	Colchicine	Verapamil	ActinomycinD
Doxorubicin	Emetine	Nifedipine	GramicidinD
Mitoxantrone	Ethidium bromide	Azidopine	Valinomycin
Etoposide	Pauromycin	Quinidine	Yeast a-factor pheromone
Teniposide	Mithramycin	Amiodarone	N-acetyl-leucyl-L-norleucine
Vinblastine		Reserpine	
Vincristine		CyclosporineA	
Mitomycin C		FK505	
Paclitaxel		Rapamycin	
Actinomycin D		Progesterone	
Topotecan		Forskolin	

4. Structure of P-glycoprotein [18]

Mammalian P-glycoproteins are single chain proteins and consist of approximately 1,280 amino acid residues. P-glycoprotein are composed of 43% sequence homology, between the two halves of which there is a hydrophobic, membrane associated domain (approximately 250 amino acid residues) followed by hydrophilic nucleotide binding fold (approximately 300 amino acid residues). These two halves are connected by a linked peptide of approximately 75 amino acids defined as amino acids 633-709 in human Pgp. This peptide conjugated, commonly called the linker region, is highly charged and contains the in vivo sites of phosphorylation (Figure 1).

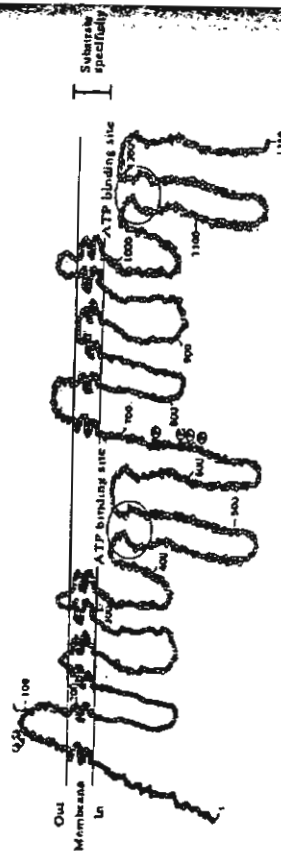


Figure 1. Schematic model of human multidrug resistance gene product P-glycoprotein and its functional domain.

5. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitizers

It is of clinical relevance that a large number of drugs have been identified which inhibit the function of Pgp, termed chemosensitizers or MDR modulators. Trials have been designed and carried out in humans to test the potential for pharmacological inhibition of clinical MDR. Many of these chemosensitizers have proved toxic or ineffective *in vivo*, and thus identifying untried agents for potential clinical use has taken on great importance. This article will briefly (a) summarize our current understanding of the pharmacological mechanism of P-glycoprotein inhibition, (b) review in detail those agents most likely to have clinical impact on the circumvention of Pgp-mediated MDR in humans, and (c) discuss novel approaches to the identification of more potent and less toxic chemosensitizers.

The primary mechanism by which most chemosensitizers are believed to antagonize MDR is through direct inhibition of drug efflux mediated by Pgp, resulting in restoration of cytotoxic drug accumulation in MDR cells. Pgp functions as an active or a non-competitive inhibitor, perhaps by binding to similar drug substrate binding sites, causing allosteric changes, resulting in inhibition of cytotoxic drug binding or transport. In support of this model, many studies have demonstrated that certain chemosensitizers may bind directly to cellular membranes enriched for Pgp, in a specific and saturable manner, and that this binding may be inhibited by other chemosensitizers or by chemotherapeutic drugs [19].

Chemosensitizers may themselves serve as substrates for the Pgp multidrug transporter, in support of their possible role as competitive ligands for drug-binding sites on Pgp. For example, verapamil, trans-flupenthixol and cyclosporin A (CsA) accumulate less in certain MDR cell lines [20]. Alternatively, certain chemosensitizers, such as the phenothiazines, might inhibit Pgp activity by interacting with physically separate sites

on Pgp, such as ATPase site or phosphorylation domains, alternatively chemosensitizers may act from a distance, such as by inhibiting protein kinase C and altering the phosphorylation pattern of Pgp, thereby altering its activity.

The majority of chemosensitizers identified to date may be grouped into six broad categories, based on their primary pharmacological activity: (a) calcium channel blockers, (b) calmodulin antagonists, (c) cyclic peptides, (d) steroids and hormonal analogues, (e) dipyridamole, and (f) miscellaneous other compounds (Table 5)

Table 5. Selected pharmacological agents with ability to reverse multidrug resistance (MDR modulator) [13]

Calcium channel blockers	Cyclic peptides
R-verapamil (5-10 μ M)	Cyclosporin A (0.8-2 μ M)
Dexniguldipine (0.1-1 μ M)	SDZ PSC 833 (0.1-1 μ M)
Gallipamil (5 μ M)	SDZ 280-446 (0.1-1 μ M)
Ro11-2933 (2-6 μ M)	FK506 (3 μ M)
PAK-200 (5 μ M)	Rapamycin (3 μ M)
Calmodulin antagonists	Vinca alkaloid analogues
Trifluoperazine (3-5 μ M)	Vindoline (20-50 μ M)
Fluphenazine (3 μ M)	Thaliblastine (2 μ M)
Trans-Flupenthixol (3 μ M)	Miscellaneous compounds
Protein kinase C inhibitors	S9788 (1-3 μ M)
Calphostin C (250 nM)	GF120918 (0.02-0.1 μ M)
Staurosporine (200 nM)	Tolyporphin (0.1-0.5 μ M)
CGP41251 (150 nM)	Dipyridamole (5-10 μ M)
NPC15437 (60 μ M)	BIBW22 (1 μ M)
Safingol (20-50 μ M)	Quinidine (10 μ M)
Steroid agents	Terfenadine (3-6 μ M)
Progesterone (2 μ M)	Risperine (5 μ M)
Tamoxifen (2-10 μ M)	Amiodarone (4 μ M)
Toremifene (5-10 μ M)	Methadone (75 μ M)
Megestrol acetate (5 μ M)	

6. Pgp and MDR mRNA expression detection

In vitro studies have demonstrated a central role of MDR expression in multidrug resistance (MDR). It is of obvious clinical interest to develop reliable diagnostic tests for MDR expression in human tumor tissues and to evaluate these tests for correlation

with the tumor response to chemotherapeutic drugs. Such tests can be based on detection of either MDR mRNA or of the protein product of the *MDR1* gene, P-glycoprotein. [Increased expression of the human *MDR1* gene does not generally require gene amplification; therefore, assays designed to detect amplification of the *MDR1* gene would not constitute a valid diagnostic procedure.] The immunological and RNA hybridization assays available, however, may not be sufficient for clinically relevant MDR. The advent of revolutionary polymerase chain reaction (PCR) technology for in vitro DNA amplification has enabled us to develop a novel approach to this problem, especially RT-PCR.

Based on the experimental systems, there are several ways in which information about expression of MDR mRNA can be used to treat human cancer. The first category of such approaches has been alluded to already and involves the use of MDR mRNA levels for diagnostic purposes and to design drug therapy. If MDR mRNA levels are low in a tumor in an individual patient, this information might help direct which drug protocols to use in such a patient. Alternatively, if MDR mRNA levels are high in a patient with a tumor that normally responds to chemotherapy, it might be sensible to choose drug to which the MDR system does not confer resistance. In a patient with a drug-sensitive tumor, monitoring of MDR mRNA levels might allow a determination of when to switch chemotherapy, before that tumor becomes determinations of MDR mRNA expression in a patient's tumor. MDR mRNA levels could be determined by analysis of total mRNA from a primary tumor or metastasis by using RT-PCR (Figure 2) or slot blot hybridization analysis, by in situ RNA detection, or measurement of P-glycoprotein levels by Western blot analysis using monoclonal antibodies (Figure 3) or by immunohistochemical measurement of P-glycoprotein level.



Figure 2. MDR1 mRNA level in multidrug resistance cell line (lane 1) and primary culture from leukemic patients (lane 2-5) compared with β -actin used as gene control (lane 6-10).

