



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน
วิลส์ทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันต่อการยับยั้งการทำงานของ
โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

ผู้วิจัย

- 1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา
- 2 รองศาสตราจารย์ ดร. พรغام เดชเกรียงไกรกุล
- 3 นางสาวสุวรรณา เสมศรี

สังกัด

- สังกัดคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สังกัดคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สังกัดคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ ทำขึ้นเพื่อเป็นรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ต่อทุนอุดหนุนการวิจัย ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2551 โดยโครงการนี้เป็นโครงการที่ศึกษากลไกของเคอร์คิวมิน จากขมิ้นชันต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน วิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ซึ่งที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อต้องการตอบคำถามผลการทดลองที่ผ่านมาว่า เคอร์คิวมินมีกลไกอย่างไรในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันรวมทั้งโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการส่งสัญญาณในระดับอณูชีวโมเลกุลของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันใน pathway ใด นอกจากนี้ยังสามารถบอกถึง pathway ที่สำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยมีโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเป็นโปรตีนที่สำคัญในการควบคุมด้วย การทดลองนี้ได้ใช้เซลล์ K562 ซึ่งเป็น erythrocytic leukemia ที่ได้มาจากผู้ป่วย chronic myelocytic leukemia เป็นต้นแบบในการศึกษากลไกของเคอร์คิวมินในการยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถนำไปอ้างอิง และเป็นแนวทางสำหรับงานวิจัยชิ้นอื่นๆต่อไปในอนาคต ซึ่งผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานการวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยท่านอื่น ที่ทำงานเกี่ยวกับทางด้านสมุนไพรและมะเร็ง รวมทั้งผู้ที่สนใจทั่วไปได้เป็นอย่างดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2551 ที่ได้มอบเงินสนับสนุนการศึกษานี้จนประสบความสำเร็จตามเป้าหมายที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี

.....
(ทรงยศ อนุชปรีดา)

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. พรงาม ลิมตระกูล ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทั้งยังเคยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาขณะที่ข้าพเจ้าศึกษาปริญญาเอกเป็นอย่างสูงยิ่ง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนทั้งทางด้านเทคนิคการวิจัย และความรู้ รวมทั้งเครื่องมือ หรืออุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งยังทำให้ข้าพเจ้ามีแรงบันดาลใจในการทำงานวิจัยนี้ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ ผศ. ปฐม ปฐมชนพงษ์ อาจารย์ประจำแขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ได้ให้การสนับสนุนในการวิจัยนี้เป็นอย่างดี พร้อมทั้งให้กำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณ Assoc. Prof. Dr. Colleen Sweeney รวมทั้งนักวิจัย ของสถาบัน Biochemistry & Molecular Medicine, UC Davis School of Medicine, UC Davis Medical Center, Sacramento, California, USA ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมี บางส่วนในการศึกษาวิเคราะห์การทดลองในบางส่วน ขอขอบคุณ ดร. ฉายสุรีย์ สุภวิไล ที่ได้อนุเคราะห์เซลล์มะเร็งชนิด K562 เพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของแขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งสถานที่และเครื่องมือเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ นายสิงห์คำ ธิมา นางสาวสุวรรณา เสมศรี ที่ได้ช่วยเหลืองานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ. ปัญจะ และอาจารย์ ส่องสี กุลพงศ์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความรัก ความเมตตา เอาใจช่วย เป็นกำลังใจและสนับสนุนการทำวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีแก่ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้าที่เข้าใจ และเป็นแรงสนับสนุนในการทำงานวิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณทุนโครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ปีงบประมาณ 2551 ที่ได้มอบเงินสนับสนุนการศึกษานี้จนประสบความสำเร็จตามเป้าหมายที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี

III

รหัสโครงการ : MRG5180099

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน
ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

คณะผู้ทำวิจัย ผศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา¹

รศ. ดร. พรจาม ลิ้มตระกูล²

นางสาวสุวรรณา เสมศรี¹

หน่วยงานที่สังกัด ¹แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : songyot@chiangmai.ac.th หรือ sanuchapreedda@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ :

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นมะเร็งที่สามารถพบได้บ่อย จากการศึกษพบว่าภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนจะมีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 (WT1) ในระดับสูง ดังนั้นวิล์มทูเมอร์วัน จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจสอบมะเร็งเม็ดเลือดขาวรวมทั้งใช้ประเมินความรุนแรงของโรคได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการยับยั้งการแสดงออกยังเป็นเรื่องที่ยังไม่ชัดเจนในขณะนี้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มทั้ง 4 ชนิด ในเซลล์ U937 ที่นำวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มเข้าสู่เซลล์ และเพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณในการกระตุ้นการทำงานของวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 จากการศึกษาพบว่า สารสกัดเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งทั้งยีน และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม +/- ได้ดีที่สุด ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่มีการโคลนวิล์มทูเมอร์วันทั้ง 4 ชนิดเข้าไป (exogenous Wilms' tumor 1) โดยผ่านกลไกการทำลายโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน จากการศึกษาของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด endogenous ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยกลไกที่สำคัญคือสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ลดการทำงานของ PKC α ซึ่งอยู่ใน PKC signaling pathway โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ PKC α inhibitor (GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M) ต่อการแสดงออกยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน คือเมื่อยับยั้งการทำงานของ PKC α ทำให้ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันด้วย นอกจากนี้ยังศึกษาต่อถึงกลไกต่อเนื่องในระดับลึกลงไป (downstream) ของ PKC pathway พบว่าโปรตีน JNK เป็นโปรตีนอีกตัวที่เข้ามาเกี่ยวข้อง

เนื่องจากผลการศึกษาของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อโปรตีน phospho kinase พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของ phosphorylation JNK pan (T183/Y185, T221/Y223) ได้ และเมื่อใช้ JNK inhibitor (SP600125 ที่ความเข้มข้น 0.040 μM) ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการศึกษาของสารสกัดเคอร์คิวมิน คือสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ ดังนั้นกลไกที่สำคัญของที่เกี่ยวข้องในการลดระดับของฮีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยสารสกัดเคอร์คิวมิน จะผ่านกลไกการส่งสัญญาณของ PKC และส่งผ่านมาทางโปรตีน JNK โดยโปรตีน JNK จะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานต่อไปที่โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งความสำคัญของกลไกนี้สามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปใช้เพื่ออธิบายกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ในการนำไปประยุกต์ใช้ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในอนาคต

คำหลัก: เคอร์คิวมิน, วิล์มทูเมอร์วัน, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, K562

Project Code : MRG5180099

Project Title : Inhibitory mechanism of curcumin from Turmeric on Wilms' tumor 1 expression in K562 cell line

Authors : Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda¹

Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Limtrakul²

Miss Suwanna Semsri¹

Addresses : ¹Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai,
Thailand

E-mail Address : songyot@chiangmai.ac.th or sanuchapreeda@yahoo.com

Project Period : 2 months

Abstract:

Leukemias commonly occur world-wide. The 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. In previous studies, we found that curcumin could inhibit WT1 mRNA and WT1 protein levels in leukemic cell lines. However, the inhibitory mechanism of curcumin's action is at present unclear. The aims of this study were to investigate the effect of curcumin on WT1 isoforms in U937 transfected cells and to study the inhibitory mechanism of curcumin on the WT1 protein signaling pathway in a K562 cell model. The WT1 (+/+) isoform showed the greatest inhibitory response after curcumin treatment. The inhibitory mechanism of this exogenous WT1 protein was related to the protein degradation mechanism. In addition, the inhibitory effect of curcumin in endogenous WT1 in K562 cells involved the PKC α signaling pathway. This result was in accordance with the results using PKC α inhibitor (0.0084 μ M GF109203x) treatment. GF109203x decreased *WT1* gene and WT1 protein expression. The downstream of PKC α pathway was determined. Curcumin decreased the level of phosphorylation of JNK pan (T183/Y185, T221/Y223). Thus, JNK was the protein signal in the endogenous inhibitory pathway. JNK inhibitor (0.040 μ M SP600125) was used

for confirmation. The *WT1* gene and WT1 protein were inhibited after SP600125 treatment. In summary, the PKC and JNK signaling pathway was the major inhibitory pathway of curcumin on *WT1* gene and WT1 protein expression. Thus, this mechanism increases our basic knowledge concerning curcumin's effect on leukemic cells, and then may facilitate clinical use in the future.

Key words: curcumin, Wilms' tumor 1, leukemia, K562

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งไม่เพียงแต่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ ทำให้เกิดการสูญเสียชีวิตของประชากรและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนมากเท่านั้น แต่โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลกด้วยการเจริญและการแพร่กระจาย (metastasis) ของโรคมะเร็งจนสุดท้ายทำให้เสียชีวิตนั้น เป็นผลมาจากเปลี่ยนแปลงที่สลับซับซ้อนในระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งเอง ซึ่งจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่ใช่ที่เข้าใจมากนัก แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น ปัจจุบันนี้การใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) มีบทบาทสำคัญมากในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาต้านมะเร็งให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น แต่ปัญหาที่สำคัญที่ทำให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จ และไม่มีประสิทธิภาพคือเซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยา (drug resistance) หลังจากที่ได้รับยาต้านมะเร็งอย่างต่อเนื่อง เซลล์มะเร็งที่ดื้อยาจะมีลักษณะที่สำคัญคือ มีการแสดงออกของยีน *MDR1* และพี-กลัยโคโปรตีนที่สูง โดยที่พี-กลัยโคโปรตีนจะทำหน้าที่ในการขับยาออกจากเซลล์ทำให้มียาต้านมะเร็งสะสมในเซลล์น้อยลง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตสูงทั้งที่ได้รับยาต้านมะเร็ง ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลายๆชนิดด้วยกัน เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย (leukemia) เป็นกลุ่มของมะเร็งที่พบบ่อยที่สุด (ประมาณ 30% ของมะเร็งที่พบ) โดยเฉพาะในเด็ก ประกอบด้วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) โดยเฉพาะ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีอุบัติการณ์สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ALL ซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 3-4 รายต่อเด็ก 100,000 คน หรือเท่ากับ 1/3 ของมะเร็งที่เกิดในเด็กในปัจจุบันพบว่าปัญหาผู้ป่วย Leukemia ในจังหวัดเชียงใหม่มีอุบัติการณ์ในการเกิดโรครุนแรงที่สุดในประเทศไทย และพบว่ามีผู้ป่วยที่เกิดภาวะดื้อยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดขึ้นด้วยเนื่องจากการรักษาดูแลด้วยเคมีบำบัดเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นเพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อยาเคมีบำบัด และมีรายงานของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *MDR1* โดยมีเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกตั้งแต่ 19-75% ของผู้ป่วยที่ไม่ได้ทำเคมีบำบัด (untreated AML) ดังนั้นทำให้ทราบว่าผู้ป่วยแต่ละคนจะมีการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่แตกต่างกันและทำให้มีผลต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดที่น่าจะแตกต่างกันออกไปด้วย นอกจากนี้ทำให้ทราบว่า การแสดงออกของยีน *MDR1* สามารถบอกถึงอัตราเสี่ยงต่อการเกิดการดื้อยาในผู้ป่วยได้

จากการศึกษา cell proliferation ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่าโปรตีน WT1 นั้นมีผลต่อการเกิดการแบ่งเซลล์ จึงทำให้มีการแสดงออกของ โปรตีน WT1 ที่สูงมากและสามารถใช้เป็น tumor maker ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ และบ่งบอกถึงความรุนแรงของมะเร็งโดยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน WT1 ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ในการไปจับกับ DNA (DNA-binding) โดยปกติแล้ว WT1 ในมะเร็งชนิดอื่นจะมีหน้าที่เป็น tumor suppressor โดยโปรตีน WT1 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมไม่ให้เซลล์ที่มีความผิดปกติแสดงออก ในระยะหลังยังพบว่า WT1 น่าจะเป็น oncogene ด้วย ในผู้ป่วยที่เป็นลิวคีเมียพบมีการแสดงออกของ WT1 ประมาณ 1,000-10,000 เท่า เมื่อเทียบกับ normal bone marrow และ normal peripheral blood

จากการศึกษาเริ่มแรกของ ผลของเคอร์คิวมินต่อความเป็นพิษต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด K562 (erythrocytic leukemia), U937 (monocytic leukemia), HL60 (myeloblastic leukemia), และ Molt4 (lymphoblastic

VIII

leukemia) พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดได้ดีมาก ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน ซึ่งได้ใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อยีนเป้าหมาย (ยีนวิลมทูเมอร์วัน) จากการทดลองพบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นั้นมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ได้ทั้งระดับ WT1mRNA และ โปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ซึ่งการลดลงของการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันนี้ ส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้น้อยลง อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยทั้งหมด พบว่าการศึกษาในส่วนของการกลไกในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ด้วยเคอร์คิวมิน ยังไม่มีการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หลายการทดลองและการศึกษาทราบแต่เพียงว่า โปรตีนวิลมทูเมอร์วัน เป็น transcription factor ที่เป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นจากการทดลองยังพบอีกว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน ทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และ โปรตีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากความสัมพันธ์ในการยับยั้งโดยเคอร์คิวมินอยด์กับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ พบว่าเคอร์คิวมินอยด์นั้น สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส (protein kinase) ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ protein kinase C (PKC), protein kinase A (PKA) หรือ protein p38 MAPK ดังนั้นจึงสามารถเป็นไปได้ว่า protein kinase ชนิดใดชนิดหนึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้การศึกษานี้ยังสามารถตอบคำถามได้เป็นอย่างดีว่า เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ได้อย่างไร และเกี่ยวข้องกับโปรตีนไคเนสชนิดใด การศึกษานี้ เป็นการศึกษาที่มุ่งเน้นถึงผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของยีนวิลมทูเมอร์วัน ในระดับ intracellular signal transduction pathway เพื่อเป็นข้อมูลในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง โดยใช้สารสกัดเคอร์คิวมินที่ผลิตในลักษณะของยาเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันต่อไปในอนาคต ซึ่งจะมีประโยชน์มากในการที่จะผลักดันให้เคอร์คิวมินสามารถนำมาจัดสิทธิบัตรเพื่อใช้เป็นยาต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 5.1 เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อ WT1 isoforms ทั้ง 4 ชนิด ใน leukemic cell lines ชนิด K562 โดยอาศัย 17AA (+) WT1 และ 17AA(-)WT1 vector
- 5.2 เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณในการกระตุ้นการทำงานของยีนวิลมทูเมอร์วัน ใน leukemic cell lines ชนิด K562

3. ระเบียบวิธีวิจัย ให้แสดงการวางแผนการวิจัย และลำดับขั้นตอนการวิจัย (ถ้ามี)

3.1 การศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อ WT1 isoforms

การโคลนยีน

ทำการ transfect เซลล์ K562 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันน้อย ด้วยเวกเตอร์ที่มี WT1 isoforms 4 ชนิดคือ WT1 17AA (+) KTS (+), WT1 17AA (+) KTS (-), WT1 17AA (-) KTS (+), WT1 17AA (-) KTS (-) โดยใช้ Lipofectin

การศึกษาผลของสารสกัด Curcumin กับ WT1 isoforms

นำโคลนที่คัดเลือกได้มาศึกษาระดับของการเจริญ (growth curve) และความเป็นพิษของสารสกัดเคอร์คิวมินกับเซลล์ K562 ที่ได้รับทำการถ่ายยีนเข้าไป ด้วยวิธี MTT assay

IX

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลของการ transfect ด้วยการสกัดนำส่วนของ nuclear extract มาตรวจสอบดูผลของการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ด้วยวิธี Western Blot ซึ่งสามารถเตรียมโดย นำ nuclear protein ที่แยกได้มาแยกโดยใช้ SDS-PAGE ตรวจสอบโปรตีน WT1 ด้วย rabbit anti-WT1 และ goat anti-rabbit ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal[®] Enhance Chemiluminescence (Pierce) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray (Amersham) ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้ เครื่อง scanning densitometry

เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วทำการทดสอบเซลล์ที่ทำการ transfect ด้วย WT1 isoforms ทั้ง 4 isoforms มาทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 μM เป็นระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน WT1 โดย Western blotting เพื่อต้องการศึกษาว่าสารสกัดเคอร์คิวมินให้ผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ใน isoform ชนิดใดมากที่สุด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน และเปรียบเทียบกับเซลล์ K562 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่สูง (ใช้เพื่อเป็น positive control)

3.3 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนไคเนส (Protein kinase)

เนื่องจากเคยมีรายงานว่าเคอร์คิวมินมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส โดยเฉพาะ PKC, PKA, และ P38 MAPK แต่ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ยังไม่ทราบว่าโปรตีนไคเนสชนิดใดที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์มีการแบ่งตัว (cell proliferation) การทดลองจะทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยการศึกษาด้วยวิธี Protein Microarray ก่อนเพื่อต้องการศึกษาว่าหลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินแล้ว มีโปรตีนไคเนสชนิดใดที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน หลังจากนั้นเมื่อทราบแล้วให้ทำการทดลอง โดยนำเซลล์ K562 มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนไคเนสที่คาดว่าจะเกี่ยวข้อง โดยดูก่อนว่าในเซลล์ K562 มีปริมาณมากน้อยเท่าใด หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาสกัดเอาส่วนของโปรตีนที่ cytoplasm โดยใช้ชุดสกัด NE-PER[®] (Pierce) หลังจากนั้นนำโปรตีนที่แยกได้มาแยกโดยใช้ SDS-PAGE และย้อมด้วย antibody ต่อโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ ใช้วิธีการ reprobe โดยใช้ náยา Restore[™] Western Blot Stripping และย้อมด้วย anti-GAPDH เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมปริมาตร (house keeping gene) ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน GAPDH แล้วจึงเติม goat anti-rabbit ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal[®] Enhance Chemiluminescence (Pierce) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray (Amersham) ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้ เครื่อง scanning densitometry เมื่อทำการศึกษากลับมาโปรตีนไคเนสที่แสดงออกในเซลล์ K562เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นทำการทดสอบด้วย เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 5, 10, และ 15 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูผลของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งโปรตีนไคเนส รวมทั้งโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และใช้ Protein kinase inhibitor ของโปรตีนไคเนสชนิดนั้นเพื่อเป็น positive control และเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง ว่าโปรตีนไคเนส มีผลต่อการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจริง วัน โดยการทดลองนี้ใช้ protein kinase inhibitor ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ ไม่ส่งผลต่อโปรตีนไคเนสตัวอื่นๆ

3.4 ขั้นตอนการวินิจฉัยผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน และ protein kinase inhibitor ต่อระดับการแสดงออก (Expression) ของยีน *WT1* โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Real Time PCR

เมื่อศึกษาผลของโปรตีนไคเนส ต่อการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันแล้ว เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่า โปรตีนไคเนสชนิดนั้นมีผลต่อการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของทั้งเคอร์คิวมิน และ protein kinase inhibitor ต่อการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน โดยการทดลองนี้ใช้ protein kinase inhibitor ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ (specific protein kinase inhibitor ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น) มาใช้เพื่อศึกษาว่าเมื่อโปรตีนไคเนสถูกยับยั้งการทำงานแล้ว ส่งผลทำให้การแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันลดลงด้วยหรือไม่ และผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินหรือไม่ การทดลองทำโดยนำเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด K562 มาทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM รวมทั้ง protein kinase inhibitor ในอาหาร RPMI1640 ที่มี 10% fetal calf serum และ HEPES 10 mM ที่ pH 7.3 เป็นระยะเวลา 2 วันใน 25 cm^2 culture flask โดยมีชุดควบคุมเป็นตัวเปรียบเทียบ หลังจากนั้นนำมาสกัด total RNA ด้วยสารสกัด TRIZOL[®] reagent แล้วนำมาทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ SUPERSRIPT[™] One-step RT-PCR (Invitrogen) หลังจากนั้นนำ product ที่ได้มาส่องดูด้วย UV light และวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้เครื่อง scanning densitometry และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับ Real Time PCR โดยใช้ระบบของ TaqMan probe ทำโดยการใส่โปรแกรมในการคำนวณจาก ABI Prism 7700 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems) การทำ normalization เพื่อปรับปริมาตรของการ load ที่อาจจะไม่เท่ากัน ทำโดยใช้ β -actin gene expression เป็นตัวปรับในตัวอย่างเดียวกัน การทดลองนั้นทำ 2 ซ้ำ

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลและทราบแล้วว่าสารสกัดหยาบเปลือกมังคุด ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดี มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* แล้วให้นำสารสกัดไปมะกรูด จาก fractions นั้นมาลองกระจายความเข้มข้น แล้วทดสอบดูว่ามีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* เป็นแบบ dose dependent หรือไม่

4. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ ในแต่ละช่วง 6 เดือน

แผนงานวิจัย	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือนที่	เดือนที่	เดือนที่	เดือนที่
	1-6	7-12	1-6	7-12
1. การ transfect เซลล์ K562 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันน้อย ด้วยเวกเตอร์ที่มี <i>WT1</i> isoforms 4 ชนิดคือ <i>WT1</i> 17AA (+) KTS (+), <i>WT1</i> 17AA (+) KTS (-), <i>WT1</i> 17AA (-) KTS (+), <i>WT1</i> 17AA (-) KTS (-) โดยใช้ Lipofectin				
ศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อ <i>WT1</i> isoforms และศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนไคเนส (Protein kinase)				

ศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการ แสดงออกของโปรตีนไคเนส (Protein kinase) โดย protein microarray			↔	
ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน และ protein kinase inhibitor ต่อระดับการแสดงออก (Expression) ของ ยีน <i>WT1</i> โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Real Time PCR				↔
สรุปผลการทดลองและเขียนรายงาน				↔

5. ผลงาน/ หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

ตีพิมพ์ปีที่ 2 : Inhibitory mechanism of curcumin on *Wilms' tumor 1* gene expression in K562 cell line

ตีพิมพ์ลงในวารสาร Leukemia Research ที่มี impact factor = 2.372 ในปี ที่ 2

(ลงนาม).....

(นายทรงยศ อนุชปรีดา)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 17 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	III
Abstract	V
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	VII
สารบัญอักษรย่อ	XIV
สารบัญภาพประกอบ	XVI
สารบัญตาราง	XXII
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	22
วิธีการทดลอง	23
ผลการทดลอง	33
วิจารณ์ผลการทดลอง	88
สรุปผลการทดลอง	94
บรรณานุกรม	95
Output ที่ได้จากโครงการ	102

สารบัญย่อ

%	Percent
°C	Degree Celsius
µg	microgram
µM	micromolar
µL	microliter
ng	nanogram
ATP	Adenosine triphosphate
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AML	Acute myeloblastic leukemia
CML	Chronic myelocytic leukemia
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
cm ³	Square centrimetre
DEPC	Diethy pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethy sulfoxide
Dnase	Deoxyribonuclease
dNTPs	Deoxyneucleoside triphosphates
HEPES	N-2-hydroxythypiperazine-N-2-ethanesulphonic acid
kDa	kilodalton
MDR	Multidrug resistance
<i>MDR1, MDR2/3</i>	The isoforms of <i>MDR1</i> gene in human
mL	milliliter
mRNA	Messenger RNA
MgSO ₄	Magnesium sulphate

XIV

OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
P-gp	P-glycoprotein
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolution per minute
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
TAE	Tris acetate EDTA

สารบัญภาพประกอบ

รูปภาพที่	หน้า
1. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML	10
2. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL	10
3. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML	11
4. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL	11
5. แสดงโครงสร้างของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin	19
6. แสดงโครงสร้างของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ในระดับ ดีเอ็นเอ, เอ็มอาร์เอ็นเอ และ โปรตีน	21
7. แสดงโครงสร้างของการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน	21
8. แสดงการตรวจสอบโคลนของ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5- α ที่รับ พลาสมิดเปล่า	33
9. แสดงการตรวจสอบโคลนของ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5- α ที่รับ พลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 +/+	34
10. แสดงการตรวจสอบโคลนของ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5- α ที่รับ พลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 +/-	34
11. แสดงการตรวจสอบโคลนของ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5- α ที่รับ พลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 -/+	35
12. แสดงการตรวจสอบโคลนของ <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5- α ที่รับ พลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 -/-	35
13. แสดงการตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>HindIII</i> และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel	36
14. แสดงการตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>PvI</i> และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel	38
15. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน <i>WT1</i> แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์ เจ้ามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ	38

mock โดยวิธี RT-PCR และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% agarose gel	
16. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน <i>WT1</i> แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock โดยวิธี real time PCR	39
17. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน <i>WT1</i> แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปใน เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control โดยวิธี Western blot	39
18. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน <i>WT1</i> แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปใน เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control โดยวิธี Immunoprecipitation และ Western blot	40
19. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว wild type U937	41
20. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย vector เปล่า (mock control)	42
21. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย <i>WT1</i> (+/+)	43
22. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย <i>WT1</i> (+/-)	44
23. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย <i>WT1</i> (-/+)	45
24. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย <i>WT1</i> (-/-)	46
25. กราฟสรุปรวมผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย 4 isoforms ของ <i>WT1</i> , mock control และ wild type U937	47
26. ผล cytotoxicity ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อ <i>WT1</i> isoform ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937	50
27. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>WT1</i> isoform ทำการทดลอง 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time independent study)	52

28. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยวิธี real time PCR โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study) 53
29. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี real time PCR ทำการทดลอง 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study) 55
30. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot ทำการทดลอง 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study) 57
31. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot ทำการทดลอง 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study) 59
32. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเหมาะสมและสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform 60
33. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน GFP ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 62
34. ผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB2 (676) ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 63
35. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB3 ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 64
36. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 ที่ต่อกับยีน *c-myc* ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 65

37. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ร่วมกับ cyclohexamide ที่ความเข้มข้น 50 μM ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ในเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/- และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot 67
38. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยใช้ cyclohexamide และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot 69
39. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ MG 132 ในเซลล์ K562 ต่อกระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway วัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot 70
40. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ร่วมกับ actinomycin D ต่อความคงตัวของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ทำการศึกษาโดยใช้วิธี real time PCR 71
41. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดแอลฟา (protein kinase $C\alpha$) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 73
42. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดซีต้า (protein kinase $C\epsilon$) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 73
43. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดเดลต้า (protein kinase $C\delta$) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 74
44. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ชนิด non-Phosphorylated form ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 74
45. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ชนิด Phosphorylated form ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 75

46. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน Src ชนิด non-Phosphorylated form (Tyr 416) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	75
47. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน Src ชนิด non-Phosphorylated form (Tyr 527) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	76
48. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT 1 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	77
49. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT 3 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	77
50. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT5 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	78
51. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT6 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	78
52. Profile แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของ phosphorylated protein kinases ชนิดต่างๆ โดยวิธี protein microarray	80
53. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของ phosphorylated protein kinases ชนิดต่างๆ โดยวิธี protein microarray	81
54. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot	82
55. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M และ PKC α inhibitor (GF109203x) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M ต่อการแสดงออกของ	84

- โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot (ก) แสดง Western blot analysis ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และ GAPDH ในเซลล์ K562 (ข) กราฟระดับการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 หลังปรับเทียบปริมาตรด้วย GAPDH
56. ผลของพีเคซีแอลฟา (PKC_{α}) ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ที่ถูก transfect ด้วย Myr. PKC_{α} plasmid โดยวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันด้วยวิธี Western blot 86
57. ผลของ GF109203x (PKC inhibitor) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μM (IC_{50} ของ PKC_{α}) ต่อระดับวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ K562 ในช่วงระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง ทำการทดลองโดยวิธี real time PCR 87
58. แสดงกลไกที่เกี่ยวข้องของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 93

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงจำนวนเซลล์ wild type U937 ที่นับได้ใน 10 วัน	41
2. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย vector เปล่า (mock) ที่นับใน 10 วัน	42
3. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) ที่นับใน 10 วัน	43
4. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/-) ที่นับใน 10 วัน	44
5. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/+) ที่นับใน 10 วัน	45
6. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/-) ที่นับใน 10 วัน	46
7. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อ WT1 isoform ที่ถูก transfect เข้าไปเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 และ wild type U937	48
8. ผลการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันในไอโซฟอร์มต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยวิธี real time PCR	51
9. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform	53
10. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>WT1</i> (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform	54
11. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform	56
12. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM ในระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect	58

ด้วย WT1 (+/+) isoform

13. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการ
แสดงออกของโปรตีน GFP (%) (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้าไปใน
pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 62
14. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อร้อยละ
ของระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB2 (676) (mean $\pm$ SD) ที่
insert ที่เข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
ชนิด K562 63
15. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อร้อยละ
ของระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB3 (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้า
ไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 64
16. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อร้อยละ
ของระดับการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 (mean $\pm$ SD) ซึ่ง taq ด้วย c-
myc ที่แทรกเข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด
ขาวชนิด K562 65
17. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัว
หรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ ในเซลล์ U937 ที่ถูก
transfect ด้วย WT1 ชนิด +/+ 66
18. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัว
หรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิดในเซลล์ K562 68
19. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อ
กระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway โดยใช้ MG
132 ในเซลล์ K562 70
20. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัว
หรือค่าครึ่งชีวิตของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอชนิด +/+ ในเซลล์
K562 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/+ 71
21. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM และ GF
109203x (PKC inhibitor) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μM ต่อระดับการ
แสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 83

22. แสดงระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ที่ถูก transfect ด้วย Myr. PKC α taq FLAG vector 85
23. ผลของ GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M (IC $_{50}$ ของ PKC α) ต่อ ระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ในช่วง ระยะเวลาต่างๆ 87

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งถือเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุข ที่สำคัญของแทบทุกประเทศทั่วโลก โดยในปี พ.ศ.2543 (ค.ศ.2000) องค์การอนามัยโลกได้รายงานว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั้งหมดประมาณ 6.2 ล้านคนหรือประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดประมาณ 56 ล้านคนทั่วโลก นอกจากนี้รายงานฉบับเดียวกันยังมีการคาดการณ์ว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นจาก 10 ล้านคนในปี พ.ศ.2543 เป็น 15 ล้านคนในปี พ.ศ.2563 (1) ซึ่งจากการคาดการณ์นี้จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะเวลาแค่ 20 ปี จะมีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นถึง 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งถือเป็นโรคที่สำคัญและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากที่สุด โดยจากการรายงานของสำนักปลัดกระทรวงสาธารณสุขในปี พ.ศ.2544 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดทั่วประเทศเป็นเวลา 3 ปีติดต่อกันตั้งแต่ปี พ.ศ.2542 ถึง พ.ศ.2544 และมีแนวโน้มของการเสียชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ (2) ส่วนในจังหวัดเชียงใหม่นั้น สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ได้รายงานสถิติของผู้เสียชีวิตด้วยโรคต่าง ๆ ที่สำคัญและพบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทุกชนิดสูงเป็นอันดับ 2 รองมาจากโรคเอดส์เป็นเวลา 3 ปีติดต่อกันตั้งแต่ปี พ.ศ.2542 ถึง พ.ศ.2544 (3) นอกจากนี้สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขยังได้สรุปสถิติการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ และพบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) มากเป็นอันดับ 3 ของโรคมะเร็งและเนื้องอกร้ายทั้งหมด โดยมีผู้เสียชีวิตในทุกช่วงอายุ คือตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 5 ปีไปจนถึงมากกว่า 85 ปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งได้มีการสรุปว่า จังหวัดเชียงใหม่มีอุบัติการณ์ในการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงที่สุดในประเทศไทย (4) โดยที่อุบัติการณ์ของโรค AML ที่พบในประชากรทั่วไปเท่ากับ 2-3 คนต่อประชากร 100,000 คน จากการศึกษาพบว่า AML พบได้ประมาณร้อยละ 80 ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันที่พบในผู้ใหญ่ ในขณะที่ ALL พบได้ประมาณร้อยละ 80 ในเด็กที่ป่วยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (5)

สาเหตุของโรคมะเร็งโดยทั่วไป เกิดจากความผิดปกติของระบบการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell growth) โดยอาจจะเกิดจากการสูญเสียการทำงานของยีนที่มีหน้าที่ชะลอและควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (tumor suppressor gene) หรืออาจจะเกิดจากการทำงานที่มากกว่าปกติของยีนที่กระตุ้นการแบ่งตัว (oncogene) โดยความผิดปกติของยีนเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดจะพบการแสดงออกของยีน Wilms' tumor1 (*WT1* gene) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 (11p13) (6) โดยปกติแล้วยีน *WT1* ในมะเร็งหลายชนิดทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้เกิดเซลล์ที่มีความผิดปกติหรือเรียกว่า tumor suppressor gene (7, 8) แต่ในระยะหลังมีการศึกษาพบว่า *WT1* น่าจะทำหน้าที่

เป็น oncogene ด้วย (9) โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *WT1* ประมาณ 1,000 ถึง 100,000 เท่าเมื่อเทียบกับ normal bone marrow และ normal peripheral blood ตามลำดับ (10) ยีน *WT1* นี้จะกำหนดการสร้างโปรตีนที่เรียกว่า WT1 ซึ่งโดยปกติแล้ว WT1 มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมไปถึงเซลล์เม็ดเลือดด้วย และสามารถตรวจพบโปรตีน WT1 ได้ทั้งในกระแสเลือดและไขกระดูกแต่ปริมาณน้อย ในขณะที่พบปริมาณที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน WT1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด cell proliferation, cell differentiation รวมทั้งการเกิด cell apoptosis ขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (11, 12) ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงได้ศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *WT1* และโปรตีน WT1 ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวกันมากขึ้น และพบว่าสามารถนำการแสดงออกนี้มาใช้เป็น biological marker ในการทำนายความรุนแรงของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ รวมไปถึงในโรค minimal residual disease (MRD) อีกด้วย (9,13)

ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นนิยมที่จะรักษาด้วยการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งให้ผลดีมากในระยะแรกของการรักษาแต่เมื่อรักษาไปได้ระยะหนึ่งจะพบว่ายาเคมีบำบัดมักทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยและในบางครั้งส่งผลให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยมะเร็งด้วย ทำให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ได้ผลตามที่แพทย์ผู้รักษาต้องการ โดยพบว่าเซลล์มะเร็งมีการเพิ่มปริมาณของโปรตีนชนิดหนึ่งที่ผิวเซลล์เพิ่มมากขึ้น ทำหน้าที่ในการขับยาออกนอกเซลล์ ซึ่งเราเรียกว่าพี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein) ซึ่งกลไกในการสร้างพี-กลัยโคโปรตีนนี้เป็นผลจากเคมีบำบัดที่ให้กับผู้ป่วยเป็นระยะเวลาที่นาน ทำให้เซลล์มะเร็งสร้างกลไกที่จะป้องกันตัวเองเพื่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้พยายามค้นหาสารที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็ง และยาที่ทำหน้าที่ในการปรับเปลี่ยนฟีโนไทป์ของการดื้อยาให้มีการตอบสนองต่อยามากขึ้น ซึ่งยาที่ต้องการนี้ต้องมีคุณสมบัติที่สามารถเป็นทั้งยาต้านมะเร็งและสามารถลดการแสดงออกของยีน *MDR1* ได้ และสารสกัดนี้ต้องมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาเคมีบำบัด โดยการทดลองนี้ให้ความสนใจกับสารที่ได้มาจากอาหารที่บริโภคกันเป็นประจำ เช่น ขมิ้น พริก ขิง พริกไทย และกระเทียม เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งขมิ้นชันนั้นมีสารออกฤทธิ์ที่มีชื่อว่า เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ที่มีฤทธิ์เป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ, ด้านการอักเสบ, ด้านการกลายพันธุ์ (anti-mutagen) และสารต้านมะเร็ง (anti-tumor) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนมะเร็งได้ด้วย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเอาสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ได้จากขมิ้นชันมาใช้ในการป้องกัน และรักษามะเร็งหลายชนิดได้ จากการศึกษพบว่าเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วยสารประกอบ 3 ชนิด คือ เคอร์คิวมิน (curcumin) ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (demethoxycurcumin) และบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (bisdemethoxycurcumin) ซึ่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน (14-17) โดยที่สารเคอร์คิวมินนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง (antitumor-promoting) และสารต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (antiproliferative activities) (18-21) รวมทั้งเป็น MDR modulator

ด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาได้พบแล้วว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของทั้ง WT1 mRNA และ WT1 protein ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหากลไกของเคอร์คิวมิน ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ทั้งระดับ WT1 mRNA และ WT1 protein โดยใช้วิธีการศึกษาระดับการแสดงออกของ protein kinase ต่างๆที่เคยมีรายงานว่าเคอร์คิวมินมีผลในการยับยั้งการทำงานด้วย เนื่องจากว่า WT1 protein ต้องมีการถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยการเติมฟอสเฟต การศึกษาว่าการยับยั้งนั้นอยากทราบว่าเป็นการยับยั้ง isoform ไດ ซึ่งงานเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษา นอกจากนี้จากการศึกษานี้ยังได้ดูไปถึง protein-DNA binding ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน WT1 promoter ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้ทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ว่า WT1 protein นั้นถูกควบคุมด้วย protein kinase ชนิดใด และเคอร์คิวมินยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ทั้งระดับ WT1 mRNA และ WT1 protein ได้อย่างไร

ที่มาของโครงการ

โรคมะเร็งไม่เพียงแต่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศทำให้เกิดการสูญเสียชีวิตของประชากรและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนมากเท่านั้น แต่โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลกด้วย การเจริญและการแพร่กระจาย (metastasis) ของโรคมะเร็งจนสุดท้ายทำให้เสียชีวิตนั้น เป็นผลมาจากเปลี่ยนแปลงที่สลับซับซ้อนในระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งเอง ซึ่งจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น ปัจจุบันนี้การใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) มีบทบาทสำคัญมากในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะในปัจจุบันได้มีการพัฒนาด้านมะเร็งให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น แต่ปัญหาที่สำคัญที่ทำให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จ และไม่มีประสิทธิภาพคือเซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยา (drug resistance) หลังจากที่ได้รับยาต้านมะเร็งอย่างต่อเนื่อง เซลล์มะเร็งที่ดื้อยาจะมีลักษณะที่สำคัญคือ มีการแสดงออกของยีน *MDR1* และพี-กลัยโคโปรตีนที่สูง โดยที่พี-กลัยโคโปรตีนจะทำหน้าที่ในการขับยาออกจากเซลล์ทำให้มียาด้านมะเร็งสะสมในเซลล์น้อยลง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตสูง ทั้งๆที่ได้รับยาต้านมะเร็ง ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลายๆชนิดด้วยกัน เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย (leukemia) เป็นกลุ่มของมะเร็งที่พบบ่อยที่สุด (ประมาณ 30% ของมะเร็งที่พบ) โดยเฉพาะในเด็ก ประกอบด้วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) โดยเฉพาะ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีอุบัติการณ์สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ALL ซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 3-4 รายต่อเด็ก 100,000 คน หรือเท่ากับ 1/3 ของมะเร็งที่เกิดในเด็กในปัจจุบันพบว่าปัญหาผู้ป่วย Leukemia ในจังหวัดเชียงใหม่มีอุบัติการณ์ในการเกิดโรคสูงที่สุดในประเทศไทย และพบว่ามีผู้ป่วยที่เกิดภาวะดื้อยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดขึ้นด้วย เนื่องจากว่ามีการรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นระยะเวลายาวนาน ดังนั้นเพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ด

เลือดขาวที่ดื้อยาเคมีบำบัด และมีรายงานของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของยีน *MDR1* โดยมีเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกตั้งแต่ 19-75% ของผู้ป่วยที่ไม่ได้ทำเคมี บำบัด (untreated AML) ดังนั้นทำให้ทราบว่าผู้ป่วยแต่ละคนจะมีการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่แตกต่าง กันและทำให้มีผลต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดที่น่าที่จะแตกต่างกันออกไปด้วย นอกจากนี้ทำให้ทราบว่า การแสดงออกของยีน *MDR1* สามารถบอกถึงอัตราเสี่ยงต่อการเกิดการดื้อยาในผู้ป่วยได้

จากการศึกษา cell proliferation ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่าโปรตีน WT1 นั้นมีผลต่อการเกิด การแบ่งเซลล์จึงทำให้มีการแสดงออกของ โปรตีน WT1 ที่สูงมากและสามารถใช้เป็น tumor maker ใน ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้และบ่งบอกถึงความรุนแรงของมะเร็งโดยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้น การทำงานของโปรตีน WT1 ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ในการไปจับกับ DNA (DNA-binding) โดยปกติแล้ว WT1 ในมะเร็งชนิดอื่นจะมีหน้าที่เป็น tumor suppressor โดยโปรตีน WT1 มีการ แสดงออกที่สูงขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมไม่ให้เซลล์ที่มีความผิดปกติแสดงออก ในระยะหลังยัง พบว่า WT1 น่าจะเป็น oncogene ด้วย ในผู้ป่วยที่เป็นลิวคีเมียพบว่าการแสดงออกของ WT1 ประมาณ 1,000-10,000 เท่า เมื่อเทียบกับ normal bone marrow และ normal peripheral blood

จากการศึกษาเริ่มแรกของ ผลของเคอร์คิวมินต่อความเป็นพิษต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด K562 (erythrocytic leukemia), U937 (monocytic leukemia), HL60 (myeloblastic leukemia), และ Molt4 (lymphoblastic leukemia) พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดได้ดีมาก ดังนั้นจึงได้ ทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน ซึ่งได้ใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อศึกษาผลของ เคอร์คิวมินต่อยีนเป้าหมาย (ยีนวิล์มทูเมอร์วัน) จากการทดลองพบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็น พิษต่อเซลล์ นั้นมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ได้ทั้งระดับ WT1mRNA และ โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งการลดลงของการแสดงออกของยีนวิล์มทู เมอร์วันนี้ ส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้น้อยลง อย่างไรก็ตามรายงาน การวิจัยทั้งหมด พบว่าการศึกษาในส่วนของกลไกในการกระตุ้นการทำงาน หรือกลไกการยับยั้งการ ทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ด้วยเคอร์คิวมิน ยังไม่มีการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หลายการ ทดลองและการศึกษาทราบแต่เพียงว่า โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เป็น transcription factor ที่เป็นอองโคยีน นอกจากนี้จากการทดลองยังพบอีกว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากความสัมพันธ์ในการยับยั้งโดยเคอร์คิวมิ นอยด์กับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ พบว่าเคอร์คิวมินอยด์นั้น สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน ไคเนส (protein kinase) ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ protein kinase C (PKC), protein kinase A (PKA) หรือ protein p38 MAPK ดังนั้นจึงสามารถเป็นไปได้ว่า protein kinase ชนิดใดชนิดหนึ่งมีบทบาทสำคัญใน กระบวนการในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ การศึกษาในครั้งนี้ ยังสามารถตอบคำถามได้เป็นอย่างดีว่า เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการทำงานของ

โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ได้อย่างไร และเกี่ยวข้องกับโปรตีนไคเนสชนิดใด การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาที่มุ่งเน้นถึงผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ในระดับ intracellular signal transduction pathway เพื่อเป็นข้อมูลในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง โดยใช้สารสกัดเคอร์คิวมินที่ผลิตในลักษณะของยาเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันต่อไปในอนาคต ซึ่งจะมีประโยชน์มากในการที่จะผลักดันให้เคอร์คิวมินสามารถนำมาจดสิทธิบัตรเพื่อใช้เป็นยาด้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต

หลักการ ทฤษฎี เหตุผล และสมมุติฐาน

มะเร็ง คือ กลุ่มโรคที่เกิดจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติของดีเอ็นเอ (DNA) หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต แบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว และมากกว่าปกติ จึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ และในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง ถ้าเซลล์มะเร็งเหล่านี้ เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะ เรียกชื่อ มะเร็งตามอวัยวะนั้นเช่น มะเร็งปอด, มะเร็งสมอง, มะเร็งเต้านม, มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น โรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลก เป็นสาเหตุการตายประมาณ 13% ของคนตายทั้งหมด ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 6 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2537 มีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 18 ล้านคน และมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 9 ล้านคน ในทุกๆ ปี ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดทั่วประเทศ จากสถิติที่ผ่านมาโรคมะเร็ง มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าร้อยละ 50 (22) ทั้งนี้องค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่าในปี 2563 ทั่วโลก จะมีคนตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน และจะเกิดขึ้นในประเทศที่ กำลังพัฒนา (รวมทั้งประเทศไทย) มากกว่า 7 ล้านคน เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง

สาเหตุและปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดโรคมะเร็งมีอยู่ด้วยกันหลายประการ คือ เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือภายนอกในร่างกาย ซึ่งปัจจุบันนี้เชื่อกันว่ามะเร็งส่วนใหญ่ เกิดจากสาเหตุได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น สารพิษจาก เชื้อราที่มีชื่อ อัลฟาทอกซิน (aflatoxin) สารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปิ้งย่าง พวกไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร ชื่อไนโตรซามีน (nitrosamine) สีสผสมอาหารที่มาจากสีข้อมผ้า รังสีเอ็กซ์เรย์ อุลตราไวโอเลตจากแสงแดด เชื้อไวรัส ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสฮิวแมนแพปพิลโลมา (human papilloma virus) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ จากพฤติกรรมบางอย่าง เช่น การสูบบุหรี่และดื่มสุรา เป็นต้น นอกจากนี้ยังเกิดจากความผิดปกติภายในร่างกายหรือความผิดปกติทางด้านพันธุกรรมซึ่งมีเป็นส่วนน้อย เช่น เด็กที่มีความพิการมาแต่กำเนิดมีโอกาสเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น การมีภูมิคุ้มกันที่บกพร่องและภาวะทุพโภชนาการ เช่น การขาดวิตามินบางชนิด เช่น วิตามินเอ และ ซี เป็นต้น จะเห็นว่า มะเร็งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้น มะเร็งก็น่าจะเป็นโรคที่สามารถ ป้องกัน ได้เช่นเดียวกับโรคติดเชื้ออื่นๆ (Hill

R.P, Tannock IF, 1987) ซึ่งสาเหตุและปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบการควบคุมการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ (cell growth) โดยอาจจะเกิดจากการสูญเสียการทำงานของยีนที่มีหน้าที่ชะลอและควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (tumor suppressor gene) หรืออาจจะเกิดจากการทำงานที่มากกว่าปกติของยีนที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (oncogene) เมื่อยีนเหล่านี้ได้รับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมจะผลิตโปรตีนออกมา 5 ชนิด ที่เกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต หรือ growth factor โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสารกระตุ้นการเจริญเติบโตอยู่ที่ผิวเซลล์หรือ receptor โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น GTP-binding protein (G-protein) อยู่ใต้ผนังเซลล์ด้านในคอยรับสัญญาณจาก receptor โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ kinase อยู่ภายในไซโตพลาสซึม แบ่งเป็นเอนไซม์ tyrosine kinase และเอนไซม์ serine/threonine kinase โปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสหรือ nuclear protein ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน เช่น เป็น transcription factor

โดยความผิดปกติของยีนเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดจะพบการแสดงออกของยีนวิลมส์ทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1 gene* หรือ *WT1 gene*) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 ตำแหน่ง 11p13 (6, 23-25) โดยจะสร้างโปรตีนที่เรียกว่าวิลมส์ทูเมอร์วัน หรือ Wilms' tumor 1 (WT1) ซึ่งมีลักษณะของโปรตีนเป็น zinc finger motif protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน ทั้งหมด 429 ตัว และมีส่วนสำคัญอยู่ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนของ 4 zinc fingers ทางปลายด้าน carboxyl terminal ตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 307 ถึง 429 ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการจับกับ DNA (DNA binding domain) และอีกส่วนหนึ่งได้แก่ส่วนปลายด้าน amino terminal ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน proline และ glutamine อยู่มาก เป็นส่วนที่เรียกว่า transregulatory domain ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ transcription ของเซลล์ นอกจากนี้ในบางส่วนของบริเวณระหว่างกรดอะมิโนที่ 226 ถึง 254 จะมีกรดอะมิโน leucine ซ้ำๆ กันเรียกว่า leucine zipper อาจทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein interaction) และยังพบว่ามียีนหลายตำแหน่งที่ทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนตัวอื่น ในระยะแรกพบว่าแล้วยีน WT1 มีความสำคัญมากในการควบคุมการเกิดมะเร็ง เรียกว่า ทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ (tumor suppressor gene) (7,8) คือเมื่อมีความผิดปกติของเซลล์เนื่องจากยีนที่ผิดปกติไป โปรตีนวิลมส์ทูเมอร์วันมีการแสดงออกที่สูงขึ้น เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมไม่ให้เซลล์ที่มีความผิดปกติแสดงออก และยีนวิลมส์ทูเมอร์วันนี้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดวิลมส์ทูเมอร์ (Wilms' tumor) ด้วย ซึ่งพบในเด็ก มีชื่อเรียกว่า childhood kidney tumor เนื่องจากวิลมส์ทูเมอร์วันจะทำหน้าที่ในการยับยั้งไม่ให้เกิดเซลล์มะเร็ง โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ดังนั้นเมื่อยีนวิลมส์ทูเมอร์วันเกิดการกลายพันธุ์ หรือทำงานผิดปกติไป ทำให้ไม่สามารถควบคุมวัฏจักรเซลล์ได้ จึงทำให้เกิดวิลมส์ทูเมอร์ในที่สุด แต่ในระยะหลังพบว่าวิลมส์ทูเมอร์วันเป็นโปรตีนที่เป็นยีนมะเร็งหรืออองโคยีน (oncogene) มากกว่า โดย Prof. Dr. Sugiyama ในเมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น (9, 26-28) ซึ่งพบว่ายีนวิลมส์ทูเมอร์วันเกี่ยวข้องกับการ

เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือที่เรียกว่าลิวคีเมีย (leukemia) และเป็น tumor marker ในลิวคีเมียอีกด้วย ในผู้ป่วยที่เป็นลิวคีเมีย พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ประมาณ 1,000-10,000 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ในไขกระดูกปกติ (normal bone marrow) และในเซลล์เม็ดเลือดปกติ (normal peripheral blood) (10, 13, 29-31) โดยปกติแล้วโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการแก่ตัวโดยปกติในกระบวนการสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณปกติได้ในไขกระดูก และในต่อมน้ำเหลือง (lymph node) จากข้อมูลหลายๆข้อมูลพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาการของเซลล์ทั้งในสายอิริทรอยด์ (erythroid cells), มัยอีลอยด์ (myeloid cells) และ ลิมโฟยด์ (lymphoid cells) การศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่าในส่วน downstream ของ signal transduction ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นักวิจัยพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ (cell proliferation) และการพัฒนาการของเซลล์ (cell differentiation) รวมทั้งการเกิดการตายของเซลล์ (cell apoptosis) ขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยที่การเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นภายในเซลล์นั้นจะพบว่าการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่สูงมากภายในเซลล์ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่แสดงออกอย่างมากภายในเซลล์ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (non mutation gene) แต่อย่างใด เป็นโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่มีรูปร่างปกติ รวมทั้งมียีนปกติด้วย ต่อมาได้มีการศึกษาโดยใช้ antisense oligonucleotide ของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ายีนวิล์มทูเมอร์วันมีการแสดงออกที่น้อยลง และลดการเกิดการแบ่งตัวของเซลล์ของในผู้ป่วยลิวคีเมีย (32,33) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันทำหน้าที่เป็น oncogene ไม่ใช่ tumor suppressor (34-40) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์สนใจที่จะศึกษาถึงการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในมะเร็งเม็ดเลือดขาวกันมากขึ้น โดยพบว่าสามารถใช้การแสดงออกนี้มาเป็นดัชนีบ่งชี้ (marker) สำหรับการทำนายความรุนแรงของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ รวมไปถึงการตรวจหาสถานะ minimal residual disease (MRD) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวอีกด้วย (10-12, 13, 41,42)

การรักษาในผู้ป่วยและมะเร็งแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกัน โดยหลักการการรักษาคือระยะแรกจะควบคุมโรคให้สงบ (remission) หลังจากนั้นจะป้องกันการกลับเป็นซ้ำ (relapse) โดยในการรักษาจะใช้ยาเคมีบำบัด (chemotherapeutic drug) รังสีรักษา (radiotherapy) การปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) โดยการให้เคมีบำบัดขนาดสูงร่วมกับรังสี หรือการสร้างภูมิคุ้มกัน biological therapy โดยการใช้ interferon กับเซลล์มะเร็งได้บางชนิด ซึ่งมีผลข้างเคียงของการรักษาคือ หลักการให้เคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นทำลายเซลล์เซลล์มะเร็งซึ่งมีการแบ่งตัวเร็วแต่ในขณะเดียวกันเคมีบำบัดก็ทำลายเซลล์ปกติด้วย ส่วนการรักษาด้วยรังสีรักษา (radiotherapy) มีผลข้างเคียงทำให้ขนหรือผมจะร่วง ผิวบริเวณดังกล่าวจะแห้ง คัน ส่วนการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) ผู้ป่วยจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงมุ่งค้นหาและศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติหรือพืชสมุนไพร

เพื่อนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็งกันมากขึ้น เนื่องจากมีแนวความคิดว่าพืชสมุนไพร หรือสารสกัดที่ได้จากพืชนั้นน่าจะเป็นพิษน้อย เนื่องจากการนำมาบริโภคกันในชีวิตประจำวันกันอยู่แล้วโดยเฉพาะพืชสมุนไพรพื้นบ้านเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีผลในการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยาสังเคราะห์อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าด้วย ดังนั้นจึงมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง ได้แก่ พืชสมุนไพรที่นำมาใช้บริโภคเป็นอาหาร เช่น พริก พริกไทย ขิง ข่า ตะไคร้ ใบมะกรูด ขมิ้น และกระเทียม เป็นต้น

Anuchapreeda และคณะ (43) ได้ศึกษาผลของเคอร์คิวมิน ต่อ P-glycoprotein (Pgp) บนผิวของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด KB-V1 พบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นที่ 1 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ สามารถลดระดับการแสดงออกของ Pgp และ MDR1 mRNA โดยวิธี Western blot และ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และจากการศึกษาของสิงห์คำ (44) พบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของยีน WT1 ทั้งในระดับของการถอดรหัสและการแปลรหัส (translation) Duvoix และคณะ (45) พบว่าเคอร์คิวมินสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis pathway ในเซลล์มะเร็งชนิด K562 และ Jurkat โดยระดับของ procaspase 8 และ procaspase 9 ลดลง Anuchapreeda และคณะ (46) ได้ศึกษาผลของความเป็นพิษของเคอร์คิวมินต่อเซลล์มะเร็งชนิด K562 และการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเคอร์คิวมินที่ 5-15 μM ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง K562 โดยวิธี MTT และยังสามารถลดการแสดงออกของ วิลมทูเมอร์วัน เอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน โดยวิธี RT-PCR และ Western blot ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ (47) พบว่าเคอร์คิวมินความเข้มข้น 10 μM สามารถลดการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน โดยการวัด วิลมทูเมอร์วัน เอ็มอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี RT-PCR

จากการศึกษาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่าการศึกษาในส่วนของกลไกในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันยังไม่ชัดเจนนัก ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หลายการทดลองและการศึกษาทราบแต่เพียงว่า โปรตีนวิลมทูเมอร์วัน เป็น transcription factor ที่เป็นอองโคยีน นอกจากนี้จากการทดลองยังพบอีกว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน ทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากความสัมพันธ์ในการยับยั้งโดยเคอร์คิวมินอยด์กับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ พบว่าเคอร์คิวมินอยด์นั้น สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส (protein kinase) ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ protein kinase C (PKC), protein kinase A (PKA) หรือ protein p38 MAPK ดังนั้นจึงสามารถเป็นไปได้ว่า protein kinase ชนิดใดชนิดหนึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ ยังสามารถตอบคำถามได้เป็นอย่างดีว่า เคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ได้อย่างไร และเกี่ยวข้องกับ โปรตีนไคเนสชนิดใด การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาที่มุ่งเน้นถึงผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของยีนวิลมทูเมอร์วัน ในระดับ intracellular signal transduction

pathway เพื่อตอบคำถามถึงกลไกของการยับยั้ง และเป็นข้อมูลในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง โดยใช้สารสกัดเคอร์คิวมินที่ผลิตในลักษณะของยาเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันต่อไปในอนาคต ซึ่งจะมีประโยชน์มากในการที่จะผลักดันให้เคอร์คิวมินอยด์สามารถนำมาจดสิทธิบัตรเพื่อใช้เป็นยาต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต

บททวนเอกสาร

มะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือลิวคีเมีย (Leukemia) (48, 49) คือโรคมะเร็งเม็ดเลือด มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน ที่ไม่สามารถเจริญไปเป็นตัวแก่ได้ ในไขกระดูกจะพบ neoplastic หรือ leukemic cells จำนวนมากเข้าไปเบียดบังเซลล์ปกติ (normal cells) ทำให้มีการสร้างเซลล์ปกติออกมาใช้งานได้น้อยกว่าปกติ จึงไม่เพียงพอต่อการดำรงสภาวะสมดุล ของเลือด (hemostasis) ได้ พบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นกลุ่มใหญ่ของโรคที่มีความรุนแรงของอาการ และเซลล์ต้นกำเนิดที่เป็นมะเร็งและการตอบสนองต่อการรักษาจะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

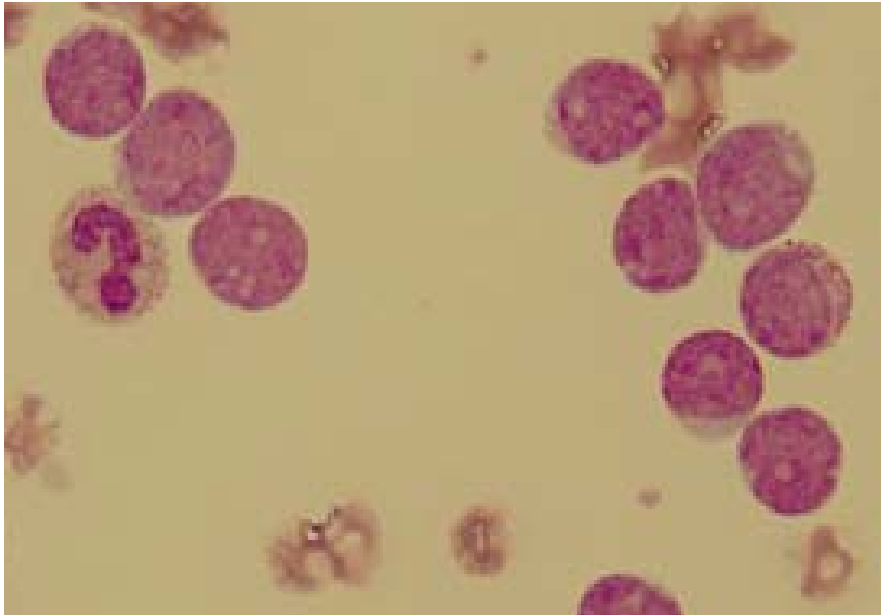
สามารถแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (50) คือ

Acute leukemias หรือกลุ่มที่มีอาการรวดเร็ว รุนแรง ในไขกระดูกพบการเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็งอย่างต่อเนื่อง (progressive proliferation) และมีการสะสมของเซลล์ตัวอ่อนที่เป็น immature precursor cells (blasts) และมีเซลล์ปกติน้อยในกระแสเลือด (peripheral blood) พบปริมาณการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มากขึ้น (leukocytosis) แต่บางรายก็ไม่พบ แต่จะมีเซลล์ที่ไม่มีการพัฒนาการไปเป็นเซลล์ตัวแก่ (undifferentiated) จำนวนมาก และอาจพบภาวะโลหิตจาง และซีดได้ (anemia) มีจำนวนเกร็ดเลือด (platelet count) อาจต่ำหรือปกติก็ได้ ไม่ค่อยพบ อวัยวะที่โตผิดปกติ (organomegaly)

Chronic leukemias หรือกลุ่มที่มีการดำเนินโรคช้า ทำให้กว่าจะตรวจพบมักจะใช้เวลานาน ในไขกระดูกจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนและ เซลล์ที่มีการพัฒนาการไปเป็นเซลล์ตัวแก่ แล้ว (differentiated cells) จำนวนมาก ในกระแสเลือด และพบเซลล์ได้ทุกระดับอายุ ตั้งแต่เซลล์ตัวอ่อน (blasts) จนถึงเซลล์ตัวแก่ (mature cells) มีจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC count) สูงถึงสูงมาก อาจไม่พบเซลล์ตัวอ่อนก็ได้ พบภาวะโลหิตจางเล็กน้อย จำนวนเกร็ดเลือดส่วนมากปกติ พบการแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็งได้ ในอวัยวะอื่นได้บ่อย เช่น ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง ทำให้เกิด organomegaly เนื่องจากอวัยวะทำงานมากผิดปกติ

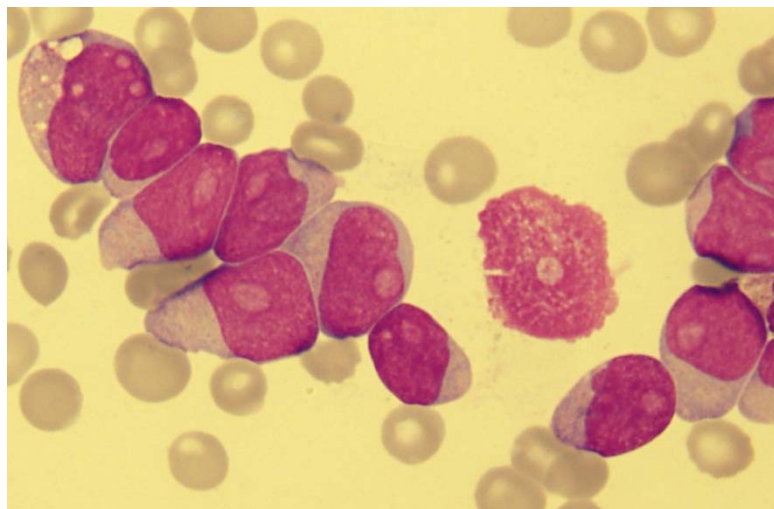
นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว จากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่เป็นมะเร็ง ได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ คือ myelogenous (non-lymphoid) leukemia กับชนิด lymphoid leukemia เมื่อรวมการแบ่งทั้ง 2 แบบเข้าด้วยกันจะได้กลุ่มใหญ่ของ leukaemia ดังนี้

1. Acute myeloblastic leukemias (AML) มี leukemic cells เป็นเซลล์ในสาย myeloid มีการดำเนินโรคเร็ว



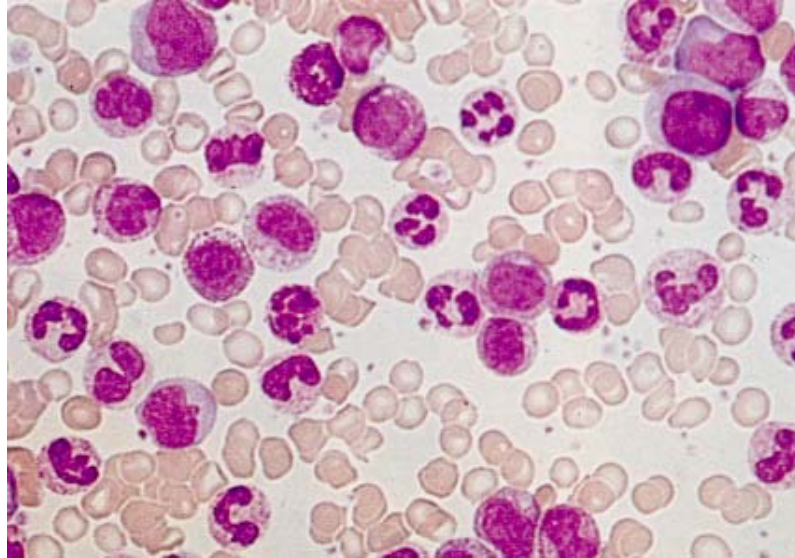
รูปที่ 1. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML

2. Acute lymphoblastic leukemias (ALL) มี leukemic cells เป็นเซลล์ในสาย lymphoid มีการดำเนินโรคที่เร็ว



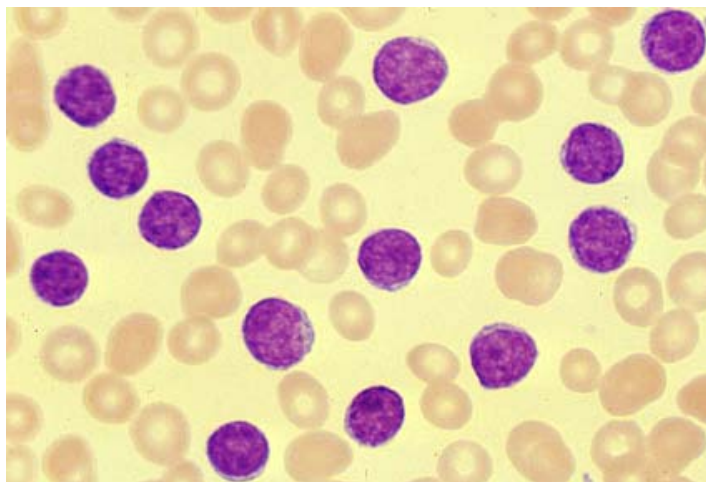
รูปที่ 2. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL

3. Chronic myelocytic leukemia (CML) มี leukemic cells เป็นเซลล์ในสาย myeloid มากการดำเนินโรคช้า



รูปที่ 3. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML

4. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) มี leukemic cells เป็นเซลล์ในสาย lymphoid มากการดำเนินโรคช้า



รูปที่ 4. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL

การระบาดวิทยา

จากการศึกษาระบาดของวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ใหญ่มากกว่าเด็กประมาณ 10 เท่า และพบในชายมากกว่าในหญิงประมาณ 2 เท่า พบได้ในทุกกลุ่มอายุ แต่ ALL พบมากในเด็ก ส่วน AML พบมากในผู้ใหญ่ CML และ CLL พบมากในผู้ใหญ่วัยกลางคนถึงวัยสูงอายุ มักไม่พบในเด็ก โดย CLL จะพบน้อยมากในคนไทย พบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 8-10 รายต่อปี ในประชากร 100,000 คน และเป็น acute และ chronic เท่าๆกัน

สาเหตุการเกิดโรค

สาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจแบ่งออกได้เป็น 2 สาเหตุดังนี้

ปัจจัยภายนอก (Environmental factor) ได้แก่

1. การได้รับสารรังสี โดยเฉพาะ ionizing radiation จะทำให้มีโอกาการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้มากกว่าคนปกติโดยทั่วไป
2. การได้รับสารเคมีบางชนิด เช่น benzene, organic solvent ชนิดต่างๆ หรือยา เช่น chloramphenicol, phenylbutazone, cytotoxic drugs จำพวก alkylating agents เป็นต้น
3. การติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น human lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) อาจก่อโรค T-cell leukemia/lymphoma ตามมา, HTLV-II อาจก่อโรค Hairy-cell leukemia ตามมา และ Epstein-Barr virus อาจก่อโรค Burkitt's lymphoma ตามมา