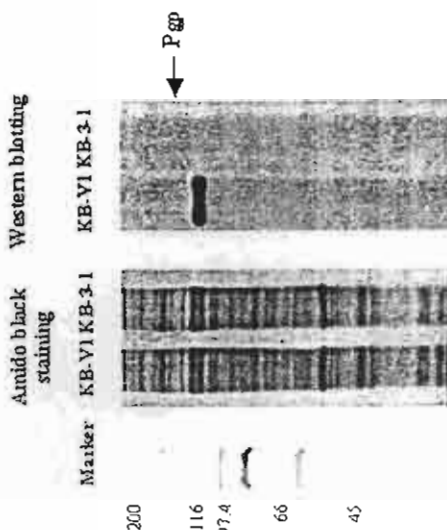


Figure 3. P-glycoprotein expression in drug resistance cell line, KB-VI and drug sensitive cell line, KB-3-1 by Western blot analysis.

References

1. Georg GI, Chen TT, Ojima I, and Vyas DM. Taxane anticancer agents: basic science and current status. American Chemical Society: Washington DC, 1995.
2. Vatanasapt N, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipon S, Sriamporn S, Parkin DM, Ferlay J. Cancer in Thailand 1988-1991. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 1995; 4:475-83.
3. Ambudkar SV, Dey S, Hryeyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:361-98.
4. Tan B, Pivnicka-Worms D, Raier L. Multidrug resistance transporters and modulation. Curr Opin Oncol. 2000;12:450-8.
5. Sharom FJ, Yu X, Lu P, Chu JW, Szabo K, Muller M, Hose CD, Monks A, Varadi A, Seprodi J, Sarkadi B. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems and intact cells. Biochem Pharmacol. 1999; 58: 571-86.
6. Sikic BI. Modulation of multidrug resistance: a paradigm for translational clinical research. Oncology (Huntingt). 1999;13:183-7.
7. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cell in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res. 1970; 30: 1174-84.
8. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta. 1976; 455: 152-62.

9. Glisson B., Gupta R., Hodges P., Ross W. Cross-resistance to intercalating agents in an epipodophylotoxin-resistant Chinese hamster ovary cell line: evidence for a common intracellular target. *Cancer Res.* 1986; 46: 1939-42.
10. Peter WHM., Roelofs HMJ. Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 1992; 52: 1886-90.
11. Scheper JR., Broxterman HJ., Scheffer GL. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 1993; 53: 1475-9.
12. Scheffer GL., Wijngaard PLJ., Flens MJ. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med.* 1995; 1: 578-82.
13. Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer.* 1996; 32A: 912-20.
14. Leighton JC., Goldstein LJ. P-glycoprotein in adult solid tumours: expression and prognostic significance. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1995; 9: 251-74.
15. Weinstein RS., Jakate SM., Dominguez JM. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 1991; 51: 2720-6.
16. Tobe SW., Noble-Topham SE., Andrulis IL., Hartwick WJ., Ssorecki KL., Earner E. Expression of the multiple drug resistance gene in human renal cell carcinoma depends on tumor histology, grade, and stage. *Clin Cancer Res.* 1995; 1: 1611-5.
17. Giaccone G., Linn SC., Pinedo HM. Multidrug resistance in breast cancer: mechanisms, strategies. *Eur J Cancer.* 1995; 31A (Suppl.7): S15-7.
18. Biedler JL. Genetic aspects of multidrug resistance. *CANCER supplement.* 1992; 70: 1799-809.
19. Nielsen IM., Pedersen V., Nymark M. Comparative pharmacology of flupenthixol and some reference neuroleptics. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1973; 33: 353-62.
20. Ford JM., Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev.* 1990; 42: 156-99.

H005

EFFECT OF CURCUMINOIDS ON MULTIDRUG RESISTANCE 1 (MDR1) GENE EXPRESSION IN LEUKEMIC PATIENTS

Anuchapreeda S.¹, Saoin S.¹, Limtrakul P.²¹ Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences,² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand

Leukemias are frequently phenomenon in world-wide. The cancer cells develop tends to multidrug resistance phenotype in long term treatment. MDR cancer cells are characterized by the overexpression of multidrug resistance1 (*MDR1*) gene which encode P-glycoprotein (Pgp), the surface protein of tumor cells. Pgp leads to excessive efflux and insufficient intracellular concentration of chemotherapeutic agents. MDR modulators have the potential to change phenotype of cancer cells. A curcuminoid mixture is well known for its anticancer, anti-inflammatory, anti-ulcer, and etc. The objective was to investigate the effect of curcuminoids on *MDR1* gene expression in leukemic patients by RT-PCR. The leukemic cells were collected from 23 patients; 18 cases of ALL and 5 cases of AML, 17 males and 6 females. The age ranged from 1 to 16 years old. Leukemic cells were cultured with curcuminoids for 48 hours. The result found that curcuminoids reduced *MDR1* gene expression in 11 ALL and 1 AML cases. Curcuminoids affected the *MDR1* gene expression in 3 cases of relapsed, 5 cases of drug maintenance, 2 cases of completed treatment and 2 cases of new cases patients. Drug maintenance case was probably expressed *MDR1* more than other stages. When leukemic cells were treated by curcuminoids, the percentages of *MDR1* expression were reduced by 15% to 97% of cell control. The summary, the results were inconclusive, which requires further study.



เชียงใหม่เวชสาร

CHIANG MAI MEDICAL BULLETIN

ปีที่ 43 ฉบับที่ 3 (เสริม) กันยายน 2547

VOL.43 NO.3 (Suppl) SEPTEMBER 2004

กำหนดการและบทคัดย่อ

การประชุมวิชาการวันมหิดล ครั้งที่ 28

24 กันยายน 2547

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract Supplement

28th Annual Scientific Meeting on Mahidol's Day

24 September 2004

Faculty of Medicine, Chiang Mai University

ISSN 0125-5983

ผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

ทรงยศ อุนขปริศา,¹ ภัทรา ธนรัตนกร,² สมใจ สิทธิปรีชาชาญ,² พงาม ลิ้มตระกูล³

¹ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์, ²ภาควิชากุมารเวชศาสตร์, ³ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ความเป็นมา มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย เป็นกลุ่มของมะเร็งที่พบบ่อยที่สุด (ประมาณร้อยละ 30 ของมะเร็งที่พบ) ประกอบด้วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีอุบัติการณ์สูงโดยเฉพาะ ALL และพบว่าโปรตีนวิลมทูเมอร์1 (WT1) มีผลต่อการแบ่งเซลล์จึงทำให้มีการแสดงออกของWT1ที่สูงมาก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

วิธีการ เก็บตัวอย่างไขกระดูกจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 31 รายจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ มาศึกษาผลของสารสกัดสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ ที่ความเข้มข้น 10 μM ต่อการแสดงออกของยีน *WT1* โดยวัดระดับ *WT1* mRNA ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction ตรวจสอบปริมาณโดยใช้ 0.75% Agarose gel electrophoresis จากนั้นวัดความเข้มของแถบ (band) ที่ย้อมด้วยเอทริเดียมโบรไมด์ด้วยเครื่อง densitometer โดยใช้ mRNA ที่แยกได้จากเซลล์ K562 เป็นตัวเปรียบเทียบ (ให้ค่าการแสดงออกของ *WT1* mRNA ของ K562 เท่ากับ 100%) นอกจากนี้ยังได้นำเซลล์มะเร็งชนิด K562 มาทำการทดสอบกับสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ร่วมด้วย เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ได้จากไขกระดูก

ผลการศึกษา การศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อระดับของ *WT1* mRNA โดยการวัดความเข้มของแถบด้วย densitometer เปรียบเทียบกับแถบของตัวอย่างที่ได้จากเซลล์ K562 พบว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถลดระดับของ *WT1* mRNA ได้ในเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกของผู้ป่วย 18 ราย (ร้อยละ 58) เมื่อแยกระดับของการแสดงออกของยีน *WT1* ออกเป็น 3 ระดับ คือระดับต่ำ (ร้อยละ 1-20), ระดับปานกลาง (ร้อยละ 21-60) และระดับสูง (ร้อยละ 61-100) พบว่ามีจำนวนตัวอย่างของเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกของผู้ป่วยทั้ง 3 ระดับที่มีปริมาณของ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับร้อยละ 78, 46 และ 56 ตามลำดับ โดยเทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ในแต่ละระดับการแสดงออกของยีน *WT1* เมื่อทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้จากไขกระดูกของผู้ป่วย พบว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถลดระดับของ *WT1* mRNA ได้ร้อยละ 36 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (K562 ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมินอยด์)

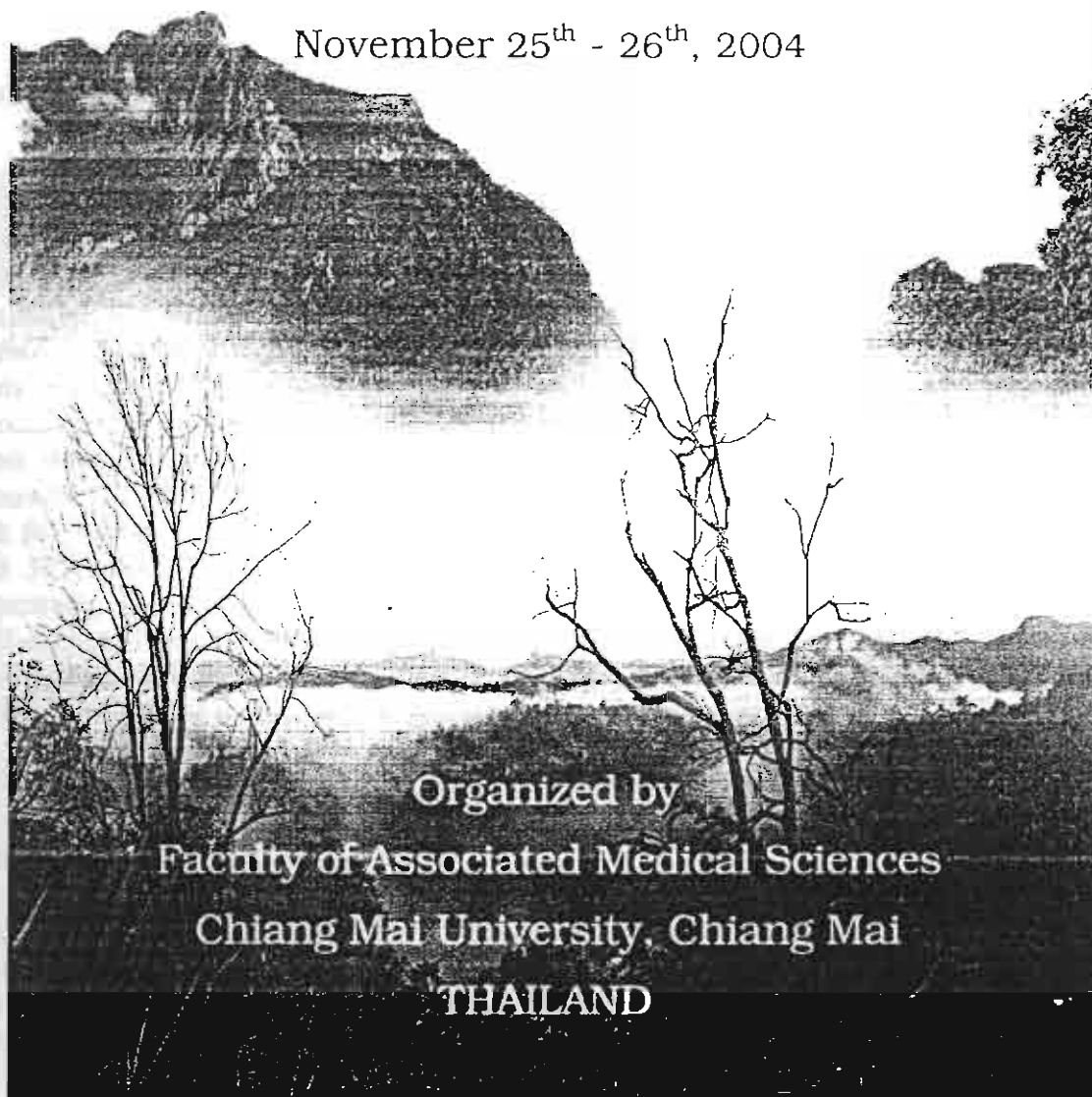
สรุป เคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันสามารถลดระดับการแสดงออกของ *WT1* mRNA ได้ทั้งในเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ซึ่งให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินอยด์ให้ผลในการลดการแสดงออกของยีน *WT1* ทั้งในเซลล์ของผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน จึงเป็นไปได้ว่า เคอร์คิวมินอยด์น่าจะนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในอนาคต

แหล่งทุนสนับสนุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และทุนอุดหนุนการวิจัยคณะเทคนิคการแพทย์ ประจำปีงบประมาณ 2546 และได้ผ่านการพิจารณาทางจริยธรรมเรียบร้อยแล้ว (เอกสารเลขที่ 174/2526)



International Colloquium 2004
Health Benefits and Applications of
Polyphenols

November 25th - 26th, 2004



Organized by

Faculty of Associated Medical Sciences

Chiang Mai University, Chiang Mai

THAILAND

Sponsored by

Chiang Mai University, CMU

Network of Development of Thai Natural Products for Health and Beauty.

Office of Commission for Higher Education

The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program

EFFECT OF TURMERIC CURCUMINOIDS ON *WT1* GENE EXPRESSION IN PATIENT LEUKEMIC CELLS AND K562 CELL LINE

Songyot Anuchapreeda^{a,*}, Prasit chanarat^a, Pattra Thanarattanakorn^b,
Somjai Sittipreechacharn^b, Pornngarm Limtrakul^c

^aDepartment of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University 50200, Thailand.

^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.

^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand;
e-mail: songyot@chiangmai.ac.th

Abstract

Leukemias are frequent phenomenon world-wide. Wilms'tumor1 (WT1) protein is highly expressed in leukemic blast cells of myeloid and lymphoid origin. Thus, WT1 mRNA serves as a tumor marker for leukemias detection and monitoring disease progression. Curcuminoids is well known for its anticancer property. The objective was to investigate the effect of curcuminoids on *WT1* gene expression in patient leukemic cells and leukemic cell line, K562. The leukemic cells were collected from bone marrow of 31 leukemic patients. Leukemic cells were cultured in the presence or absence of 10 μ M curcuminoids for 48 hours. WT1 mRNA levels were determined by RT-PCR. K562 cell line was also treated with curcuminoids under the same conditions and served as 100% WT1 mRNA expression. The effect of curcuminoids on WT1 gene expression from these two experiments was compared in parallel. *WT1* mRNA level was low (1-20%) in 9 cases, medium (21-60%) in 13 cases and high (61-100%) in 9 cases. *WT1* gene expression was decreased by curcuminoids in 18 of total 31 patients (58%), which accounted for 78% (7/9), 46% (6/13) and 56% (5/9), respectively. Curcuminoids treatment in K562 cell lines also resulted in a decrease of 36% WT1 mRNA. These findings showed that curcuminoids decreased WT1 mRNA level both in patient leukemic cells and in K562 cell lines. Thus, curcuminoids treatment may provide a guideline for clinical treatment in leukemic patients in the future.