ปัจจัยภายใน (host factor) ได้แก่

1. เชื้อชาติ (race) ในชนเชื้อชาติต่างกัน มักจะมีโอกาการเป็นมะเร็งต่างชนิดกัน และอัตราที่ต่างกันด้วย พบว่าชนผิวขาว (caucasian) มีอัตราการเป็น มะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงกว่าชนผิวสี
2. พันธุกรรม (genetic) พบว่าญาติพี่น้องที่ใกล้ชิดในสายเลือดเดียวกัน มักมีโอกาการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้โรคนี้นี้ได้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม
3. การมีโครโมโซมผิดปกติ เช่น การสลับที่ (translocation), การขาดหายไป (deletion), การกลับหัวท้าย (inversion), การเพิ่มจำนวน (extra chromosome) ฯลฯ เหล่านี้ทำให้มีโอกาการเป็นมะเร็งได้มากกว่าคนปกติทั่วไป
4. การมีภูมิคุ้มกันเสื่อมหรือบกพร่อง (immunodeficiency) ก็มีโอกาการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้มากกว่าคนปกติทั่วไป เนื่องจากกลไกการกำจัด leukemic cells บกพร่อง
5. การมีไขกระดูกเสื่อมเรื้อรัง (chronic marrow dysfunction) เช่น myelodysplastic syndrome (MDS), myeloproliferative disorder (MPD), aplastic anemia (AA), paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) ฯลฯ อาจนำไปสู่การเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้ในอนาคต

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตาม FAB classification (50)

เนื่องจาก acute leukemia นั้น แบ่งเป็นชนิดย่อยๆ หลากหลายชนิดตามชนิดของ leukemic cells ที่ predominate จึงทำให้มีความยุ่งยากในการแบ่งชนิด ในปี 1976 FAB classification ที่กลุ่มแพทย์ชาว ฝรั่งเศส อเมริกัน และอังกฤษ นำเสนอ เป็นการจำแนกชนิดและเรียกชื่อของ acute leukemia โดยอาศัย พื้นฐานจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (cell morphology) ของ leukemic cells ในเสมียร์เลือดและไขกระดูก ที่ย้อมด้วยสี Romanosky ประกอบกับการย้อม cytochemistry และ immunophenotyping แต่ต้องเป็นผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา เนื่องจากการรักษาจะทำให้ลักษณะทาง morphology เปลี่ยนแปลงไป

1. Acute myeloblastic leukemias (AML)

- M0 Acute myeloblastic leukemia without differentiation
- M1 Acute myeloblastic leukemia with minimal differentiation
- M2 Acute myeloblastic leukemia with maturation
- M3 Promyelocytic leukemia, hypergranular
- M3v Promyelocytic leukemia, hypogranular (microgranular) variant
- M4 Acute myelocytic leukemia
- M4 eo Acute myelocytic leukemia
- M5a Acute monoblastic leukemia without differentiation
- M5b Acute monoblastic leukemia with differentiation
- M6 Acute erythroleukemia
- M7 Megakaryocytic leukemia

2. Acute lymphoblastic leukemias (ALL)

- L1 Lymphoblastic leukemia with homogeneity
- L2 Lymphoblastic leukemia with heterogeneity
- L3 Burkitt's type lymphoblastic leukemia

Cytochemistry stains

Cytochemistry stains คือ การย้อมสีหรือทำให้เกิดสีบริเวณที่มีสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งที่เราสนใจจะตรวจหาสะสมอยู่ในเซลล์ เรียกว่า specific stain แล้วจึงย้อมสิ่งแวดล้อมรอบๆ ที่ไม่มีสารเคมีชนิดนั้นอยู่ด้วยสีที่ตรงกันข้าม เรียกว่า counter stain ซึ่งจะทำให้การตรวจสอบสารเคมีชนิดนั้นๆง่ายขึ้น เนื่องจากเกิดการเปรียบเทียบทำให้เห็นชัดเจนขึ้น เนื่องจาก leukemic cells แต่ละ stage แต่ละ lineages มีสารเคมีหรือเอนไซม์ภายในเซลล์ที่ต่างกัน ตัวอย่างของ cytochemistry stain มีดังต่อไปนี้

Myeloperoxidase (MPO)

เป็นเอนไซม์ที่พบใน primary granule ของ myeloid cells ตั้งแต่ myeloblasts หรือ promyelocyte จนถึง PMN โดยมี activity สูงขึ้นเป็นลำดับ เมื่อมี maturity มากขึ้น ใน monocytic cells อาจติดสีจางๆ ใน lymphocytic cells จะไม่ติดสีเลย จึงใช้แยก AML ออกจาก ALL ได้

หลักการ คือ MPO ทำปฏิกิริยา oxidation กับ hydrogen peroxide ที่มี di-amino benzedine (DAB) ใน solution ได้ตะกอนสีน้ำตาลแดง ที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อ counter stain ด้วย methyl green จะทำให้มองเห็นชัดเจนขึ้น ข้อควรระวัง คือ MPO สลายตัวง่าย ควรใช้ตัวอย่างที่สดใหม่

Sudan black B (SBB)

เป็นสีที่ใช้ย้อม phospholipid ที่มีอยู่บน primary (azulophilic) และ secondary (specific) granules ของ granulocytic cells ส่วนใน monocytic cells อาจติดสีที่ lysosomal granules ได้เล็กน้อย SBB ย้อมติดสีดำใน late myeloblasts และ early promyelocytes เห็นได้ชัดเจนเมื่อ counter stain ด้วย neutral red ใช้ยืนยัน AML ที่ติดสี แยกออกจาก ALL ที่ไม่ติดสี

หลักการ เป็นการย้อมสีโดยตรงต่อ phospholipid ที่เป็น passive biochemical และคงตัวอยู่ได้นาน

Oil red O (ORO)

เป็นสีที่ใช้ย้อม neutral fat ที่มีบน lymphoid cells โดย lymphoblasts จะติดสีแดงเข้มใน cytoplasm เห็นได้ชัดเมื่อ counter stain ด้วย methyl green ถ้าย้อมนานเกินไปอาจทำให้ myeloblasts ติดสีได้เล็กน้อย ใช้ยืนยัน ALL ที่ติดสี แยกออกจาก AML ที่ไม่ติดสี

หลักการ เป็นการย้อมสีโดยตรงต่อ neutral fat ที่เป็น passive biochemical ที่คงตัวอยู่ได้นาน

Specific esterase (SE) หรือ chloroacetate esterase

เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม lysosomal enzyme ที่พบใน azuophilic granules ของ myeloblasts ที่ค่อนข้างจะแก่แล้ว ขึ้นไป และอาจพบได้ใน erythroblasts ของโรค erythroleukemia หรือ erythremic-myelosis หรือ Di Guglielmo's syndrome (M6) พบว่า SE คือ isoenzyme ที่ 1, 2, 7, 8 และ 9 ของ esterases ซึ่งใน myeloblasts จะพบเพียง isoenzymes ที่ 2, 7 และ 9 เท่านั้น ใช้แยก myeloblasts ที่ติดสี ออกจาก monoblasts ที่ไม่ติดสี ใน M4 และ M5

หลักการ คือ ES ทำปฏิกิริยากับ naphthol AS-D chloroacetate (NASDCA) ที่ pH 7.4-7.6 ได้ halogenated naphthol ester แล้วทำปฏิกิริยากับ diazonium salt ได้ตะกอนสีแดงสด ถ้าใช้ pararosaniline เป็น chromogen เห็นชัดเจนเมื่อ counter stain ด้วย methyl green ถ้าใช้ fast blue BB แทน จะได้ตะกอนสีน้ำเงิน เห็นชัดเจนเมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin ข้อควรระวัง คือ SE ถูก inhibit ด้วยโปรท กรด ความร้อน และ ไอโอดีน

Non-specific esterase (NSE)

ได้แก่ esterase isoenzyme ที่ 3, 4, 5 และ 6 ที่ทำปฏิกิริยาได้กับ substrate หลายชนิด ที่อยู่ใน azulophilic granules ของ myeloblast ที่ค่อนข้างจะแก่แล้ว ขึ้นไป ใช้แยก monoblast ออกจาก myelblast ใน M4 และ M5

หลักการ คือ NSE ทำปฏิกิริยากับ alpha-naphthyl acetate ได้เป็น alpha-naphthyl กับ acetate แล้ว alpha-naphthyl ทำปฏิกิริยากับ diazonium salt ได้ azo dye สีแดงสด

Periodic acid shiff (PAS)

เป็นการย้อมสีโดยตรงกับ glycogen, mucoprotein, glycoprotein, glycolipid และ polysaccharide

หลักการ periodic acid จะ oxidized ให้ glycol เปลี่ยนเป็น aldehyde แล้วไปจับกับ shiff reagent ได้สี magenta (ชมพูอมม่วง) การติดสีมี 3 แบบ คือ diffuse (ติดสีเรียบทั่ว cytoplasm) , granular (ติดสีเป็นจุดเล็กๆ ทั่ว cytoplasm) และ block (ติดสีเป็นเม็ดใหญ่ทั่ว cytoplasm) พบว่า lymphocytes, granulocyte, monocytes และ megakaryocytes ให้ผลบวกเป็นส่วนใหญ่ PAS จึงไม่ค่อยมีประโยชน์ใน acute leukemia นอกจากนี้ sideroblastic anemia, iron deficiency anemia, thalassemia, severe haemolytic anemia และบางรายของ myelodysplastic syndrome ยังให้ผลบวกได้ด้วย

Pussian blue stain (PB)

เป็นสีที่ย้อม hemosiderin หรือ iron granule ที่มีอยู่ใน erythrocytic cells ตั้งแต่ระยะ monoblast ขึ้นไปจนถึง orthochromatic normoblast ใช้ยืนยัน erythroblast ใน erythroleukemia (M6) และยังสามารถใช้ย้อมตะกอนเซลล์ในปัสสาวะ เพื่อตรวจ hemosiderinuria ได้ด้วย

หลักการ คือ hemosiderin ทำปฏิกิริยากับ ferrocyanide ได้ ferric-ferrocyanide สีน้ำเงินเห็นชัดเจน เมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin พบว่า hemosiderin เป็น passive biochemical ที่คงตัวอยู่ได้นาน

Acid phosphatase (ACP)

เป็นเอนไซม์ที่พบใน lysosome ของ hematopoietic cells ทุกชนิดจะมี AP ต่างจาก isoenzyme dye กัน ตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 3b, 4 และ 5 ตามระยะทางวิ่งในสนามไฟฟ้าจากการทำ electrophoresis

หลักการ คือ AP ทำปฏิกิริยา hydrolysis กับ naphthol AS-BI phosphate ได้ naphthol AS-BI แล้วไปรวมกับ fast garnet GCB salt (chromogen) ได้ตะกอนสีแดง เห็นได้ชัดเมื่อ counter stain ด้วย methyl green พบว่า lymphocyte และ lymphoblast จะติดสีแดง เป็นก้อนเล็กๆ ก้อนเดียวหรือหลายก้อน ประโยชน์ของ AP คือ ใน hairy cell leukemia จะไม่ถูก inhibit ด้วย tartaric acid เรียกว่า tartrate resistant ในขณะที่ lymphoblast ใน leukemia ชนิดอื่นจะถูก inhibit ได้ เรียกว่า tartrate sensitive

Leukocyte alkaline phosphatase (LAP)

เป็นเอนไซม์ที่พบใน granule ของ PMN อาจพบได้ตั้งแต่ระยะ promyelocyte ขึ้นมาจนถึง PMN แต่จะไม่พบในเซลล์ของ series อื่นๆ

หลักการ คือ LAP สามารถตัด naphthol ออกจาก naphthol-phosphate ที่ใช้เป็น substrate แล้วนำไปรวมกับ diazonium salt ได้ azo dye สีนํ้าเงินดำ ที่ไม่ละลายน้ำ และมองเห็นชัดเมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin การอ่านผลให้ดู PMN จำนวน 100 ตัว ดูว่าแต่ละตัวติดสีมากน้อยเพียงใด ให้คะแนนจาก 0 (ไม่ติดสี) และ 1+, 2+ , 3+ ถึง 4+ ตามความเข้มของสีนํ้าเงิน แล้วรวมคะแนนทั้งหมด LAP score ที่ต่ำกว่า 20 ใช้ยืนยัน CML แยกออกจาก leukemoid reaction (infection) ที่จะมี LAP score สูงกว่านั้นมาก คือ มากกว่า 150 โดยในคนปกติจะมี LAP score ประมาณ 50-150 คะแนน

Immunophenotyping

คือการตรวจหา surface และ intracellular marker ที่จำเพาะของ cells หรือ leukemic cells ด้วยวิธีทาง immunology โดยการใช้ monoclonal antibody ที่ติดฉลากสารเรืองแสงหรือ fluorescent dyes ในการตรวจติดตาม เรียกว่า immunofluorescence แล้วจึงใช้วิธีทาง fluorescence microscopy หรือ flow cytometry ในการตรวจแยกชนิดของเซลล์ ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรค hematologic malignancy โดยเฉพาะ leukemia ได้เป็นอย่างดี

หลักการของ immunophenotyping คือ เซลล์ในแต่ละ lineage และ แต่ละ stage of differentiation หรือ maturation จะมี specific marker ทั้งชนิด surface และ intracellular marker ที่แตกต่างกันไป ทำให้สามารถใช้การมีหรือไม่มี การมีมากมีน้อยของ marker เหล่านี้ในการบ่งบอก lineage หรือ stage of maturation ได้ ซึ่งนำไปสู่การยืนยันชนิดของ leukemia ได้ ดังนั้นการย้อมสีเรืองแสงของ surface และ intracellular marker ด้วย monoclonal antibody จะช่วยวินิจฉัยและแยกชนิดของ leukemia ได้ โดยจะทำหลังจากการใช้เทคนิควิธีการปกติทางโลหิตวิทยาทั่วไป เช่น การย้อม Romanosky stain เพื่อตรวจดู morphology ของ leukemic cell และการใช้เทคนิควิธีการพิเศษทางโลหิตวิทยา เช่น cytochemistry stain เพื่อตรวจดูสารเคมีภายในเซลล์ก่อน โดยทั่วไปจะไม่ตรวจ immunophenotyping ก่อนการตรวจทาง morphology ดังนั้น immunophenotyping จึงเป็นการตรวจยืนยันผล ที่ได้จากการตรวจทาง morphology มาแล้ว

การรักษา

1. การใช้ยาเคมีบำบัด คือการรักษาด้วยยากำจัดมะเร็ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่
 - Anti-metabolite ส่วนใหญ่เป็น purine หรือ pyrimidine antagonists ที่ inhibit DNA synthesis จึงสามารถลดระดับการแบ่งตัวของ leukemic cells ได้

- Alkylating เป็นยาที่มี alkyl group ที่สามารถฆ่าเซลล์ได้ทั้ง resting และ proliferation stage ของทั้ง leukemic cells และ normal cells

- Nucleotide analogue เป็นยาที่เกาะกับ DNA หรือ RNA ได้ และมีการรบกวนการสังเคราะห์ ทำให้ยับยั้งการแบ่งตัวได้

และในปัจจุบันนิยมการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันที่เรียกว่า multi-drug combination

2. การฉายแสงรังสี เป็นการใช้แสงรังสีเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะในไขกระดูก นิยมใช้ร่วมกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด

3. การปลูกถ่ายไขกระดูก สามารถทำได้ทั้งแบบ autologous transplantation คือ การนำ stem cell ของผู้ป่วยเองในขณะที่มี complete remission ออกมาทำการกำจัด leukemic cell ให้เหลือน้อยที่สุด (minimal residual disease; MRD) แล้วจึงนำกลับเข้าไปเติมให้ผู้ป่วย ที่ผ่านการได้รับเคมีบำบัดและรังสีบำบัดอย่างรุนแรงมาแล้ว เพื่อกำจัด leukemic cell ให้ได้มากที่สุด หรืออาจทำแบบ allogeneic transplantation คือการนำ stem cells ของผู้บริจาคที่มี histocompatibility หรือ human leukocyte antigen (HLA) เหมือนกันกับผู้ป่วยมากที่สุด เพื่อที่จะได้มี graft rejection หรือ graft versus host น้อยที่สุด แหล่งที่จะเก็บ stem cell ได้แก่ bone marrow, peripheral blood หรือ cord blood ก็ได้

4. Supportive treatment คือการรักษาตามอาการแบบประคับประคองอาการ ให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยเฉพาะในระยะท้ายๆ ที่พยากรณ์โรคไม่ค่อยดีแล้ว

ขมิ้นชัน (turmeric) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma longa* Linn มีชื่อพ้อง *Curcuma domestica* Valetton ชื่อสามัญคือ turmeric จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อท้องถิ่นที่แตกต่างกันออกไปคือ ขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นป่า ขมิ้นแกลง ขมิ้นดี ขมิ้นทอง ขมิ้นหยวก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขี้ขมิ้น หมิ้น (ภาคใต้) ตายอ (กะเหรี่ยง-กำแพงเพชร) สะยอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ขมิ้นชันเป็นพืชสวนครัวที่ปลูกกันทั่วไป มีลักษณะเป็นเหง้ารูปไข่ มีแงะแขนงรูปทรงกระบอกแตกออกทั้งสองข้างตรงข้ามกัน มักปลูกกันมากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่อินเดีย ไทย บังคลาเทศ ศรีลังกา อินโดนีเซีย ใต้หวัน เกาะจาไมกา และบางส่วนของประเทศจีน โดยประเทศอินเดียเป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดของโลก ส่วนที่ใช้เป็นยาได้แก่ เหง้าสดและแห้ง โดยช่วงอายุที่นิยมเก็บนำมาทำยาได้แก่ช่วงอายุ 9 ถึง 10 เดือน สำหรับประเทศไทย ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ในการประกอบอาหารและยารักษาโรคต่างๆ มาเป็นระยะเวลานานแล้ว เช่น โรคเกี่ยวกับระบบการย่อยอาหาร ธาตุพิการ ท้องร่วง ขับลมในกระเพาะอาหาร โรคผิวหนัง ยาฟอกโลหิตสำหรับสตรี โรคเอดส์ (51, 52) โรคมะเร็งชนิดต่างๆ (21) เนื่องจากมีสารอาหารและสารเคมีที่สำคัญคือ มีน้ำมันระเหย และเหง้ามีสารเคอร์คิวมิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial agent) ยับยั้งเชื้อรา (antifungal agent) ยับยั้งสารก่อกลายพันธุ์ (antimutagen) ยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน (antioxidation) ซึ่งกลไกในการต้านมะเร็ง

และด้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการศึกษาว่าสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยา oxidation และด้านการอักเสบจะสามารถยับยั้งกระบวนการ เกิดมะเร็ง และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้

สารออกฤทธิ์ (active ingredients) ที่สำคัญในขมิ้นชันได้แก่ เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิดได้แก่เคอร์คิวมิน (curcumin), ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (demethoxycurcumin) และ บิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (bisdemethoxycurcumin) ซึ่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน (รูปที่ 5) สารทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ตั้งแต่ 420-425 นาโนเมตร (nm) สารสำคัญทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติพอสรุปได้ดังนี้

1. Bis-(feruloyl)methane หรือ 1,7-bis(4hydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ เคอร์คิวมิน มีประมาณ 49% ของรงควัตถุทั้งหมด มีน้ำหนักโมเลกุล 368.39 สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_6$ เป็นผงสีเหลืองส้ม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้บ้างเล็กน้อยในอีเทอร์ และละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ อะซิโตน โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) กรดน้ำส้มเข้มข้น และเบนซีน มีสีน้ำตาลแดงในสารละลายต่าง สีเหลืองในสารละลายกรด ซึ่งช่วงที่เกิดการเปลี่ยนสีจะอยู่ที่ pH ประมาณ 8-9 และมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183°C ดังแสดงในรูปที่ 5

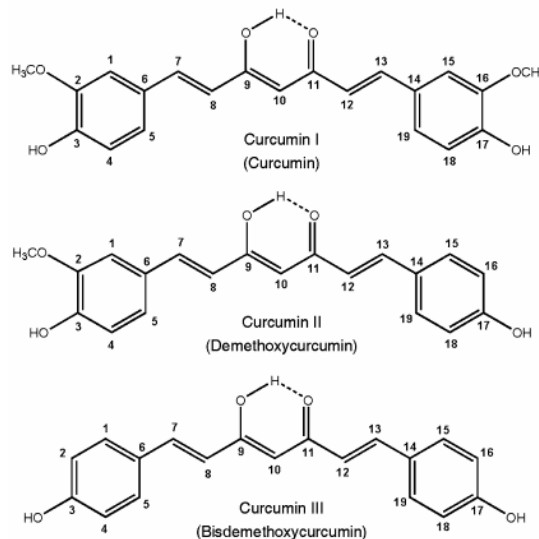
2. Feruloyl-(p-hydroxycinnamoyl)methane หรือดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน เป็นผงสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่ประมาณ 168°C พบประมาณ 28.7% ของรงควัตถุทั้งหมด และมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{18}O_5$ ดังแสดงในรูปที่ 2

3. Bis (p-hydroxycinnamoyl)methane หรือบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน เป็นสารสีเหลืองส้ม มีจุดหลอมเหลวที่ 224°C พบได้ประมาณ 22.3% ของรงควัตถุทั้งหมด และมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{19}H_{16}O_4$ ดังแสดงในรูปที่ 2

จากคุณสมบัติของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชัน โดยเฉพาะสารเคอร์คิวมินนั้น มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง และสารด้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (18, 19, 21) ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นยังพบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันทั้งเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน ทั้งใน leukemic cell line และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ยีนวิลมทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1 gene* หรือ *WT1*) เป็นยีนที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1899 โดย Max Wilms ซึ่งในช่วงแรกได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งของไตในเด็กที่เรียกว่า Wilms' tumor หรือ nephroblastoma ต่อมา Call และคณะ (6) รวมทั้ง Gessler และคณะ (53) ได้ทำการศึกษาและพบว่ายีนวิลมทูเมอร์วันนั้นมีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 และมีความยาวประมาณ 50 kb ซึ่งยีนนี้ประกอบไปด้วยส่วน exon ทั้งหมด 10 exons เมื่อเกิดกระบวนการ transcription จะได้ mRNA ที่มีขนาดประมาณ 3 kb และเมื่อเกิดกระบวนการ translation จะได้โปรตีนที่เรียกว่าวิลมทูเมอร์วัน (Wilms'

tumor 1;WT1) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 48 ถึง 55 kDa ขึ้นอยู่กับกระบวนการ RNA alternative splicing (24, 25, 54, 55), RNA editing (56) และ translation initiation (57) ที่เกิดขึ้น ซึ่งจากกระบวนการเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการมีหรือไม่มีส่วนของ exon ที่ 5 ซึ่งเป็นส่วนที่ถอดรหัส ให้ได้กรดอะมิโน 17 ตัว (± 17 amino acids) และกรดอะมิโน 3 ตัวได้แก่ lysine, threonine และ serine ($\pm$ KTS) ตรงบริเวณ exon ที่ 9 ระหว่าง zinc fingers ที่ 3 และ 4 (รูปที่ 6 และ 7) จากกระบวนการข้างต้นส่งผลให้ได้โปรตีนทั้งหมด 4 ชนิด (isoforms) ได้แก่ โปรตีน วิลมทูเมอร์วัน ที่มีกรดอะมิโนครบทั้งหมดเป็น WT1(+/+) isoform หรือ wild type, วิลมทูเมอร์วัน ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 3 ตัว (KTS) เป็น WT1 (+/-) isoform, วิลมทูเมอร์วัน ที่ไม่มีกรดอะมิโน 17 ตัวเป็น WT1 (-/+) isoform และ วิลมทูเมอร์วัน ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้ง 17 ตัวและ KTS เป็น WT1 (-/-) isoform โดยจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ด้วยวิธี Western blot จะพบแถบของโปรตีน 2 แถบด้วยกัน แถบด้านบนจะเป็นแถบของ WT1 (+/+) และ WT1 (+/-) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 ถึง 55 kDa ส่วนแถบล่างเป็นแถบของ WT1 (-/+) และ WT1 (-/-) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 ถึง 49 kDa