Keywords: Curcuminoids; WT1; Leukemic cells; K562 cell lines

Introduction

Leukemias are group of clonal disease characterized by an accumulation of abnormal blood cells which are thought to drive from single cell in the marrow which has undergone a genetic alteration. Malignant transformation occurs as a result of the accumulation of genetic mutation in cellular genes. Some cases of mutations in oncogenes have provided useful molecular marker for the course monitoring of disease during treatment. The abl translocation in chronic myelogenous leukemia (CML) is a good example. Recently, the detection of overexpression in specific oncogenes or tumor suppressor genes may provide information that is useful in the diagnosis of leukemia and prognosis disease. The overexpression of Wilms' tumor (WT1) in leukemia is a good example. WT1 is expressed in stem cells of the bone marrow, but not in normal mature blood cells [1,2]. Previous studies demonstrated that *WT1* gene is highly expressed in leukemic blast cells of myeloid and lymphoid origin, and thus, WT1 messenger RNA provides a novel tumor marker for detection of minimal residual disease of leukemias and for monitoring disease progression of myelodysplastic syndromes. It had been demonstrated before that the *WT1* gene is expressed in the leukemic cell lines,

K562 and HL60, and that differentiation of these cells in culture is accompanied by downregulation of WT1 protein levels [3,4].

The *WT1* gene is defined as tumor suppressor gene in childhood renal tumor. However, the wild-type *WT1* gene is highly expressed in leukemic blast cells. Miwa [5] and Miyagi [6] examined *WT1* gene expression in leukemias using Northern blot analysis and detected *WT1* gene expression in some case of acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoid leukemia (ALL), and chronic myeloid leukemia (CML) in accelerated phase or blast crisis. Inoue [7] provided a new insight into the significance of *WT1* gene expression in leukemias by quantifying the expression levels of *WT1* gene by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). In all leukemia samples examined including AML, ALL and CML, significant levels of *WT1* gene expression were found, and the average levels were approximately 1,000 and 100,000 times higher than those in normal bone marrow or peripheral blood cells, respectively [8]. Moreover, Bergmann [9] reported a correlation between the *WT1* mRNA levels and prognosis. These findings demonstrated that the *WT1* mRNA is a novel tumor marker in leukemic blast cells and its expression level is a new prognostic factor for acute leukemia.

The function of WT1 protein, which is zinc finger protein and domains characteristic of transcription factor, is not well understood. The level of expression is highest in leukemias with immature phenotypes [5,6,7]. Expression of WT1 is downregulated during differentiation of leukemic cell lines. So, it plays an important role in cell proliferation of blast cells.

Curcuminoids are a natural phenolic coloring compound found in rhizomes of *Curcuma longa* Linn, a member of Zingiberaceae or ginger family, commonly called turmeric. Curcuminoids content in turmeric varies from 1 to 5 % of fresh turmeric rhizome and it has been identified as the major yellow pigment in turmeric. It has been widely used as a spice, to color cheese and butter, as a cosmetic and in some medicinal preparations [10, 11]. Curcuminoids are the major active pigments of turmeric; curcumin (curcuminI), demethoxycurcumin (curcuminII) and bisdemethoxycurcumin (curcuminIII). These three curcuminoids always mix together after curcuminoid isolation from turmeric powder. It was sometime calls curcuminoid mixture. Curcuminoids have a wide range of biological and pharmacological activities including, antioxidant [12-14] and anti-inflammatory properties [11], anti-mutagenic activity *in vitro* [15], anti-carcinogenic effects [16-18], hypocholesterolemic effects in rat [19], hypoglycemic effects in humans [20] and MDR modulator [21]. The safety of curcuminoids has been studied in various animal models [22] and it is clear that turmeric is not toxic even at the high doses in the laboratory animals. A single feeding of a 30 percent turmeric diet to rat did not produce any toxic effects. In a 24 – h acute toxicity study, mice were fed dosages of 0.5, 1.0 and 3.0 g/kg of turmeric extract daily. There was no increase in mortality rate when compared to the respective controls in either study. The 90-day treatment with turmeric extract resulted in no significant weight gain [23].

Due to its wide range of biological and pharmacological effects, lack of toxicity in animal models, curcuminoids were applied in leukemia. This paper aims to examine the inhibitory effect of curcuminoids on *WT1* gene expression in both leukemic patient cells and K562 cell line. This research may be use as a guide line for further study the effect of curcuminoids on WT1 protein expression and curcuminoid application in clinical trial in future.

Materials and Methods

Materials

Commercial grade curcuminoids (77% curcumin, 17% demethoxycurcumin and 3% bisdemethoxycurcumin) and MTT viability assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). RPMI1640, SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase reagent, TRIZOL® reagent, Penicillin-Streptomycin, L-glutamine and primers were purchased from Invitrogen™ Life Technology (Carlsbad, CA, USA).

Bone Marrow Leukemic Cells and Cell Lines Culture Conditions

The bone marrow leukemic cells (BM) were collected from bone marrow of 31 leukemic patients; 26 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL), 4 cases of acute myelogenous leukemia (AML) and 1 case of chronic myelocytic leukemia (CML); 20 males and 11 females. The age ranged from 1 to 16 years old. Each cell type of leukemia was identified by French-American-British (FAB) Cooperation Group classification. Treatment was classified as follows: completed treatments; relapse cases; drug maintenance and new case. These samples were collected from Maharaj Nakornchiangmai Hospital, Chiang Mai, Thailand. Leukemic cells were washed twice with ice cold phosphate buffer saline (PBS). After that, red blood cells were lysed by hypotonic buffer solution. Cells were cultured in completed RPMI1640 presence and absence of 10 µM curcuminoids for 48 hours in humidified incubator with an atmosphere of 95 % air and 5% CO₂ at 37°C. K562 cell line was used as a positive control cell in this experiment due to the high expression level of WT1 mRNA.

The erythroid leukemic cell line (K562) was generous gifts from Dr. Chaisuree Suphavilai (Research Institute for Health Sciences (RIHES), Chiang Mai, Thailand). This cell line was cultured in RPMI1640 plus 10% fetal calf serum, 1 mM L-glutamine, 50 units/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Cells were maintained in humidified incubator with an atmosphere of 95 % air and 5% CO₂ at 37°C. When the cells reached confluency, they were harvested and plated for consequent passages or for curcuminoids treatments.

The effects of curcuminoids on cell growth were observed by examining morphology of the cultures by an inverted phase contrast microscope. The trypanblue exclusion method was observed to check cell viability.

Measurement of curcuminoids cytotoxicity

Cell survival is determined by using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay as described [24]. MTT assay was performed by plating cells in 96 well plates (3.0×10^5 cells/ well), in 200 µL medium, and incubating before drug treatment at 37°C for 24 h. After 24 h, a various concentrations of curcuminoids were added in medium (100 µL) and incubated for another 24 h. The metabolic activity in each well was determined by the MTT assay and compared to untreated cells. Briefly, after removal of 100 µL medium, MTT stock dye solution was added (15 µL/100 µL medium) to each well, the plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. After 4 h, the solubilization/stop solution 100 µL was added to each well and mixed thoroughly to dissolve the dye crystals. The absorbance was measured by using ELISA plate reader at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. The fractional absorbance was calculated by the following formula.

$$\% \text{ Cell survival} = \frac{\text{Mean absorbance in test wells}}{\text{Mean absorbance in control wells}} \times 100$$

RNA Extraction and Quantitative RT-PCR

RNA of bone marrow leukemic cells and K562 cell line were isolated by TriZOL reagent[®] and RT-PCR was performed using One-step RT-PCR[®] (Invitrogen[™] Life Technology). For *WT1*, the sense primer sequence for exon 7 used was 5'-GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3' and the antisense primer for exon 10 sequence used was 5'-GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3', corresponding to residues 780-800 and residues 1232-1253, respectively, of the published cDNA sequence [25]. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA at 60°C for 30 min and denatured at 94°C for 2 min. PCR amplification was performed for 30 cycles of sequential denaturation (94°C, 1 min); annealing (60°C, 1 min); and extension (72°C, 1 min). Using these primers, PCR yields gave a 474-bp product. Evaluation of β-actin expression, used as control of the RNA amount, was carried out by using the sense primer sequence 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' and the antisense primer sequence 5'-TTGAAGGTCTCAAACATGAT-3' corresponding to residues 216-235 and residues 405-424, respectively, which yield a 201-bp product. cDNA was synthesized at 55°C for 30 min and denatured at 94°C for 2 min. PCR amplification was performed for 30 cycles of sequential denaturation (94°C, 1 min); annealing (55°C, 1 min); and extension (72°C, 1 min). For negative control, water was amplified a total of 30 cycles to detect possible contamination. A total 15 µL of each PCR product was electrophoresed in 1X Tris/acetate/EDTA (TAE) electrophoresis buffer on a 1% agarose gel. Gels were stained with 2 µg/mL ethidium bromide and analyzed by scanning densitometer (BIO-RAD).

Statistical analysis

Data were the mean ± standard deviation of mean from triplicate samples of three independent experiments. Differences between the means were analyzed by one-way analysis of variance. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Results

Scientists are currently trying to identify a new compound as a candidate for anticancer drug. Dietary plants, for example, turmeric, chili, ginger, pepper and garlic are of central interest in Thailand. Turmeric curcuminoids, a major active component of the food flavor turmeric (*Curcuma longa* Linn.); consist of three major active ingredients; curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Curcuminoids, in particular, display a role in numerous biological properties, including antioxidant and anti-inflammatory effect, as well as anti-mutagen, anticancer properties. Moreover, the curcuminoids also inhibit oncogene expression.

The cytotoxicity of curcuminoids on the leukemic cells, K562 was determined by MTT assay. The cytotoxicity effect result showed that curcuminoids exhibited an excellent cytotoxicity effect on K562 cell lines with the inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) approximately 20 µg/mL (54.3 µM). For mRNA detection, IC_{80} was used for curcuminoids treatment. The IC_{80} was 6.25 µg/mL (17 µM) as showed in Figure 1.

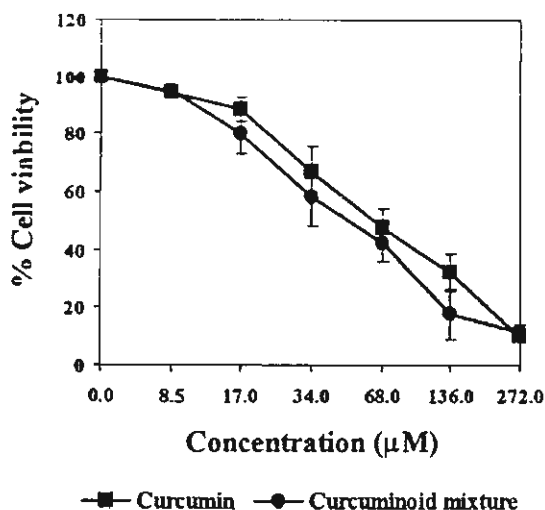


Fig. 1. Cytotoxicity of curcumin and curcuminoid mixture on K562 cell line. Cells (3×10^5 cells/well), in 200 μ L medium were grown in the presence of 0.4% DMSO (vehicle control) or various concentration of curcuminoids for 24 h. The numbers of viable cells were determined by MTT assay. Each point represents the mean value for three independent experiments performed in triplicate.

Wilms'tumor1 (WT1) protein is highly expressed in leukemic blast cells of myeloid and lymphoid origin. Thus, WT1 mRNA serves as a tumor marker for leukemia detection and monitoring disease progression. In this research, we focus on the inhibition of curcuminoids on the WT1 mRNA level determined by RT-PCR. We expect to elucidate if the turmeric curcuminoids inhibit WT1 mRNA level. This research will be the novel report because the effect of turmeric curcuminoids on WT1 mRNA level in patient leukemic cells and K562 cell line have not been reported now. Curcuminoids are well known for its anticancer property. This experiment, we used K562 cell line used as a model for patient leukemic cells comparison. K562 was treated with 10 μ M curcuminoids for 24 hours which did not show the effect on cell viability.

It was found that both curcuminoid mixture significantly decreased *WT1* gene expression in three time independent experiment. Moreover, curcumin, the major compound of curcuminoid mixture, also exhibited the inhibition of WT1 mRNA as same as curcuminoid mixture. WT1 mRNA level after curcuminoids mixture and curcumin treatment in K562 cell lines was found that WT1 mRNA was decreased by 36% and 37% of control, respectively. The value of the WT1 gene expression divided by the β -actin gene expression was used for comparison with the expression of the WT1 gene, with the value of WT1 gene expression in K562 cells defined as 100% (Figure 2).

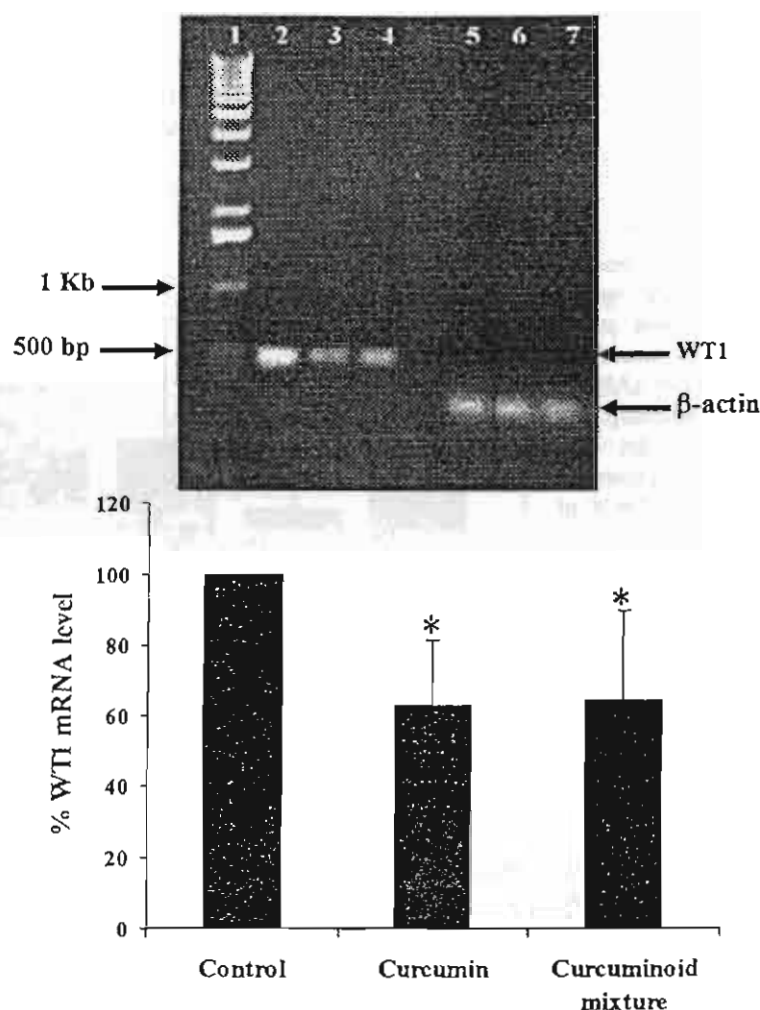


Fig. 2. Analysis of the effects of curcuminoids treatment (curcumin and curcuminoid mixture) on *WT1* mRNA levels in K562 cell line. The *WT1* and β -actin mRNA levels following treatment with 10 μ M curcumin and curcuminoid mixture for 48 h were determined by RT-PCR. The PCR products (474 bp *WT1* and 201 bp β -actin) were run in 1% agarose gel. The bands were quantitated by scan densitometer. *WT1* gene expression was measured and normalized to β -actin expression. Data are the mean values $\pm$ standard deviation of three independent experiments. Key: (*) significantly different from the control ($p < 0.05$). Lane1 = Marker (bp); lane 2 = *WT1* mRNA from K562 cell line (Control); lane 3 = *WT1* mRNA from K562 + curcumin; lane4 = *WT1* mRNA from K562 + curcuminoid mixture; lane 5 = β -actin mRNA from K562 cell line (Control); lane 6 = β -actin mRNA from K562 + curcumin; lane 7 = β -actin mRNA from K562 + curcuminoid mixture.

Whereas slightly decreased was observed when cells were treated with demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin (data not show). However, bisdemethoxycurcumin can inhibit *WT1* gene expression better than demethoxycurcumin which was not appeared to show any effect on *WT1* gene expression.