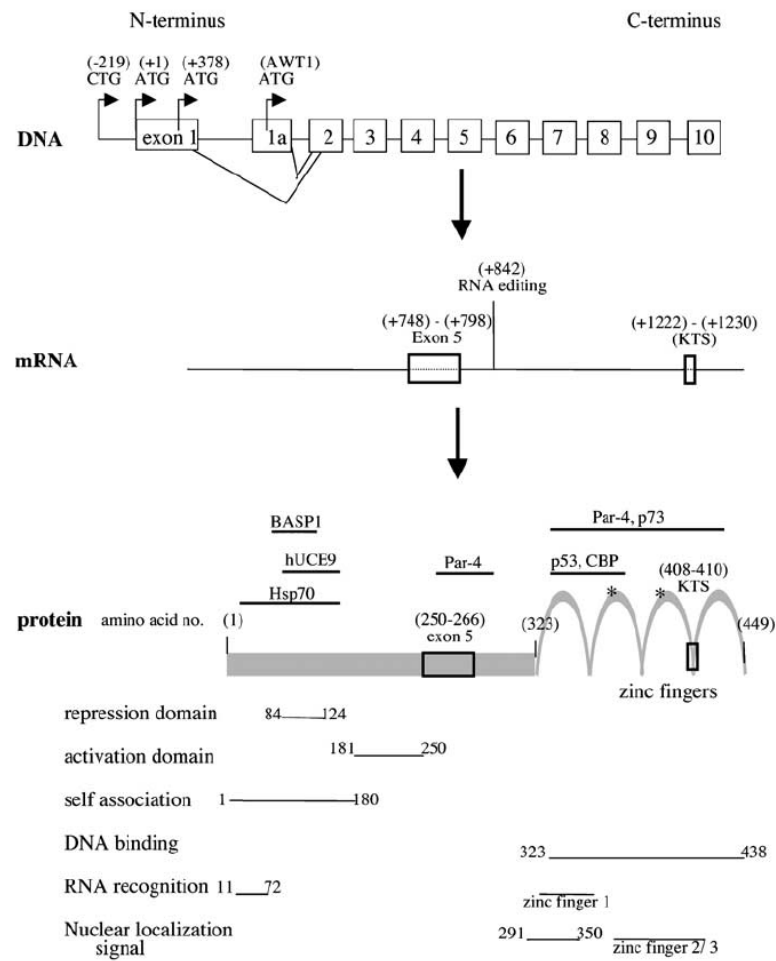


รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin

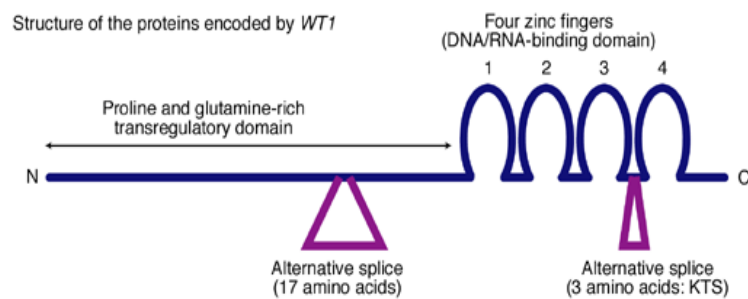
จากการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน ในผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า ยีนนี้ทำหน้าที่เป็นทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ยีน (tumor suppressor gene) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในผู้ป่วย มะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นพบว่าการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน (wild type) ที่สูงมากในเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกลุ่มของ myeloid และ lymphoid cells (10,31, 35, 58, 59) และจากการศึกษา ยังพบอีกว่าระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน นั้นแปรผกผันกับการทำนายอาการ (prognosis) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (60, 61) รวมทั้งพบการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันเพิ่มขึ้นใน

ผู้ป่วยที่กลับมาเป็นโรคอีกครั้ง (relapse) (62) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Yamagami และคณะ (35) ยังพบว่าการใช้ WT1 anti-sense สามารถที่จะลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Menssen และคณะ (12) ได้กล่าวถึงถึงเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มต่างๆ พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloblastic leukemia (AML), pre B-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ T-cell acute lymphoblastic leukemia คือ 93%, 86%, 80% และ 74% ตามลำดับ ซึ่งจากความรู้ทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีนวิล์มทูเมอร์วัน ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นทำหน้าที่เป็นอองโคยีน (oncogene) มากกว่าทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ยีน โดยการศึกษาการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน นั้นทำได้หลายวิธีด้วยกันเช่น การใช้ Western blot analysis (34, 59), Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (10, 63-66) เป็นต้น โดยการศึกษาทั้งหมด พบว่าการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ในขณะที่ยีนการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน พบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน นั้นทำหน้าที่เป็น transcription factor ให้กับยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเช่น Egr-1, PDGF-A, Bcl-2 และ c-Myc เป็นต้น (67) ซึ่งส่งผลให้กลไกในการควบคุมการเกิดเซลล์มะเร็งเสียไป ดังนั้นจากผลการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วทำให้สามารถใช้การแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เป็นดัชนีบ่งชี้ (marker) สำหรับตรวจหาความรุนแรง (severity) และพยากรณ์โรค (prognosis) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวรวมไปถึงสภาวะที่เกี่ยวข้องเช่น minimal residual disease (MRD) ได้ (35, 68-70)

Ye และคณะ (71) พบว่าการเกิด phosphorylation ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่ PKC และ PKA บริเวณ C-terminal domain ของยีนวิล์มทูเมอร์วัน มีผลยับยั้งการทำงานของ protein-DNA binding ในการทำหน้าที่เป็น tumor suppressor Bentov และคณะ (72) พบว่า insulin-like growth factor I หรือ IGF-I สามารถลดการแสดงออกของยีน *WT1* ในกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยการศึกษาสัญญาณผ่านทางด้าน MAPK pathway Ito และคณะ (73) ได้ทำการศึกษาหน้าที่ของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด 17AA (+) WT1 ในการยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งชนิด K562 พบว่าในการทำงานของยีน ต้องอาศัยส่วนของ DNA-binding zinc-finger ในการทำหน้าที่ดังกล่าวด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ายีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด 17AA (+)KTS(-) สามารถยับยั้งการทำงานของ proapoptotic Bax ในส่วน upstream mitochondria ของกระบวนการ intrinsic pathway



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของยีนวิลัมทูเมอร์วัน ในระดับ ดีเอ็นเอ, เอ็มอาร์เอ็นเอ และ โปรตีน



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของการสร้างโปรตีนวิลัมทูเมอร์วัน

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มทั้ง 4 ชนิด ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยอาศัยเวกเตอร์ 17AA (+) WT1 และ 17AA (-) WT1
2. เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์ในการกระตุ้นการทำงานของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และ U937

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ซึ่งงานวิจัยใช้เซลล์มะเร็งชนิด K562 และ U937 จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 (GIBCO-BRL) ที่มี pyruvate 110 mg/ mL, 10% fetal calf serum และ HEPES 10 mM ที่ pH 7.2 – 7.4 ทำการเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และมีอุณหภูมิ 37°C

2. การศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม

เนื่องจากโดยปกติแล้วในเซลล์ U937 มีการแสดงออกของทั้ง WT1 mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันอยู่แล้วระดับหนึ่ง แต่ระดับวิล์มทูเมอร์วันโปรตีนมีระดับที่ต่ำมาก และเมื่อทำการ transfected WT1 isoforms แต่ละอันเข้าไป จะพบว่าระดับการแสดงออกของทั้ง WT1 mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน จะมีปริมาณที่สูงมากกว่าปกติหลายเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (cell control) และ mock control และเมื่อทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินคาดว่าระดับการแสดงออกของทั้ง WT1 mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน น่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดจากไอโซฟอร์มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์

3. การโคลนยีน

ทำการ transfect เซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันน้อย ด้วยเวกเตอร์ที่มี WT1 isoforms 4 ชนิดคือ WT1 17AA (+) KTS (+), WT1 17AA (+) KTS (-), WT1 17AA (-) KTS (+), WT1 17AA (-) KTS (-) โดยใช้ Lipofectin_ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ WT1 แต่ละชนิด (WT1 +/+, WT1 +/-, WT1 -/+ หรือ WT1 -/-) เชื่อมต่อกับพลาสมิดชนิด pcDNA 3.1(+) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan) จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมแต่ละชนิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α) ด้วยวิธี heat shock หลังจากนั้นตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB agar ที่ผสมแอมพิซิลิน 100 μ g/ml มาเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ พลาสมิดที่ไม่ได้เชื่อมต่อดีเอ็นเอ หลังจากที่ได้โคโลนีที่มีได้รับพลาสมิดสายผสมนำโคโลนีนั้นมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB agar ที่ผสมแอมพิซิลิน 50 μ g/ml แล้วนำ โคโลนีซึ่งมี พลาสมิดที่ได้รับสายผสมมาเพิ่มปริมาณใน LB broth ที่ผสมแอมพิซิลิน 100 μ g/ml และสกัดพลาสมิดจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Plasmid midiprep: Alkaline lysis

4. การตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วย restriction enzyme

นำพลาสมิดมาผสมกับ Buffer R และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Hind*III, บริษัท Fermentas, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas, USA)

5. การนำยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น mammalian cell

นำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้มาผสมกับ K buffer, 0.1% BSA และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Pvu*II, บริษัท Takara Bio Inc. ญี่ปุ่น) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder marker หลังจากนั้นนำยีนพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์แล้วจำนวน 5 ng ผสมกับอาหารชนิด incomplete medium 1640 จำนวน 150 μ l และ superfect transfection reagent (บริษัท Qiagen, USA) เติมนลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ U937 จำนวน 5×10^4 cells/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์และปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง แล้วปรับเซลล์ให้ได้ 1×10^4 cells/ml ด้วยอาหาร RPMI1640 ที่มี 10% FBS ยาต้านแบคทีเรีย และยา G418 หลังจากนั้นเลี้ยงในจาน 96 หลุม โดยเติมหลุมละ 100 μ g นาน 14 วัน ซึ่งเซลล์ U937 ที่ไม่ได้รับยีนพลาสมิดเข้าไปจะไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี G418 ได้ แต่โคลนของเซลล์ U937 ที่ได้รับยีน พลาสมิดเข้าไปจะสามารถเจริญได้ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนและตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน แต่ละชนิด และ mock เปรียบเทียบกับเซลล์ U937 ที่ไม่ได้ทำการถ่ายยีนเข้าไป ด้วยวิธี วิธี PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% agarose gel โดยใช้ primer คือ

WT1 primer

WT1 primer forward คือ 5'-GACCTGGAATCAGATGAACTTAG-3'

WT1 primer reverses คือ 5'-TTCTGACAACCTTGGCCACCG-3'

GAPDH primer

GAPDH primer forward คือ 5'-CGAAGTCAACGGATTTGGTTCGTAT-3'

GAPDH primer reverses คือ 5'-AGCCTTCTCGGTGGTGAAGAC-3'

นอกจากนี้ได้ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยในการที่เลือกโคลนมาใช้ต้องมีการแสดงออกของ WT1 มากกว่า 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ U937 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป ส่วน mock ต้องมีการแสดงออกของ WT1 เท่ากับ U937 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป หลังจากที่ได้คัดเลือกโคลนได้แล้วมาทำการศึกษากับสารสกัดคอร์คิวมินบริสุทธิ์

6. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม

นำโคลนที่คัดเลือกได้มาศึกษาการระดับของการเจริญ (growth curve) และความเป็นพิษของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ กับเซลล์ U937 ที่ได้รับทำการถ่ายยีนเข้าไป ด้วยวิธี MTT assay

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลของการ transfect ด้วยการสกัดนำส่วนของ nuclear extract มาตรวจสอบดูผลของการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ด้วยวิธี Western Blot ซึ่งสามารถเตรียมโดย นำ nuclear protein ที่แยกได้มาแยกโดยใช้ SDS-PAGE และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose จะถูก block nonspecific binding site ด้วย 5% nonfat dry milk หลังจากนั้นเติม mouse anti-WT1 ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน แล้วจึงเติม goat anti-rabbit ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal[®] Enhance Chemiluminescence (Pierce) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray (Amersham) ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้เครื่อง scanning densitometry

เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วทำการทดสอบเซลล์ที่ทำการ transfect ด้วยวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม มาทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 μM เป็นระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดย Western blotting เพื่อต้องการศึกษาว่าสารสกัดเคอร์คิวมินให้ผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในไอโซฟอร์มชนิดใดมากที่สุด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน และเปรียบเทียบกับเซลล์ K562 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่สูง (ใช้เพื่อเป็น positive control)

7. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูวัน (WT1 protein stability) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่ถูก transfect ด้วยยีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+

จากการพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันนั้น อาจเกิดจากการที่สารสกัดโปรตีนไปมีผลทำลายโปรตีนวิล์มทูวันหรือทำให้ครึ่งชีวิต (half life) ของโปรตีนวิล์มทูวันสั้นลงดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่าการที่โปรตีนวิล์มทูวันในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด K562 ลดลงเมื่อถูกเลี้ยงร่วมกับสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยมีสมมุติฐาน คือการที่สารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้นั้น สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์อาจไปลดครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายโปรตีนโดยการอาศัยเอ็นไซม์ ubiquitin โดยในการศึกษานี้จะใช้ cycloheximide ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนใหม่ โดยมีขั้นตอนการศึกษา คือนำเซลล์ที่ต้องการศึกษาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 50 μM ของ cycloheximide ที่มีหรือไม่มี 15 μM ของสารสกัดเคอร์คิวมินเป็นเวลานาน 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวมาสกัดโปรตีน และทำการแยกโปรตีน

ที่ได้โดยใช้ SDS-PAGE และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose จะถูก block nonspecific binding site ด้วย 5% nonfat dry milk จากนั้นทำการย้อมโปรตีนด้วย antibody WT1 (C-19) หรือ anti β -actin (AC15) โดยโปรตีนแอคตินถูกใช้เป็น ตัวควบคุมปริมาตร (loading control) หลังจากนั้นเติม goat anti-rabbit หรือ goat anti mouse ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal[®] Enhance Chemiluminescence (Pierce) หลังจากนั้นวัดความเข้มของแถบด้วยเครื่อง หลังจากนั้นทำการยืนยันผลการศึกษาของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อ ความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยการใส่ cycloheximide ด้วยการใส่ MG132 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง proteasome (proteasome inhibitor) โดยลดการทำงานของ ubiquitin โดยมีขั้นตอน คือนำเซลล์ที่ต้องการศึกษา เลี้ยงร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5 μ M ของ MG132 ที่มีและไม่มี 15 μ M ของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์มาสกัดโปรตีน และโปรตีนถูกแยกด้วยโดยใช้ SDS-PAGE และทำการ ตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Western blot

8. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (WT1 protein stability) ในเซลล์ K562

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ได้นั้น ในขณะนี้ยังไม่มีทราบถึงกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินว่าสามารถลดการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ได้อย่างไร ดังนั้นกลไกที่สำคัญที่ต้อง ทำการศึกษา คือผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อความคงตัวของยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA โดยใช้ Actinomycin D ไปยับยั้งกระบวนการ transcription ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ ยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ใหม่ โดยในการศึกษานี้มีสมมุติฐาน คือสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ได้นั้น อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกของการทำลายความคงตัวของยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA โดยมีขั้นตอนการศึกษา คือ เซลล์ K562 ถูกเลี้ยงร่วมกับ actinomycin D นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลี้ยงร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี หรือไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมิน แต่ยังคงมี actinomycin D อยู่ โดยเลี้ยงต่อเนื่อง 0, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเซลล์ดังกล่าวมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy ของบริษัท Qiagen หลังจากนั้นนำ RNA ที่สกัด ได้มาทำการเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit และ หลังจากนั้นเก็บ cDNA ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

โปรแกรมการเปลี่ยน total RNA เป็น cDNA คือ

ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 25°C นาน 10 นาที

ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 37°C นาน 120 นาที

ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 85°C นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 4 อุณหภูมิ 4°C

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *WT1* โดย Real Time PCR ทำโดยใช้ชุด WT1 TaqMan probe ของบริษัท Applied Biosystems (Hs01103754_m1)

ในการวิเคราะห์ relative WT1 expression levels ทำโดยนำ cDNA ที่ได้ทำการเจือจางดังนี้ 1:6.25, 1:25, 1:100, 1:400 และ 1:1600 หลังจากนั้นนำ 9 μ l ของแต่ละการเจือจางเติมใน 11 μ l ของ master mix (1 μ l ของ WT1 probe และ 10 μ l ของ 2x master mix) จากนั้นทำการ activate WT1 Taqman probe Gold polymerase ที่ 95°C เป็นระยะเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นขั้นตอน PCR ทำโดยใช้โปรแกรม 95°C เป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 63°C เป็นระยะเวลา 60 วินาที จำนวน 40 รอบ โดย standard curve ของทั้ง WT1 และ GAPDH ได้มาจากการทำการเจือจางของ mRNA ของเซลล์ K562 leukemic cells การวิเคราะห์ผลของ Real Time PCR ทำโดยใช้โปรแกรมในการคำนวณจาก I cycleTM iQ Bio-Rad การทำ normalization เพื่อปรับปริมาตรของการ load ที่อาจจะไม่เท่ากัน โดยใช้ยีน GAPDH เป็นตัวปรับปริมาตรในตัวอย่างเดียวกัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในเวลาเดียวกัน และ 3 ครั้งในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

9. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนไคเนส (protein kinase) ในเซลล์ K562

เนื่องจากเคยมีรายงานว่าเคอร์คิวมินมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส โดยเฉพาะ PKC, PKA, และ P38 MAPK แต่ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ยังไม่ทราบว่าโปรตีนไคเนสชนิดใดที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์แบ่งตัว (cell proliferation) การทดลองจะทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยการศึกษาด้วยวิธี Protein Microarray ก่อนเพื่อต้องการศึกษาว่าหลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินแล้ว มีโปรตีนไคเนสชนิดใดที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน หลังจากนั้นเมื่อทราบแล้วให้ทำการทดลอง โดยนำเซลล์ K562 มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนไคเนสที่คาดว่าจะเกี่ยวข้อง โดยดูก่อนว่าในเซลล์ K562 มีปริมาณมากน้อยเท่าใด หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาสกัดเอาส่วนของโปรตีนที่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยใช้ชุดสกัด NE-PER[®] (Pierce) หลังจากนั้นนำโปรตีนที่แยกได้มาแยกโดยใช้ SDS-PAGE และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose จะถูก block nonspecific binding site ด้วย 5% nonfat dry milk หลังจากนั้นทำการย้อมด้วย antibody ต่อโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ ใช้วิธีการ reprobe โดยใช้ยา RestoreTM Western Blot Stripping และย้อมด้วย anti-GAPDH เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมปริมาตร (house keeping gene) ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน GAPDH แล้วจึงเติม goat anti-rabbit ที่ติดฉลากด้วย horseradish

peroxidase ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal[®] Enhance Chemiluminescence (Pierce) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray (Amersham) ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้ เครื่อง scanning densitometry เมื่อทำการศึกษาปริมาณโปรตีนไคเนสที่แสดงออกในเซลล์ K562 เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นทำการทดสอบด้วย เคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 5, 10, และ 15 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูผลของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งโปรตีนไคเนส รวมทั้งโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และใช้ protein kinase inhibitor ของโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ เพื่อเป็น positive control และเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง ว่าโปรตีนไคเนส มีผลต่อการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจริง วัน โดยการทดลองนี้ใช้ protein kinase inhibitor ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ ไม่ส่งผลต่อโปรตีนไคเนสตัวอื่นๆ (specific protein kinase inhibitor เช่น 88 μM hydroxytamoxifen หรือ 660 nM chelerythrine chloride หรือ 590 nM hexadecyl phosphocholine ที่จำเพาะต่อ PKC เพียงอย่างเดียว, 11 μM adenosine 3',5'-cyclic-monophosphothioate, RP-Isomer ที่จำเพาะต่อ PKA เพียงอย่างเดียว เป็นต้น ข้อมูลจาก http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_resources/Protein_Kinase_Explorer/PK_Inhibitor_Specificity.html)

10. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ และ protein kinase inhibitor ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และ real time PCR

เมื่อศึกษาผลของโปรตีนไคเนส ต่อการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันแล้ว เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่า โปรตีนไคเนสชนิดนั้นมีผลต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของทั้งเคอร์คิวมิน และ protein kinase inhibitor ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยการทดลองนี้ใช้ protein kinase inhibitor ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไคเนสชนิดนั้นๆ (specific protein kinase inhibitor ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น) มาใช้เพื่อศึกษาว่าเมื่อโปรตีนไคเนสถูกยับยั้งการทำงานแล้ว ส่งผลทำให้การแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันลดลงด้วยหรือไม่ และผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินหรือไม่ การทดลองทำโดยนำเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด K562 มาทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM รวมทั้ง protein kinase inhibitor ในอาหาร RPMI1640 ที่มี 10% fetal calf serum และ HEPES 10 mM ที่ pH 7.3 เป็นระยะเวลา 2 วันใน 25 cm^2 culture flask โดยมีชุดควบคุมเป็นตัวเปรียบเทียบ หลังจากนั้นนำมาสกัด total RNA ตามขั้นตอนต่อไปนี้

การเตรียม total RNA

ทำการสกัดเอา total RNA ด้วยสารสกัด TRIZOL[®] reagent ซึ่งเป็น mono-plastic solution ของ phenol และ guanidine isothiocyanate เป็น single step RNA solution หลังจากนั้นตัวอย่างที่เก็บได้นำมาหาปริมาณของ total RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 โดย total RNA ที่เตรียมได้ควรปราศจาก DNA และโปรตีน อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 ควรจะมีค่าเท่ากับ 1.6-1.8 เมื่อละลายด้วยน้ำกลั่น และคำนวณปริมาณของ total RNA ที่ได้เป็น $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้สูตร $1 \text{ OD} = 40 \mu\text{g/ml}$ หลังจากนั้นให้นำมาทำการศึกษาการแสดงออกโดยใช้ PCR ชนิด RT-PCR