The study of *WT1* gene expression in patient leukemic cells in group of leukemic patients; relapsed cases, drug maintenance, completed treatment and new cases, were found that relapsed case and new cases showed the highest level of *WT1* mRNA level that found in leukemic cells came from bone marrow (58.7% and 55.3%, respectively). While, drug maintenance and completed treatment showed the lower *WT1* mRNA levels by 34.6% and 29.4%, respectively (Figure 3). The effect of curcuminoids on *WT1* gene expression in patient leukemic cells revealed that 18 leukemic patients (of total 31 patients; 58%) were decreased *WT1* mRNA level by curcuminoid treatment (Figure 4a, 4b, 5a and 5b); 3/5 cases of relapsed (60% of total relapsed cases), 7/15 cases of drug maintenance (47% of total drug maintenance), 3/4 cases of completed treatment (75% of total completed treatment) and 5/7

International Colloquium 2004, Health Benefits and Applications of Polyphenols, November 25th-26th, 2004
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

cases of new cases patients (71% of total new cases). The level of *WT1* gene expression showed low level (1-20%), medium level (21-60%) and high level (61-100%). The curcuminoids responses in three levels accounted for 78% (7/9), 46% (6/13) and 56% (5/9), of total sample in each level, respectively (Figure 6).

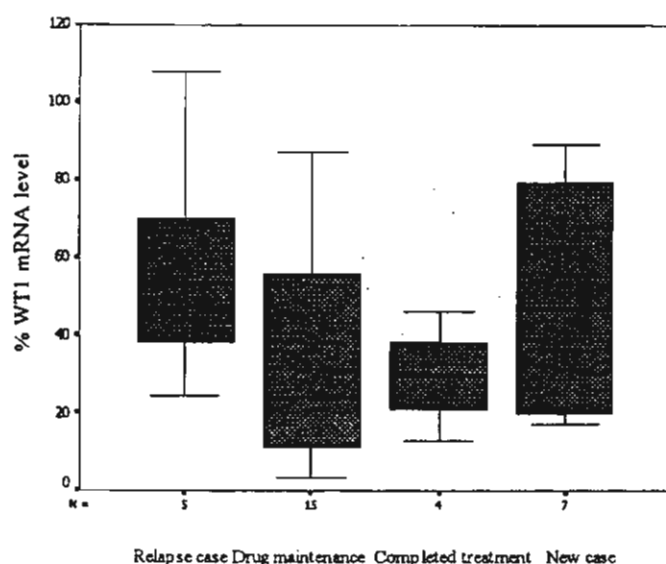


Fig. 3. *WT1* gene expression in patient leukemic cells (31 samples) in group of leukemic patients; relapse cases, drug maintenance, completed treatment and new cases. The *WT1* mRNAs were determined by RT-PCR and quantitated by scan densitometer. The relative levels of *WT1* gene expression in each patient cell (defined in K562 cells as 100% expression). PCR for *WT1* and β -actin were performed 35 cycles.

Discussion

The properties of curcuminoids in anticancer activity were found in many researches including in our group. We found that curcuminoids effects on the proliferation of several cancer cell lines, including Hep-2 (human larynx cancer), PC-9 and PC-14 (human lung cancer), Hep-1 (mouse hepatoma) and F-25 (mutate H-ras transfected NIH mouse fibroblast) by MTT assay [26]. The effect of curcuminoids on K562 cell line showed the inhibitory effect by IC_{50} (54 μ M) that was less toxic than HL60 and U937 cell lines with 19 μ M and 24 μ M, respectively (8.8 μ g/mL and 7.2 μ g/mL, respectively) (data not show). The cytotoxic effect of curcuminoids in both cell lines presented at a concentration more than 8 μ M (3 μ g/mL) at IC_{80} . This result related to Kuo's report that curcumin induced apoptosis in HL60 cell line at the concentration as low as 3.5 μ g/mL [14]. Recently the *WT1* gene, the one of marker in leukemia, was showed to overexpress in leukemic cells, K562 and HL60 by RT-PCR [27]. This inhibitory effect by curcuminoids regulated a wide variety of genes that require AP1 and NF κ B activation which promote cell proliferation and cell differentiation. These transcription factors are generally known as protein kinase C (PKC) regulation that also found to regulate *WT1* protein by phosphorylation at C-terminal domain [28] which concerned cell proliferation in leukemic cells. Duvoix found that curcumin inhibit GSTP1-1 mRNA as well as protein which correlated to the apoptotic effect on K562 cell line [29].

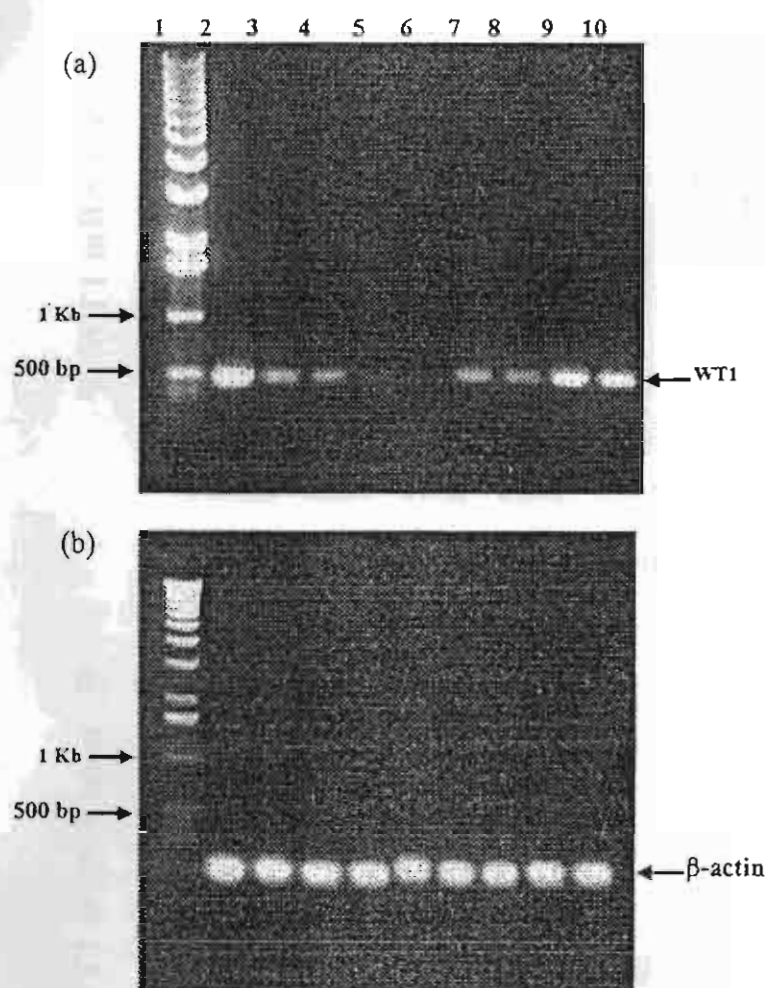


Fig.4. Gel electrophoresis analysis of the effects of curcuminoids treatment on WT1 mRNA in 4 example samples of leukemic patient cells. mRNA from 4 samples (The WT1 (a) and β -actin (b) mRNA levels following treatment with 10 μ M curcuminoids for 48 h were determined by RT-PCR. The PCR products (474 bp WT1 and 201 bp β -actin) were run in 1% agarose gel. No.1 = Marker; No.2 = K562 cell line (Positive); No.3 = sample 020M; No.4 = sample 020M + curcuminoids; No.5 = sample 021M; No.6 = sample 021M + curcuminoids; No.7 = sample 022M; No.8 = sample 022M + curcuminoids; No.9 = sample 023M; No.10 = sample 023M + curcuminoids.

After curcuminoid treatment with 10 μ M (nontoxic dose), the result showed the WT1 mRNA was decreased by curcuminoids both curcuminoid mixture and curcumin (the major curcuminoids in turmeric curcuminoid mixture) which extracted and separated 3 forms of curcuminoids from turmeric powder with high purity [30]. The effect of curcuminoids on WT1 gene expression in leukemic cell lines has not been reported. WT1 mRNA was expressed in relapsed cases and new cases more than drug maintenance and completed treatment. It was suggested that WT1 is the biological marker and a prognostic factor for the detection leukemia. WT1 protein had been reported that plays an important role in early hematopoiesis and controls cell differentiation so it absences in mature blood cells [1,2]. For AML, cases of the lowest levels of WT1 expression were observed in the differentiated leukemia, M4 and M5. The effect of curcuminoids, at the same concentration as K562 treatment, on patient leukemic cells from bone marrow showed the inhibitory effect by 58% of total samples. Almost these curcuminoids responsive leukemic cell samples were ALL derived from childhood leukaemia (16/26; 62%). Another was AML (2/4; 50%) but absence in CML. The concentration of curcuminoids was not effect in cell viability by MTT assay and trypan blue exclusion method (data not show). The level of WT1 gene expression showed three levels which were low level, medium level, and high level. These levels used the WT1 mRNA level from K562 cell line as positive control (100%) as measured by scan densitometer. The curcuminoids responses by WT1 mRNA decrease in three levels. Thus, curcuminoids can effect in every levels in patient leukaemic cells. This curcuminoids effecting result in leukemic patient cells are correlated in that of K562 cell line.

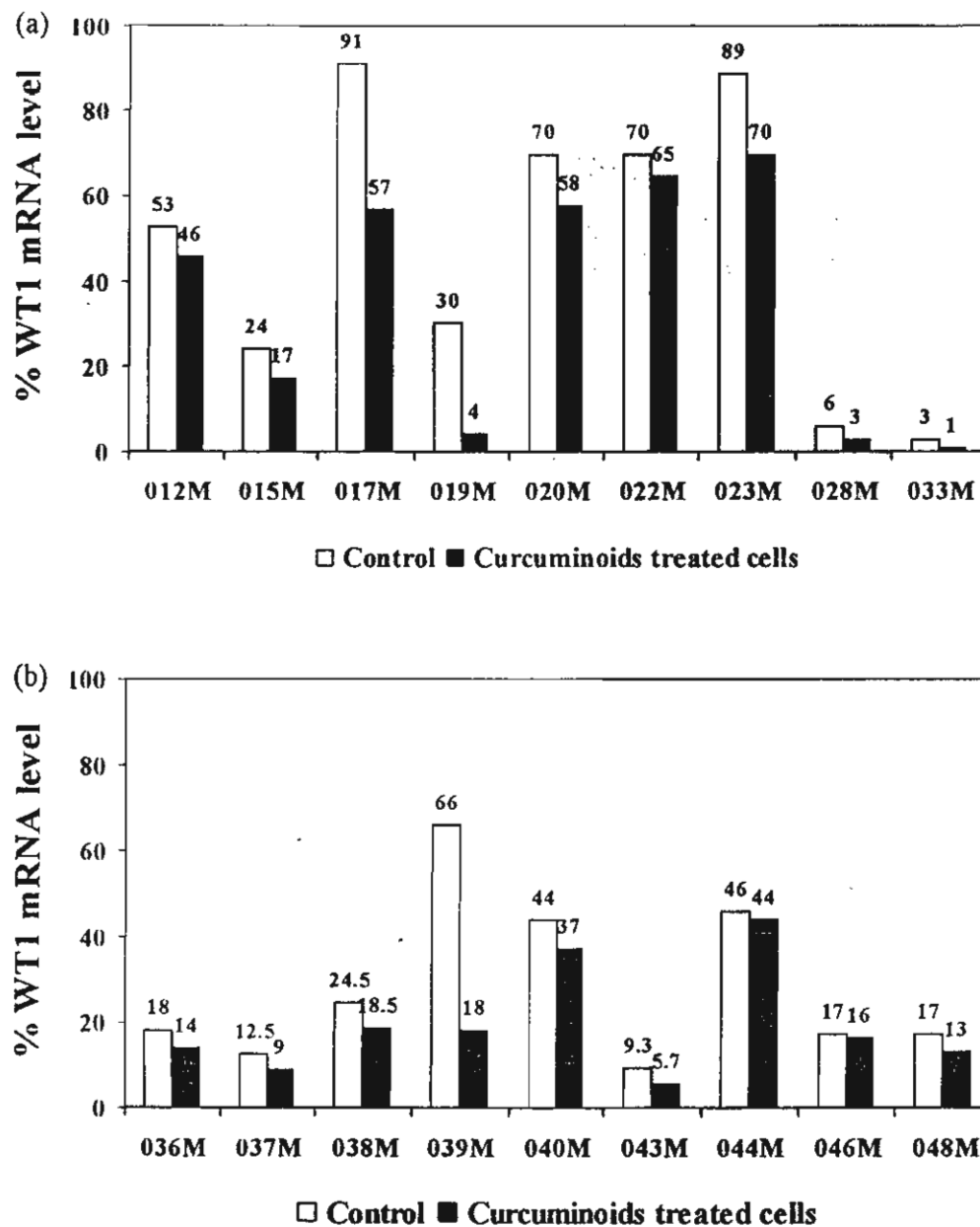


Fig. 5. Analysis of the effects of curcuminoids treatment on WT1 mRNA in the 18 samples of leukemic patient cells ((a) and (b)). The WT1 and β -actin mRNA levels following treatment with 10 μ M curcuminoids for 48 h were determined by RT-PCR. The PCR products (474 bp WT1 and 201 bp β -actin) were run in 1% agarose gel. The bands were quantitated by scan densitometer. WT1 gene expression was measured and normalized to β -actin expression. The relative levels of WT1 gene expression in each patient cell (defined in K562 cells as 100% expression).

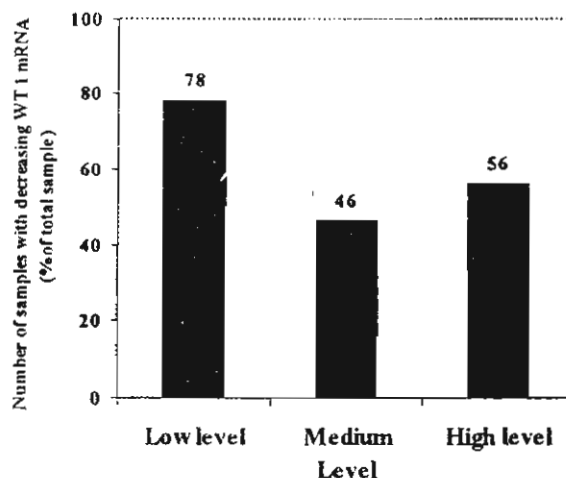


Fig. 6. *WT1* gene expression in each level (low, medium and high) in leukemic patient cells which were decreased by curcuminoids (18 samples). The *WT1* mRNAs were determined by RT-PCR and quantitated by scan densitometer. The relative levels of *WT1* gene expression in each patient cell (defined in K562 cells as 100% expression). PCR for *WT1* and β -actin were performed 35 cycles. The numbers of samples were defined in total number of each level as 100%).

This finding may be important for patient leukemic treatment in the future. Since curcuminoids can be potentially used as a chemotherapeutic agent. This research works may be move forward to for the clinical trials study in the future. In summary, curcuminoids treatment can decrease *WT1* mRNA level both leukemic patient cells and K562 cell lines. Curcuminoids also decreased *WT1* mRNA levels in three levels of *WT1* gene expression. This research may be use as a guide line for curcuminoids treatment in clinical leukemic patients in the future.

Acknowledgements: This work was supported by Grant from the Thailand Research Fund (TRF) and Faculty of Associated Medical Sciences Endowment Fund. We are grateful to Dr. Pranee Leechanachai and Tanawan Samleerat for helpful suggestion.