ขั้นตอนการทำ RT-PCR

นำ total RNA ที่ได้มาปริมาณ 10 pg ถึง 1 μg มาทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ SUPERSRIPT[™] One-step RT-PCR (Invitrogen) โดยใช้ primers และ condition สำหรับศึกษาดังนี้

WT1 primers ประกอบด้วย

Sense primer สำหรับ exon7 คือ 5'-GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3'

Antisense primer สำหรับ exon10 คือ 5'-GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3'

β -actin primer ประกอบด้วย

Sense primer คือ 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCAC-3'

Antisense primer คือ 5'-GTCCTTAATGTACGCACGATTTC-3'

โดยโปรแกรมการเปลี่ยน mRNA เป็น cDNA ใช้อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 30 นาที ส่วนโปรแกรมที่ใช้ในการทำ amplification คือ denature ที่ 94°C เป็นระยะเวลา 1 นาที, annealing ที่ 64°C เป็นระยะเวลา 1 นาที และ primer extension ที่ 72°C เป็นระยะเวลา 1.5 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ แล้ว hold ไว้ที่ 4°C หลังจากนั้นนำ DNA ที่ขยายได้จากวิธีการของ PCR มาปริมาณ 10 μl มาทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel และ loading dye (6X) ปริมาณ 2 μl (Bromphenol blue 0.25%, glycerol 30%) และใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 45 นาที และใช้ standard marker คือ 1 Kd ladder marker หลังจากนั้นส่องดูด้วย UV light และวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้เครื่อง scanning densitometry

11. ขั้นตอนการวินิจฉัยผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ต่อระดับการแสดงออกของยีน *WT1* โดยวิธี real time PCR

นำ RNA ที่สกัดได้มาทำการเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้ Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) และเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *WT1* โดย Real Time PCR ทำโดยใช้ชุดของ primers และ probe ดังนี้คือ

WT1 primers และ probe

WT1 forward primer (F1): 5'GATAACCACACAACGCCCATC3'

WT1 reverse primer (R1): 5'CACACGTCGCACATCCTGAAT3'

WT1 probe: 5'FAM-ACACCGTGC GTGTATTCTGTATTGG-TAMRA3'

β -actin primers และ probe

β -actin forward primer: 5'CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT3'

β -actin reverse primer: 5'ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA3'

β -actin probe: 5'FAM-TGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCG-TAMRA3'

ในการวิเคราะห์ relative *WT1* expression levels ทำโดยนำ cDNA ที่ได้ (3.0 μ l สำหรับ *WT1* และ 2 μ l สำหรับ β -actin) ทำการเติม PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl; 3 mM $MgCl_2$) ที่มี 200 μ M dNTP, 1.25 U AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.5 μ M forward และ reverse primers รวมทั้ง 200 nM TagMan probes ดังที่แสดงมาแล้วข้างต้น หลังจากนั้นทำการ activate AmpliTaq Gold polymerase ที่ 95°C เป็นระยะเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นขั้นตอน PCR ทำโดยใช้โปรแกรม 95°C เป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 63°C เป็นระยะเวลา 60 วินาที จำนวน 50 รอบ โดย standard curve ของทั้ง *WT1* และ β -actin ได้มาจากการทำ serial dilution ของ mRNA ของเซลล์เป้าหมาย ด้วยเครื่อง Chromo4 Real-Time PCR และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Optical monitor 3 การทำ normalization เพื่อปรับปริมาตรของการ load ที่อาจจะไม่เท่ากัน ทำโดยใช้ β -actin gene expression เป็นตัวปรับในตัวอย่างเดียวกัน การทดลองนั้นทำ 2 ซ้ำ และคำนวณค่าการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันจากค่า $2^{-\Delta\Delta CT}$ (normalized fold difference)

12. การแปลผลการทดลองทั้งหมด

1. ผลจากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลมทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์มโดยประเมินจากค่า IC_{50} เปรียบเทียบกัน นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control

2. การประเมินผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* นั้นเราสามารถประเมินโดยดูปริมาณของยีน *WT1* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาด้วย real time PCR
3. ทำการประเมินผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* เป็นแบบเป็นไปตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้นหรือไม่
4. ทำการประเมินผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ว่ามีผลต่อการลดอัตราการแบ่งเซลล์หรือไม่
5. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อบ่งบอกความแตกต่างของข้อมูล จากการศึกษาผลการทดลอง ที่ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (3 time independent study) โดยค่า mean $\pm$ SD ที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

13. การสกัด total RNA ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่ถูก transfect ด้วยไวรัสเมอร์วันไอโซฟอร์ม สำหรับ real time PCR

ในการสกัด total RNA ของเซลล์มะเร็งต่าง ๆ นั้น จะใช้น้ำยาสำเร็จรูป High pure Isolation RNA Kit (Roche, Germany) และเติม RNaseOUT™ (RNase inhibitor) 0.5 ถึง 1 μ l เพื่อป้องกันการทำงานของเอนไซม์ RNase จากนั้นทำการเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่ -70°C จนกว่าจะทำการทดลอง โดยแบ่งส่วนหนึ่งมาทำการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer โดยที่:

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้น RNA } (\mu\text{g/ml}) &= \text{ค่า OD ที่ } 260 \text{ nm} \times \text{ความเข้มข้นของ RNA ที่ } 1 \text{ OD} \\ &= (40 \mu\text{g/ml}) \times \text{dilution factor} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ความบริสุทธิ์ของ RNA} &= \frac{\text{ค่า OD ที่ } 260 \text{ nm}}{\text{ค่า OD ที่ } 280 \text{ nm}} \end{aligned}$$

โดยค่าความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้นั้นจะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 2.0 จึงจะถือว่าสกัด RNA ได้ความบริสุทธิ์สูง

14. การหาปริมาณของ total RNA

การหาปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer โดย total RNA ที่เตรียมได้ควรปราศจาก DNAase, RNAase

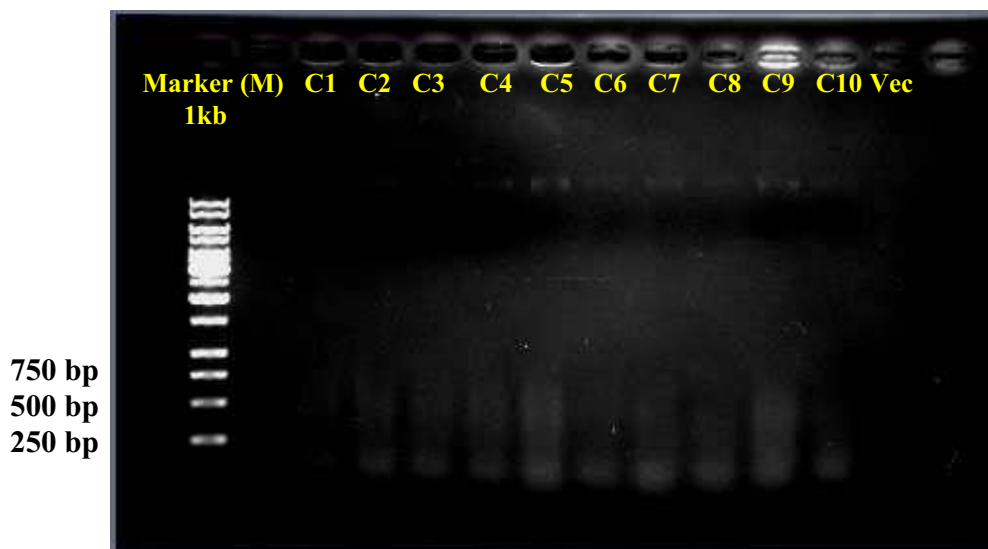
และ Proteinase อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm/ 280 nm ควรจะมีค่าประมาณ 1.6-2.0 โดยคำนวณจากวิธีการดังนี้

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 198 μ l และ total RNA 2 μ l (เจือจาง 100 เท่า) ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer โดยใช้ น้ำกลั่นปรับศูนย์
3. นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของ Total RNA โดยใช้สูตร 1 OD มีค่าเท่ากับ 40 μ g/ml แล้วคูณด้วย dilution factor (X100)

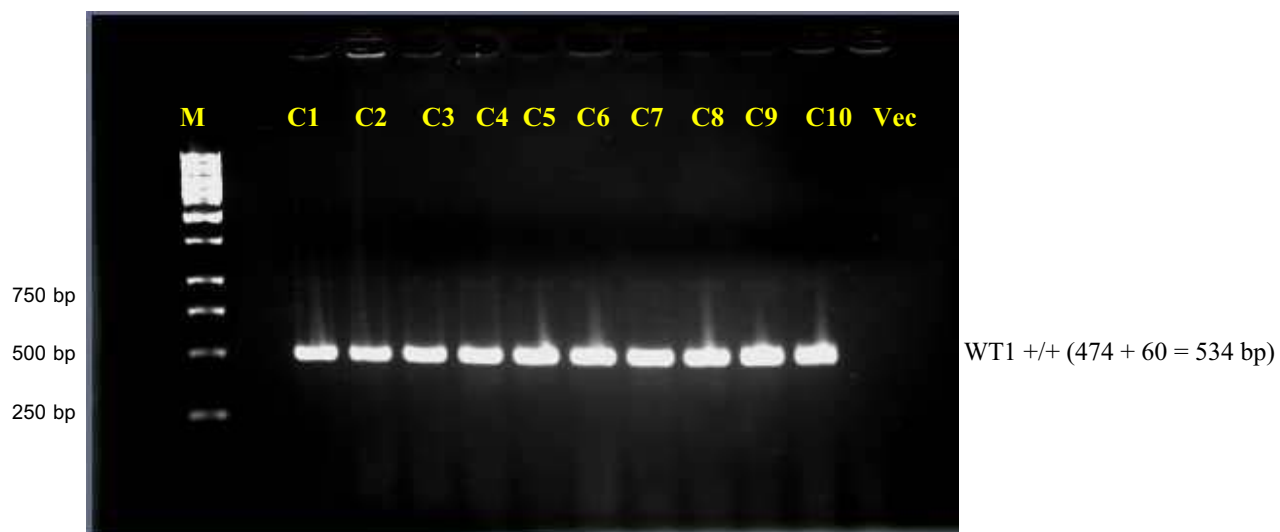
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1. ผลการโคลนยีน

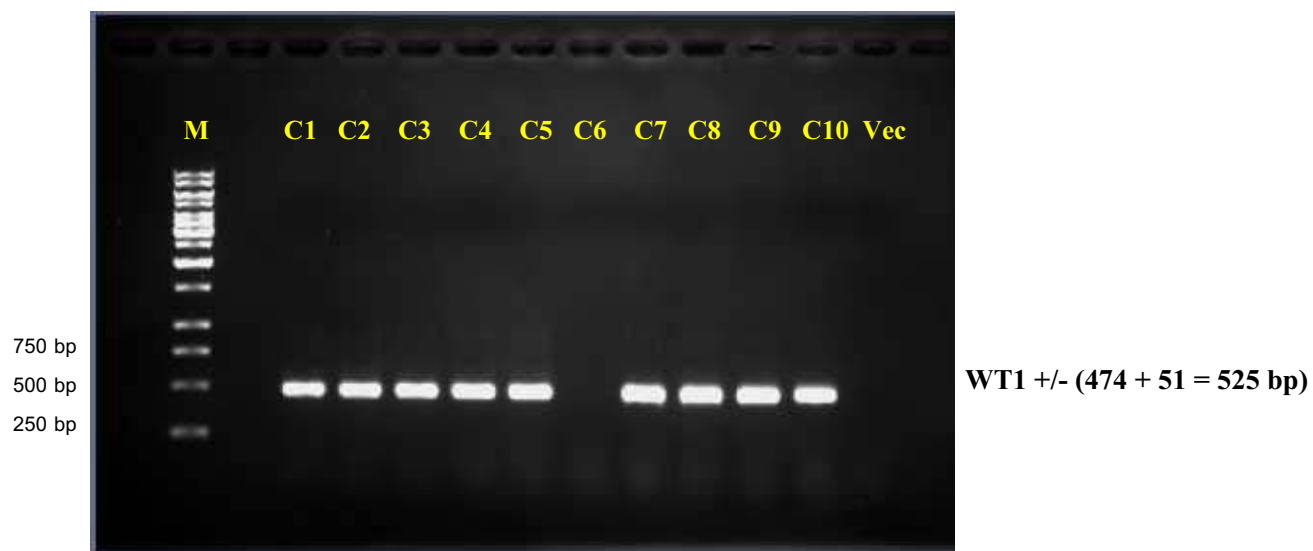
ทำการ transfect เซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันน้อย ด้วยเวกเตอร์ที่มี WT1 isoform 4 ชนิดคือ WT1 17AA (+) KTS (+), WT1 17AA (+) KTS (-), WT1 17AA (-) KTS (+), WT1 17AA (-) KTS (-) โดยใช้ Lipofectin ตั้งขึ้นตอนดังต่อไปนี้ นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ WT1 แต่ละชนิด (WT1 +/+, WT1 +/-, WT1 -/+ หรือ WT1 -/-) เชื่อมต่อกับพลาสมิดชนิด pcDNA 3.1(+) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan) จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมแต่ละชนิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α) ด้วยวิธี heat shock หลังจากนั้นตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB agar ที่ผสมแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ มาเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ พลาสมิดที่ไม่ได้เชื่อมต่อดีเอ็นเอ หลังจากที่ได้โคโลนีที่มีได้รับพลาสมิดสายผสมนำโคโลนีนั้นมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB agar ที่ผสมแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ แล้วนำ โคโลนีซึ่งมี พลาสมิดที่ได้รับสายผสมมาเพิ่มปริมาณใน LB broth ที่ผสมแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ และสกัดพลาสมิดจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Plasmid midiprep: Alkaline lysis (ดังแสดงในรูป 8-12)



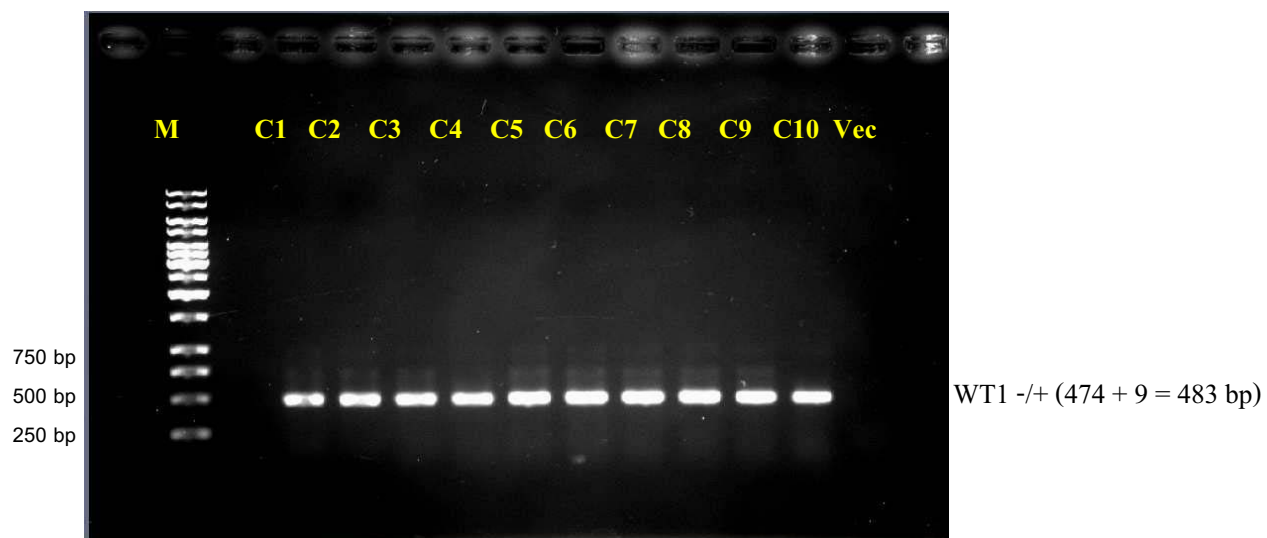
รูปที่ 8. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดเปล่า



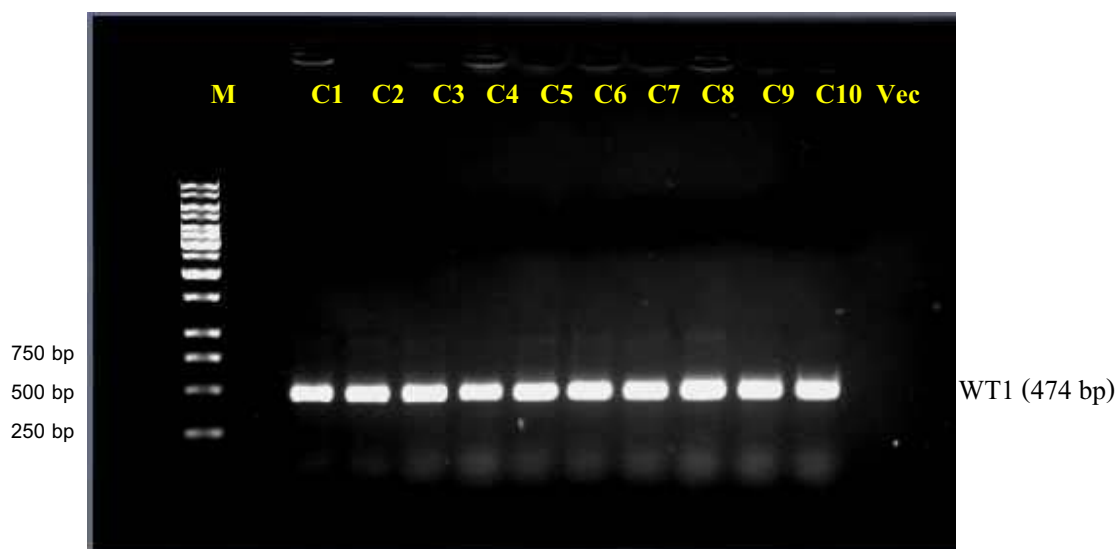
รูปที่ 9. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 +/+



รูปที่ 10. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 +/-



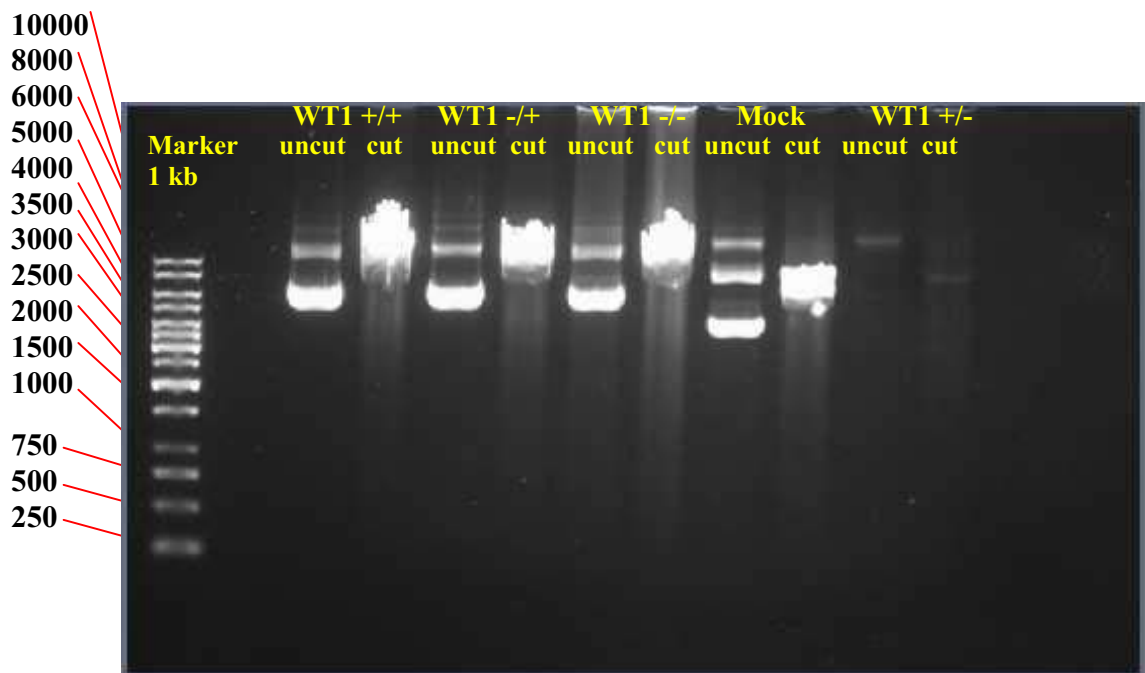
รูปที่ 11. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ชนิด WT1 -/+



รูปที่ 12. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ชนิด WT1 -/-

การตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วย restriction enzyme

นำพลาสมิดมาผสมกับ Buffer R และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Hind*III, บริษัท Fermentas, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas, USA) (ดังแสดงในรูป 13)

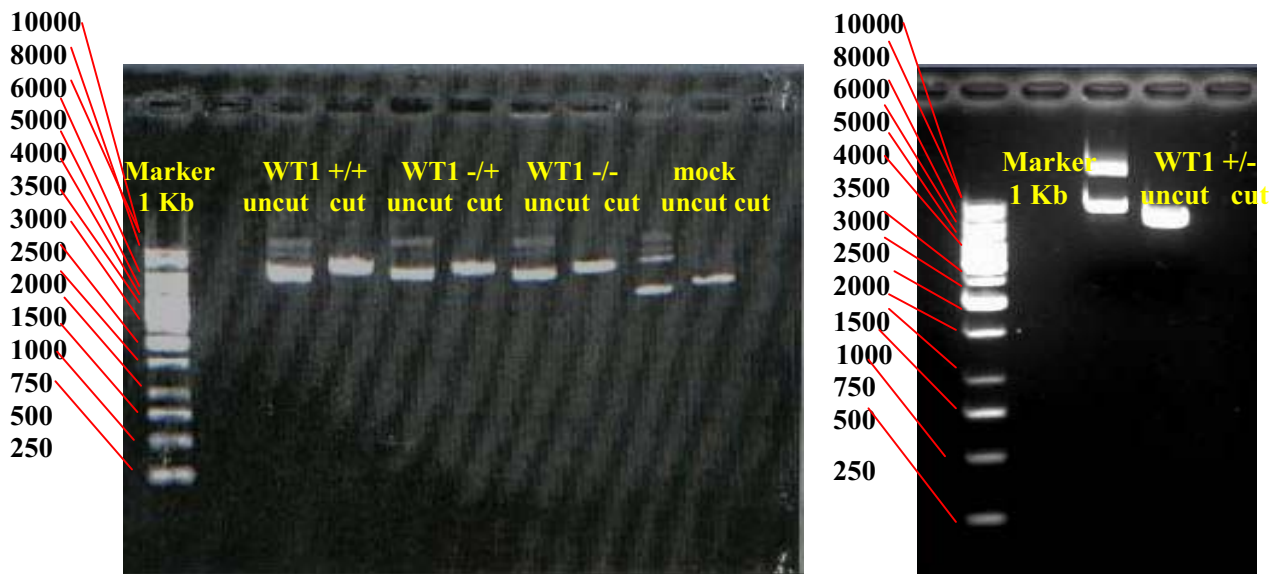


รูปที่ 13. แสดงการตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hind*III และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel

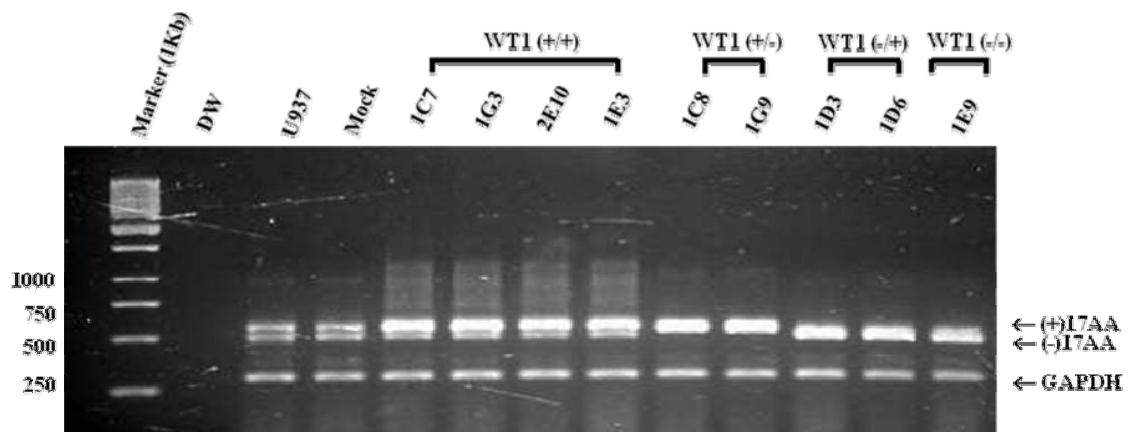
การนำยีนเข้าเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นเซลล์ชนิด mammalian cell

นำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้มาผสมกับ K buffer, 0.1% BSA และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Pvu*I, บริษัท Takara Bio Inc. Japan) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder marker (ดังแสดงในรูปที่ 14) หลังจากนั้นนำชิ้นพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์แล้วจำนวน 5 ng ผสมกับอาหารชนิด incomplete medium 1640 จำนวน 150 μ l และ superfect transfection reagent (บริษัท Qiagen, USA) เติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ U937 จำนวน 5×10^4 cells/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5 % คาร์บอนไดออกไซด์

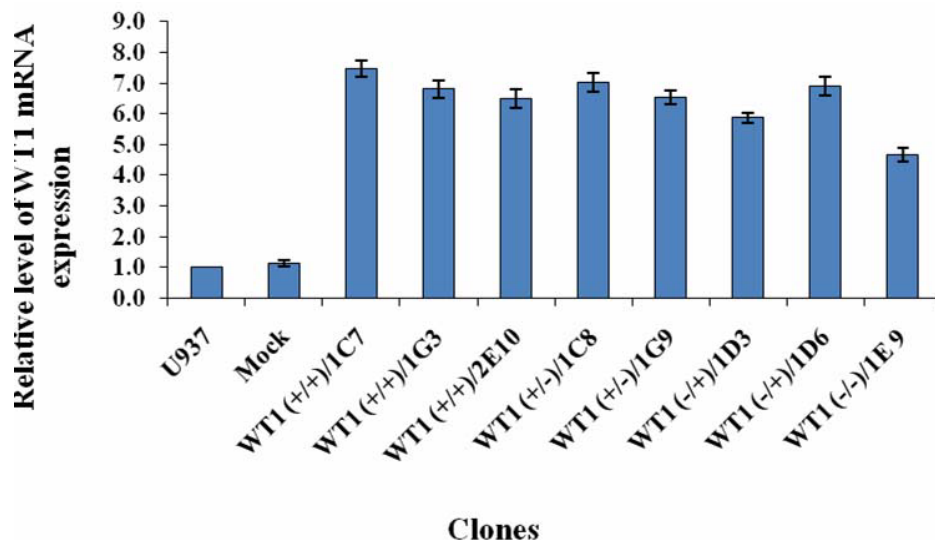
นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์และปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง แล้วปรับเซลล์ให้ได้ 1×10^4 cells/ml ด้วยอาหาร RPMI1640 ที่มี 10%FBS ยาต้านแบคทีเรีย และยา G418 หลังจากนั้นเลี้ยงในจาน 96 หลุม โดยเติมหลุมละ 100 μ l นาน 14 วัน ซึ่งเซลล์ U937 ที่ไม่ได้รับยีนพลาสมิดเข้าไปจะไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี G418 ได้ แต่โคลนของเซลล์ U937 ที่ได้รับยีนพลาสมิด เข้าไปจะสามารถเจริญได้ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนและตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แต่ละชนิด และ mock เปรียบเทียบกับเซลล์ U937 ที่ไม่ได้ทำการถ่ายยีนเข้าไป ด้วยวิธี RT-PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% agarose gel (ดังแสดงในรูปที่ 15) และวิธี Real time PCR (ดังแสดงในรูปที่ 16) นอกจากนี้ได้ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot (ดังแสดงในรูปที่ 17) ซึ่งพบว่ามีเพียง WT1 (+/+) isoform เท่านั้นที่สามารถทำการตรวจวัดการแสดงที่เพิ่มมากขึ้นด้วยวิธี Western blot ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจการแสดงของโปรตีน WT1 ใน WT1 isoform อื่นว่าที่ทำการ transfect เข้าไปนั้นสามารถผลิตโปรตีน WT1 (exogenous protein) ได้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control โดยอาศัยหลักการ immunoprecipitation และ Western blot พบว่า WT1 (+/-), (-/+) และ (-/-) isoform สามารถผลิตโปรตีน WT1 เพิ่มขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control และทำการปรับเทียบค่ากับ β -actin (loading control) หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกโคลนมาศึกษาในการทดลองต่อไปโดยคัดเลือกจากการแสดงออกของ WT1 มากกว่า 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ U937 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป ส่วน mock ต้องมีการแสดงออกของ WT1 เท่ากับ U937 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป หลังจากที่ได้คัดเลือกโคลนได้แล้วมาทำการศึกษากับสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์



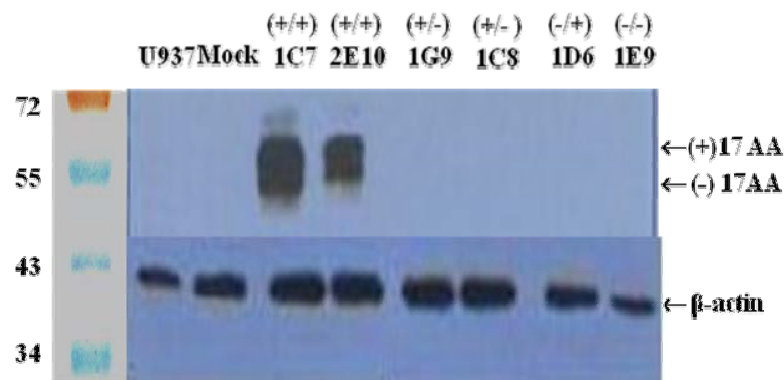
รูปที่ 14. แสดงการตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *PvI* และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel



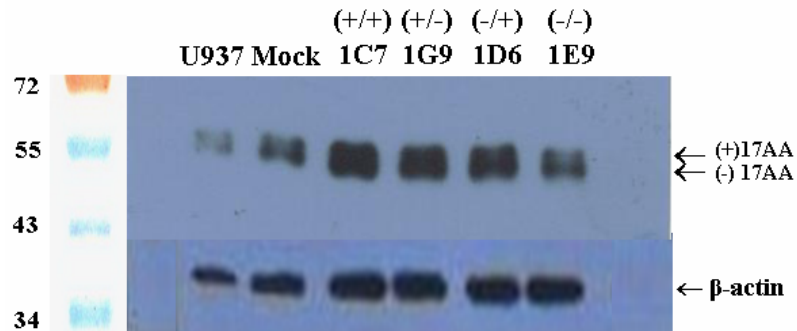
รูปที่ 15. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์ไข่มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock โดยวิธี RT-PCR และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% agarose gel



รูปที่ 16. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์ไข่มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock โดยวิธี real time PCR



รูปที่ 17. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน *WT1* แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control โดยวิธี Western blot



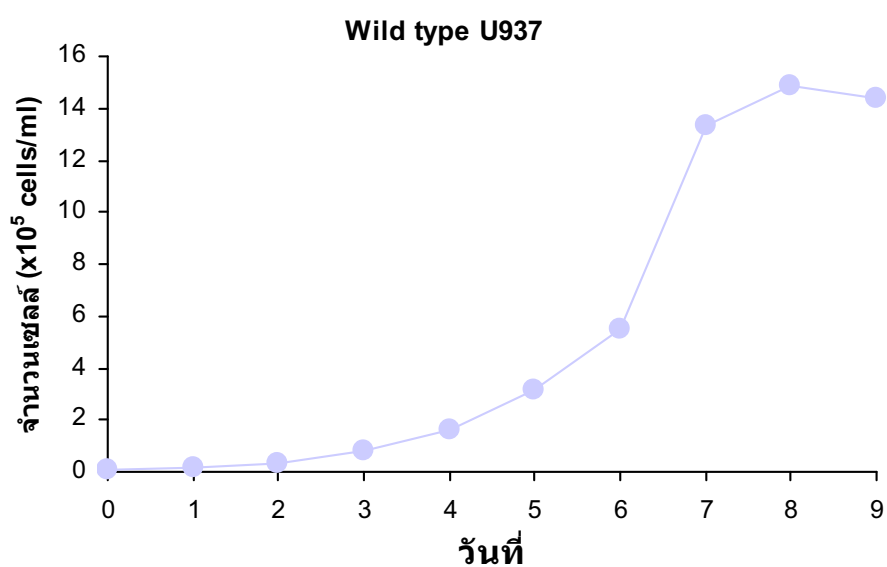
รูปที่ 18. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1 แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control โดยวิธี Immunoprecipitation และ Western blot

ผลการทดลองที่ 2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว wild type U937 และ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 isoform

การศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว wild type U937 และ U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัม ทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม 4 ชนิด คือ WT1 (+/+), WT1 (+/-), WT1 (-/+), WT1 (-/-) รวมทั้ง mock control โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1-10 วัน โดยแต่ละวันทำนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Trypan blue exclusion พบจำนวนของเซลล์ในแต่ละวันตามที่แสดงดังตารางที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 และรูปที่ 19, 20, 21, 22, 23, 24 และ 25 ตามลำดับ โดยค่าจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์นี้ นำมาใช้เพื่อหาจุดเริ่มต้นของการเตรียมเซลล์เพื่อทดสอบสารสกัด อย่างเหมาะสม

ตารางที่ 1. แสดงจำนวนเซลล์ wild type U937 ที่นับได้ใน 10 วัน

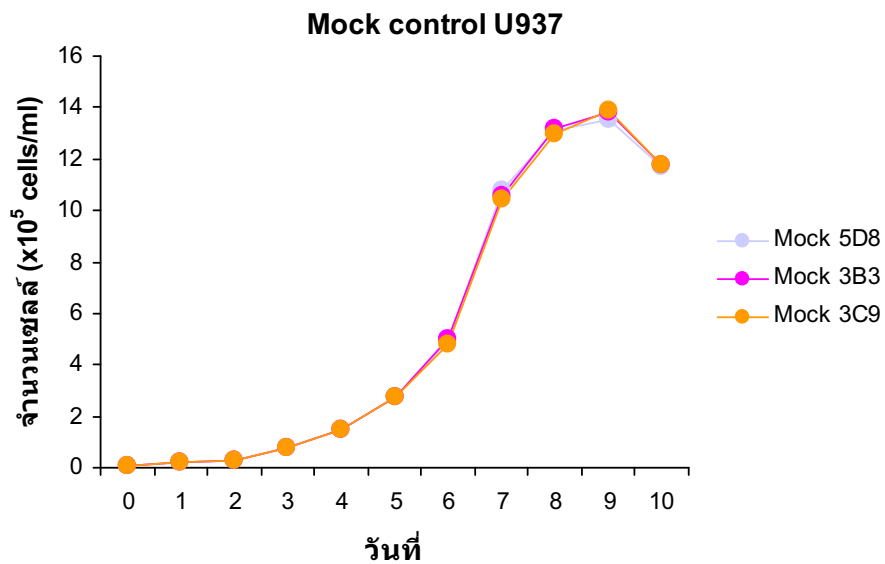
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.2
2	0.34
3	0.8
4	1.62
5	3.16
6	5.5
7	13.3
8	14.9
9	14.4
10	9.06



รูปที่ 19. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว wild type U937

ตารางที่ 2. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย vector เปล่า (mock) ที่นับใน 10 วัน

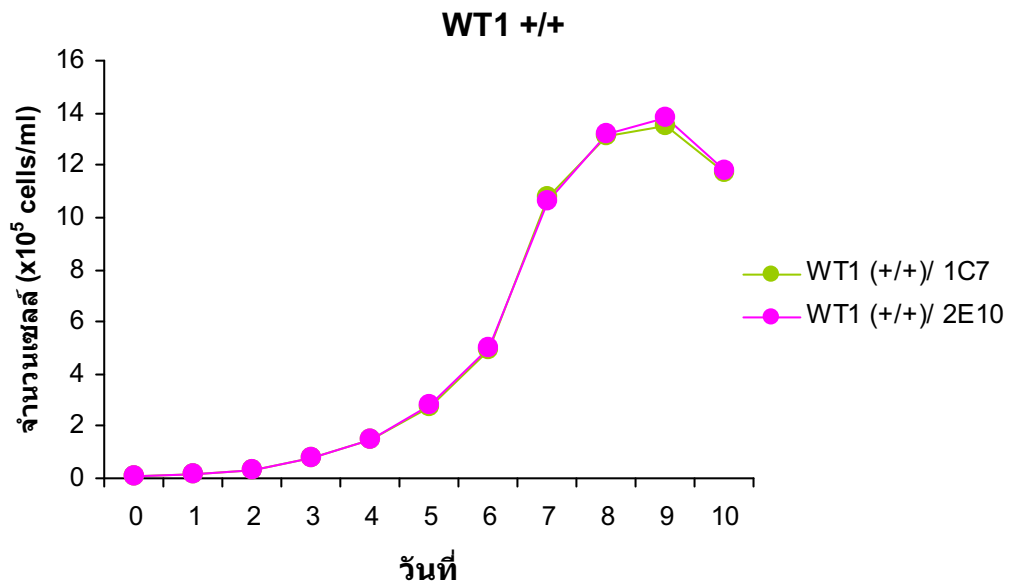
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)		
	Mock 5D8	Mock 3B3	Mock 3C9
0	0.1	0.1	0.1
1	0.18	0.18	0.19
2	0.31	0.3	0.31
3	0.77	0.78	0.78
4	1.47	1.46	1.48
5	2.73	2.78	2.75
6	4.92	5	4.82
7	10.8	10.6	10.4
8	13.1	13.2	13
9	13.5	13.8	13.9
10	11.7	11.8	11.8



รูปที่ 20. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย vector เปล่า (mock control)

ตารางที่ 3. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/) ที่นับใน 10 วัน

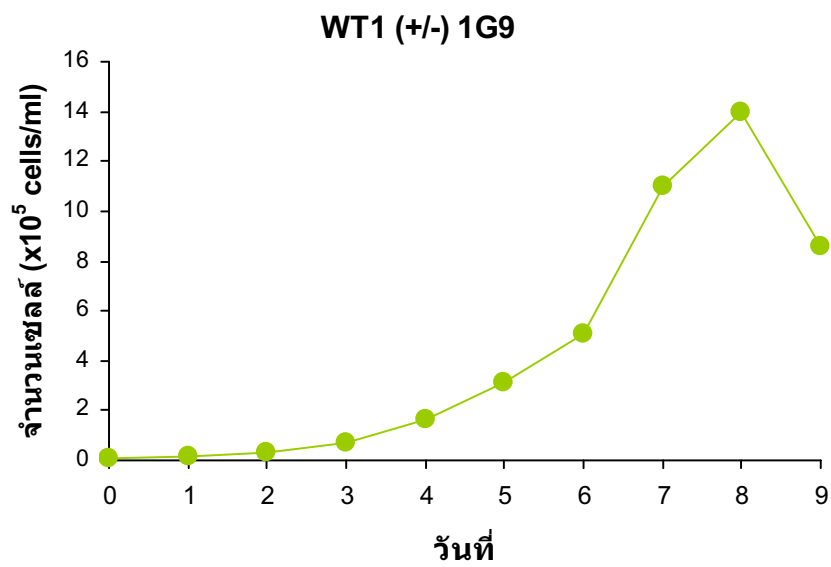
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cell/ml)	
	WT1 (++)/1C7	WT1 (++)/2E10
0	0.1	0.1
1	0.187	0.2
2	0.35	0.355
3	0.8	0.78
4	1.49	1.5
5	2.97	2.91
6	5.1	5.2
7	11.6	11.3
8	13.7	13.4
9	13.9	13.8
10	11.7	11.8



รูปที่ 21. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/)

ตารางที่ 4. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/-) ที่นับใน 10 วัน

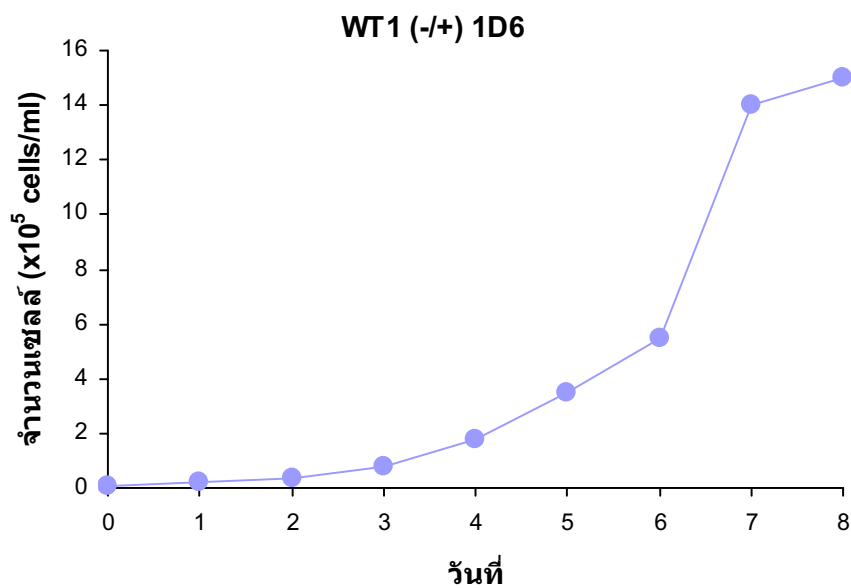
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.19
2	0.32
3	0.74
4	1.65
5	3.15
6	5.06
7	11
8	14
9	8.6
10	5.3



รูปที่ 22 กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/-)

ตารางที่ 5. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/+) ที่นับใน 10 วัน

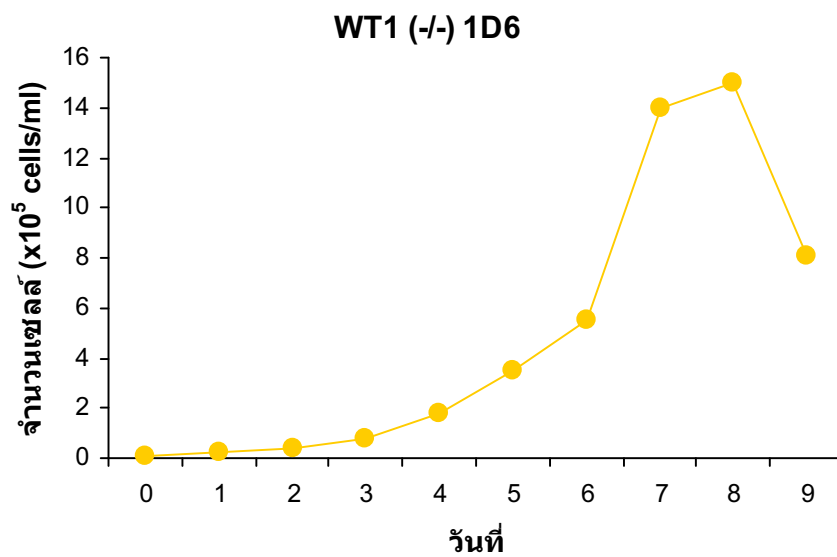
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.2
2	0.36
3	0.81
4	1.75
5	3.5
6	5.5
7	14
8	15
9	8.1
10	5.4



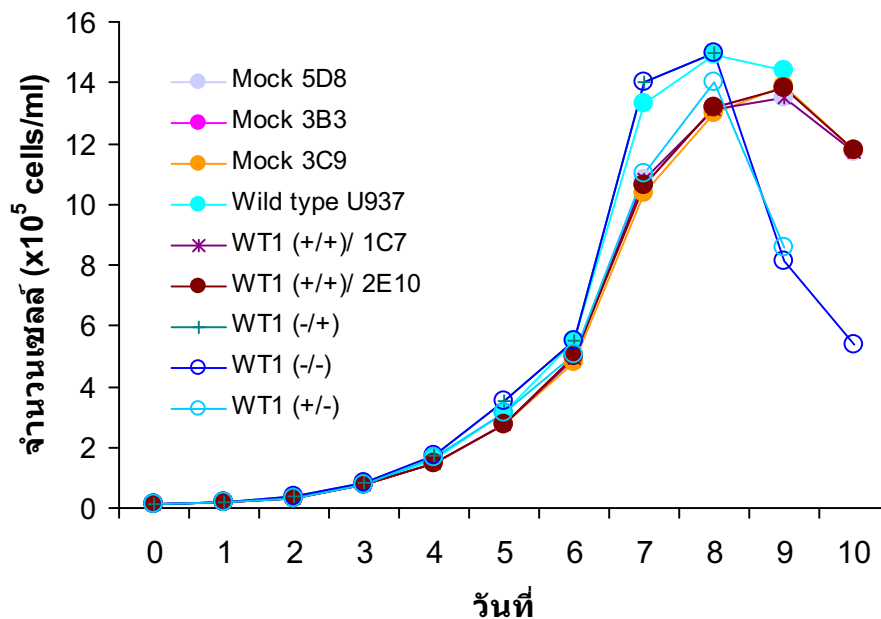
รูปที่ 23. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/+)

ตารางที่ 6. แสดงจำนวนเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/-) ที่นับใน 10 วัน

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.2
2	0.36
3	0.81
4	1.75
5	3.5
6	5.5
7	14
8	15
9	8.1
10	5.4



รูปที่ 24. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/-)



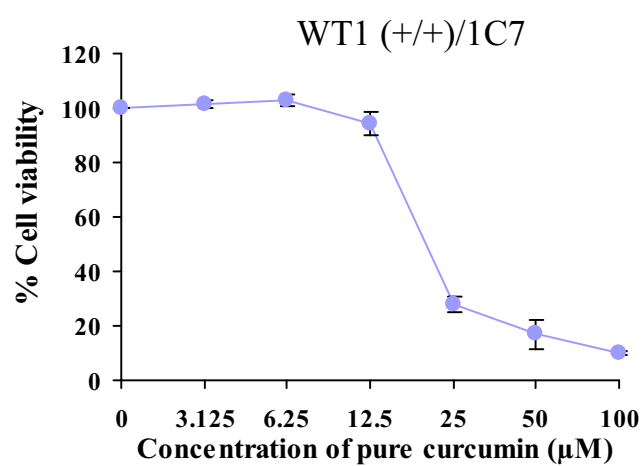
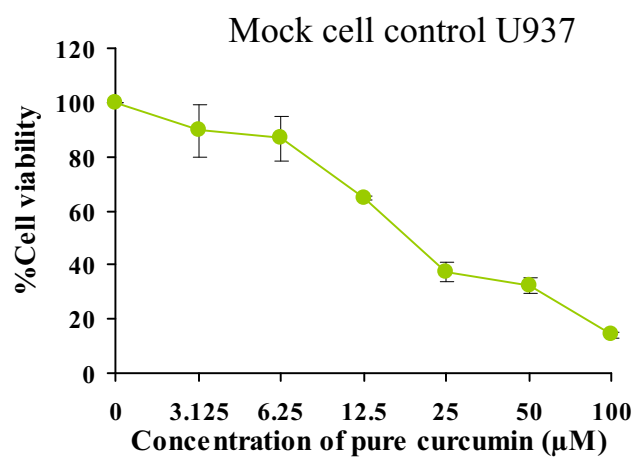
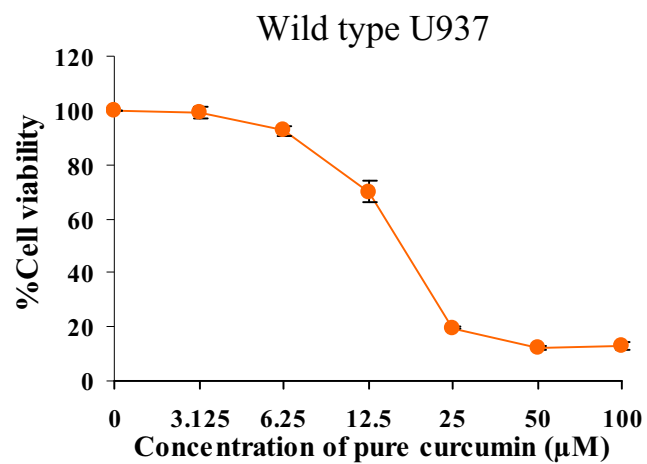
รูปที่ 25. กราฟสรุปรวมผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม รวมทั้ง mock control และ wild type U937

ผลการทดลองที่ 3. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการทำลายเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม

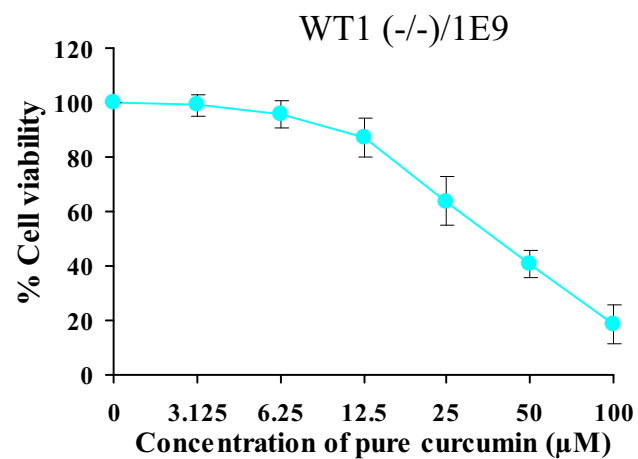
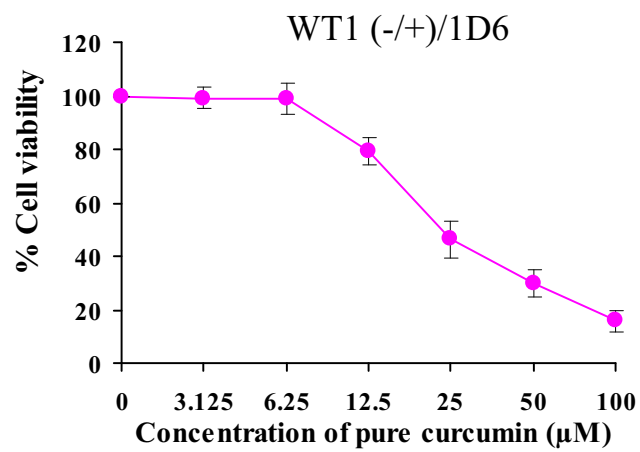
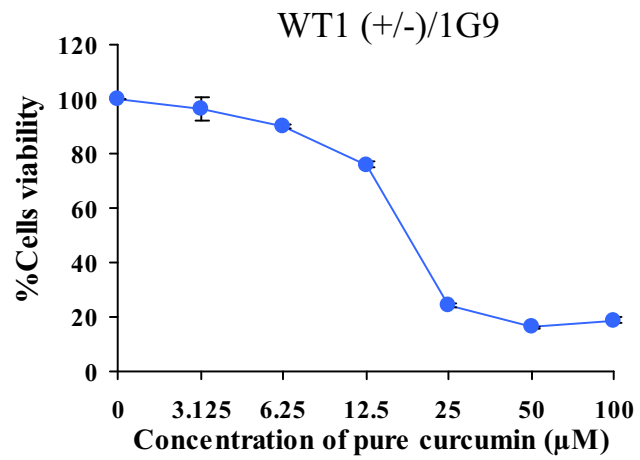
การศึกษากฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการทำลายเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย 4 ไอโซฟอร์มซึ่งประกอบด้วย WT1 (+/+), (+/-), (-/+) และ (-/-) ของ WT1, mock control และ wild U937 จากผลการทดลองพบว่า เคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ให้ผลในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม รวมทั้ง mock control และ wild type U937 ได้ จากการเปรียบเทียบผลการทดลองโดยใช้ค่าความเข้มข้นของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม รวมทั้ง mock control และ wild type ไป 50% หรือที่เรียกว่า “IC₅₀” โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์มของ ใช้ความเข้มข้นของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในการที่ทำให้เซลล์ดังกล่าวลดลงครึ่งหนึ่ง คือที่ความเข้มข้น 21 μ M สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform โคลน 1C7 และ, WT1 (+/-) isoform โคลน 1G9 ที่ความเข้มข้น 19 μ M, WT1 (-/+) isoform โคลน 1D6 ที่ความเข้มข้น 24 μ M, WT1 (-/-) isoform โคลน 1E9 ที่ความเข้มข้น 23 μ M (แสดงดังตารางที่ 7 และรูปที่ 26)

ตารางที่ 7. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มที่ถูก transfect เข้าไปเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 และ wild type U937

ชนิดของ U937 transfected cells	ความเข้มข้นของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ (μM)	
	IC_{20}	IC_{50}
Wild type U937 cell	9 ± 0.6	15 ± 1.0
Mock control cell	8 ± 1.7	17 ± 2.2
WT1 (+/+)/1C7	16 ± 0.8	$21^* \pm 1.0$
WT1 (+/-)/1G9	11 ± 1.2	19 ± 0.2
WT1 (-/+)/1D6	13 ± 0.3	$24^* \pm 0.6$
WT1 (-/-)/1E9	13 ± 0.5	$23^* \pm 0.4$



(ต่อหน้าถัดไป)



รูปที่ 26. ผล cytotoxicity ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อ WT1 isoform ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

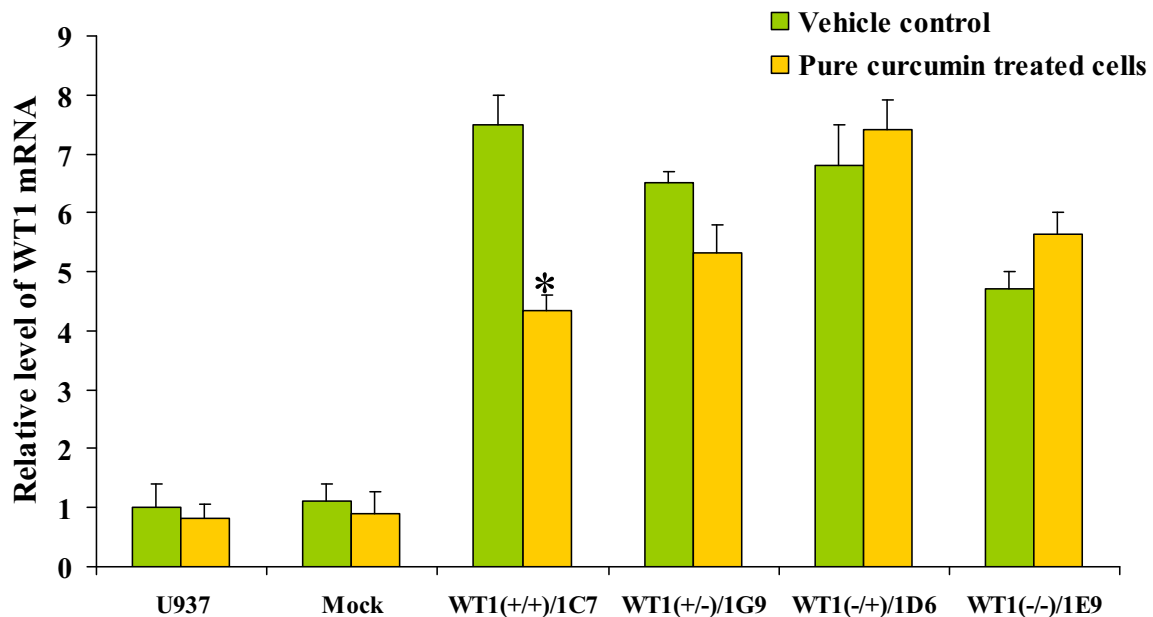
ผลการทดลองที่ 4. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของยีนวิลม์ทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor1; WT1*) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลม์ทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม ด้วยวิธี real time PCR

จากการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลม์ทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม, mock control และ wild type U937 จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนวิลม์ทูเมอร์วัน (WT1 mRNA) โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นระยะเวลา 2 วัน มาทำการทดลอง 3 ครั้ง (3 time independent study) ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่ค่า IC_{20} ดังแสดงในตารางที่ 8 มาใช้ในการทดสอบ เพื่อต้องการดูฤทธิ์ของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์โดยตรงต่อการลดการแสดงออกของยีนวิลม์ทูเมอร์วัน และเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงไม่ให้ผลการทดลองไปเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์ทั้ง อะพอพโตซิส (apoptosis) และเนโครซิส (necrosis) โดยใช้วิธี Real time PCR จากผลการทดลองพบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดการแสดงออกของยีนวิลม์ทูเมอร์วัน ชนิด WT1 (+/+) isoform ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ได้ร้อยละ 57 ± 0.03 หรือสามารถยับยั้งการแสดงออกได้ร้อยละ 43 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนเซลล์ที่เป็น WT1 (+/-), WT1 (-/+) และ WT1 (-/-) พบว่าไม่สามารถลดระดับการแสดงออกของยีนวิลม์ทูเมอร์วันได้ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 8 และรูปที่ 27

ตารางที่ 8. ผลการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การแสดงออกยีนวิลม์ทูเมอร์วันในไอโซฟอร์มต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยวิธี real time PCR

การทดลอง	ระดับการแสดงออกของวิลม์ทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ (ร้อยละ)					
	Wild type U937	Mock control	WT1 (+/+)	WT1 (+/-)	WT1 (-/+)	WT1 (-/-)
ชุดควบคุม (vehicle control)	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
ชุดศึกษา (treatment)	85 ± 0.06	81 ± 0.01	$57^* \pm 0.03$	82 ± 0.01	110 ± 0.07	123 ± 0.01

หมายเหตุ: เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$



รูปที่ 27. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time independent study)

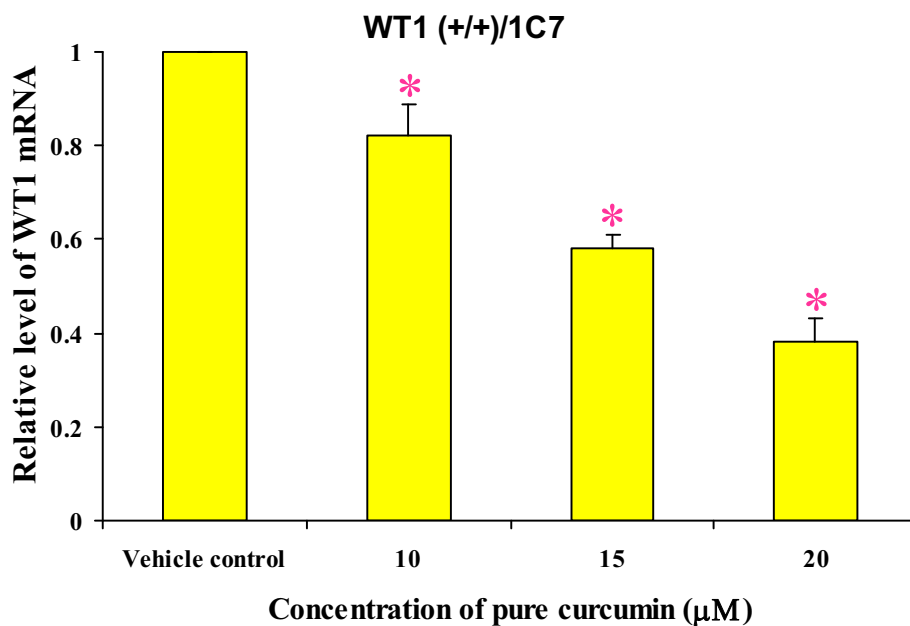
หมายเหตุ: เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

ผลการทดลองที่ 5. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด +/- ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

จากการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*WT1*) ในแต่ละไอโซฟอร์มนั้น พบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดการแสดงของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด *WT1 (+/+)* isoform ดังผลการทดลองที่ 4 ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือก *WT1 (+/+)* isoform มาทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยใช้ความเข้มข้น คือ 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 2 วัน ด้วยวิธี real time PCR จากผลการศึกษาพบว่าหลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ เซลล์มีการแสดงออกของระดับวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ เท่ากับร้อยละ 83 ± 0.05 , 59 ± 0.02 และ 38 ± 0.05 ตามลำดับ หรือระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น คือร้อยละ 17, 41 และ 62 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทั้ง 3 ความเข้มข้นเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลในการลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 28

ตารางที่ 9. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform

ชุดการทดลอง	ระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วัน เอ็มอาร์เอ็นเอ (ร้อยละ)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	100	100	100	100 $\pm$ 0
ความเข้มข้น 10 μM	87	78	83	83* $\pm$ 0.05
ความเข้มข้น 15 μM	60	57	59	59* $\pm$ 0.02
ความเข้มข้น 20 μM	42	33	38	38* $\pm$ 0.05



รูปที่ 28. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยวิธี real time PCR โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

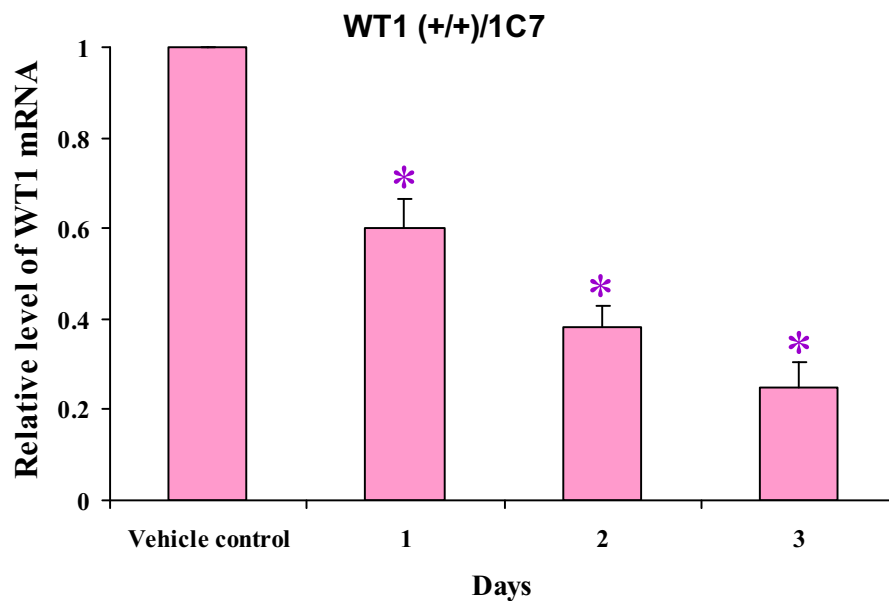
หมายเหตุ: Vehicle control = ชุดควบคุม เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

ผลการทดลองที่ 6. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด +/- ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

จากการศึกษาผลของการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันลดลงตามของความเข้มข้นของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่เพิ่มมากขึ้น ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่มต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยใช้ความเข้มข้นที่ 15 μM เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันหลังจากทดสอบด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์เท่ากับร้อยละ 61 ± 0.06 , 36 ± 0.05 และ 25 ± 0.03 ตามลำดับ หรือสามารถลดการแสดงออกได้ร้อยละ 39, 64 และ 75 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยระยะเวลาทั้ง 3 ระยะให้ผลในการลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 29

ตารางที่ 10. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีน *WT1* (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform

ชุดการทดลอง	ระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วัน เอ็มอาร์เอ็นเอ (ร้อยละ)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	100	100	100	100 ± 0
วันที่ 1	66	55	61	$61^* \pm 0.06$
วันที่ 2	40	31	36	$36^* \pm 0.05$
วันที่ 3	22	27	25	$25^* \pm 0.03$



รูปที่ 29. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน โดยวิธี real time PCR ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

หมายเหตุ: Vehicle control = ชุดควบคุม เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

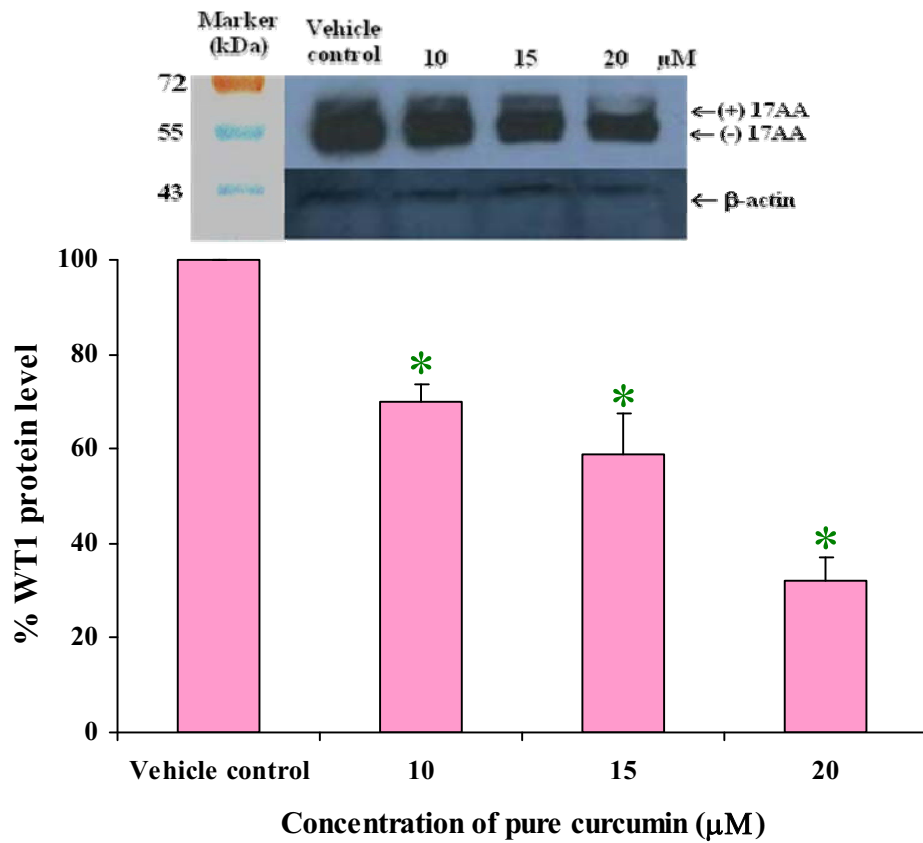
ผลการทดลองที่ 7. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน (Wilms' tumor1 protein; WT1 protein) ชนิด +/+ ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน จากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย 4 isoform ของ WT1 พบว่า WT1 (+/+) isoform มีการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการแสดงของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันของไอโซฟอร์มอื่นซึ่งประกอบด้วย WT1 (+/-), (-/+) และ (-/-) ที่ไม่สามารถตรวจวัดด้วยวิธี Western blot ได้ ดังนั้นจึงอาศัยหลักการทำ immunoprecipitation มาทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันของไอโซฟอร์มดังกล่าวข้างต้น พบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลมทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม มีการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control ดังแสดงในรูปที่ 13 และจากผลการศึกษาของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน พบว่า

สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด WT1 (+/+) ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของ เคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot พบว่าที่ความเข้มข้น 3 ระดับ มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เท่ากับร้อยละ 70 ± 2.3 , 58 ± 6.3 และ 33 ± 4.7 ตามลำดับ หรือ สามารถลดการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น หลังทำการปรับปริมาตรเทียบค่ากับโปรตีน β -actin คือลดลงร้อยละ 30, 42 และ 67 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทั้ง 3 ความเข้มข้นเป็นความเข้มข้นให้ผลในการลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 30

ตารางที่ 11. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform

การทดลอง	ระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (ร้อยละ)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	100	100	100	100 ± 0
ความเข้มข้น 10 μM	72	68	68	$70^* \pm 2.3$
ความเข้มข้น 15 μM	64	58	57	$58^* \pm 6.3$
ความเข้มข้น 20 μM	36	35	27	$33^* \pm 4.7$



รูปที่ 30. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot ทำการทดลอง 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