References

1. Fraizer GC, Patmasiriwat P, Zhang XH, Saunders GF. Expression of the tumour suppressor gene *WT1* in both human and bone marrow. *Blood* 1995; 86: 4704-6.
2. Patmasiriwat P, Fraizer GC, Claxton D, Kantarjian H, Saunders GF. Expression of *WT1* and *GATA-1* in AML with chromosome 16q22 abnormalities. *Leukemia* 1996; 10: 1127-33.
3. Phelan SA, Lindberg C, Call KM. Wilms' tumor gene, *WT1*, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell growth Differ* 1994; 5: 677-86.
4. Sekiya M, Adachi M, Hinoda Y, Imai K, Yachi A. Down-regulation of Wilms' tumor gene (*WT1*) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood* 1994; 83: 1876-82.
5. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of Wilms' tumor gene in human leukemias. *Leukemia* 1992; 6: 405-9.
6. Miyaki T, Ahuji H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I. Expression of candidate Wilms' tumor gene, *WT1*, in human leukemia cells. *Leukemia* 1993; 7: 970-7.

7. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K, Kyo T, Dohy H, Nakauchi H, Ishidate T, Akiyama T, Kishimoto T. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84: 3071-9.
8. Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: Oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001; 73: 177-87.
9. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D. High level of Wilms' tumor gene (WT) mRNA in acute myeloid leukemia are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997; 90: 1217-25.
10. Govindarajan VS. Turmeric: Chemistry, technology and quality. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; 12:199-301.
11. Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991; 57:1-7.
12. Kunchandy E, Rao MNA. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int J Pharm* 1990; 58: 237-240.
13. Soudamini KK, Kuttan R. Inhibition chemical carcinogenesis by curcumin. *J Ethnopharmacol* 1989; 27: 227-33.
14. Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and antitumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 95-100.
15. Nagabhushan M, Amonkar AJ, Bhide SV. In vitro antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol* 1987; 25: 545-7.
16. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon cancer by dietary curcumin. *Ann NY Acad Sci* 1995, 768: 201-4.
17. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1997, 116: 197-203.
18. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Lipigorngoson S, Dunn FW. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin. *BMC Cancer* 2001; 1: 1-7.
19. Rao DS, Sekhara NC, Satyanarayana MN, Srinivasan M. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *J Nutr* 1970; 100: 1307-15.
20. Srinivasan M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. *Indian J Med Sci* 1972; 26: 269-70.
21. Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith M, Ambudkar SV, Limtrakul P. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in Multidrug resistant human KB cells. *Biochem pharmacol* 2002; 64: 573-82.
22. Qureshi S, Shah AH, Ageel AM. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. *Planta Medica* 1992; 58: 124-7.
23. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on Turmeric: acute toxicity studies in rats, guinea pigs and monkeys. *Indian J Exp Biol* 1980; 18: 73-5.
24. Alley MC, Scudiero DA and Monks A. Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48: 589-601.
25. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawamaki M, Asada M, Kishimoto T, Sugiyama H. Expression of Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90, 194-204.
26. Limtrakul P, Chearwae W, Anuchapreeda S. The effect of curcumin on the proliferation of cancer cell lines. *Chiang Mai Med Bull* 1999; 38: 55-61.

27. Wu YJ, Fraizer DC, Suanders GF. GATA-1 transactivates the WT1 hematopoietic specific enhancer. *J Biol Chem* 1995; 270: 5944-9.
28. Ye Y, Raychaudhuri B, Gurney A, Campbell CE and Williams BR. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translation. *EMBO J* 1996; 15: 5606-15.
29. Dovoix A, Morcean F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger, Galteau MM, Dicota M, Diederich M. Inhibition of apoptosis by curcumin mediated by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1475-83.
30. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Buddhasukh D. Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. *BMC Cancer* 2004; 4:1-6.



วารสารเทคนิคการแพทย์

ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 (ฉบับเสริม) เมษายน 2548
Vol.33 (1) Supplement April 2005

Journal of the Medical Technologist Association of Thailand

การประชุมวิชาการประจำปี
สมาคมเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 29
กระบวนทัศน์ใหม่ของนักเทคนิคการแพทย์ :
การบูรณาการเพื่อสุขภาพ
New Paradigm of Medical Technologist :
Integration for Health

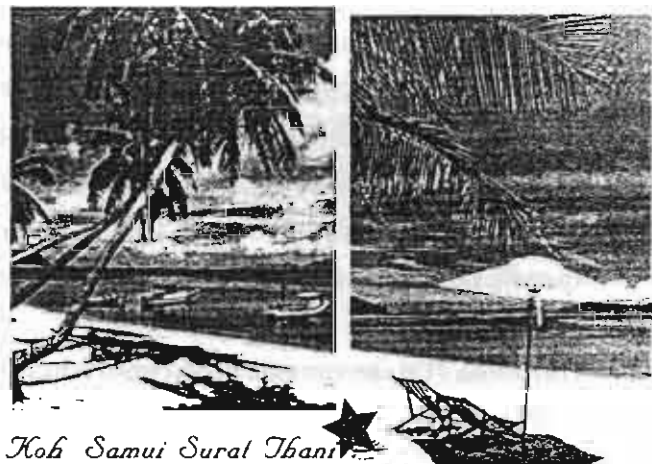
วิทยาการทันโลก

วิกฤติไข้หวัดนก : สถานการณ์ที่เปลี่ยนไป
การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย : จากงานวิจัยสู่ผลิตภัณฑ์
นาโนไบโอเทคโนโลยี : นวัตกรรมสู่การส่งเสริมสุขภาพ
การประยุกต์ใช้ความรู้ Genomics/Proteomics
Nucleic Acids Testing กับงานธนาคารเลือด
การใช้สารเคมีที่ปลอดภัย
บทคัดย่อฉบับสั้น
เจาะลึก GMO

สาระวิชาชีพ

สภาวะวิชาชีพกับการพัฒนาเทคนิคการแพทย์
มิติใหม่ของการทำงานอย่างบูรณาการ
เทคนิคการแพทย์กับงานในอนาคต
การรับรองมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์

An Official
Publication of
The Association of
Medical Technologist
of Thailand



Koh Samui Surat Thani

27 - 29 เมษายน 2548
โรงแรมโดมอนด์พลาซ่า สุราษฎร์ธานี

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออก ของยีนวิลมทูเมอร์1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ของผู้ป่วยลิวกีเมีย

ทรงยศ อนุชปรีดา¹, นิตวรา วิกัณ¹, ภัทรา ธนรัตนกร², สมใจ สิริปรีชาชาญ²,
สิงห์คำ ธิมา¹, พรงาม ลิ้มตระกูล³

¹ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งที่
แยกได้จากไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจำนวน 71 ราย

วัสดุวิธีการ: นำเซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกมาทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (จิกม่า-อัลดริช) ที่ความ
เข้มข้น 10 μ M ตรวจสอบระดับ *WT1* mRNA ด้วยวิธี RT-PCR

ผลการวิจัย : การแสดงออกของยีน *WT1* ในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้งมีระดับที่สูงกว่าใน
ผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงให้เคมีบำบัดและผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรมแล้วตามลำดับ
เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเคอร์คิวมิน พบว่าสามารถลดระดับของ *WT1* mRNA
ได้ในเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกของผู้ป่วย 40/70 ราย (57%) จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ *WT1*
mRNA ที่ลดลงเมื่อพิจารณาในกลุ่มของผู้ป่วยใหม่, ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นอีกครั้ง, ผู้ป่วยที่อยู่ใน
ช่วงให้เคมีบำบัดและผู้ป่วยที่ให้ยาครบตามโปรแกรม เท่ากับ 64, 50, 58 และ 50% ตามลำดับ
เมื่อแยกระดับของการแสดงออกของยีน *WT1* ออกเป็นระดับต่ำ, ปานกลาง และสูง พบว่ามี
จำนวนตัวอย่างของเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกที่มีปริมาณของ *WT1* mRNA ที่ลดลงเท่ากับ 40,
67 และ 78% ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย: เคอร์คิวมินสามารถลดระดับการแสดงออกของ *WT1* mRNA ได้ในเซลล์ไข
กระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว จึงเป็นไปได้ว่า เคอร์คิวมินน่าจะนำมาใช้ในการรักษา
มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในอนาคต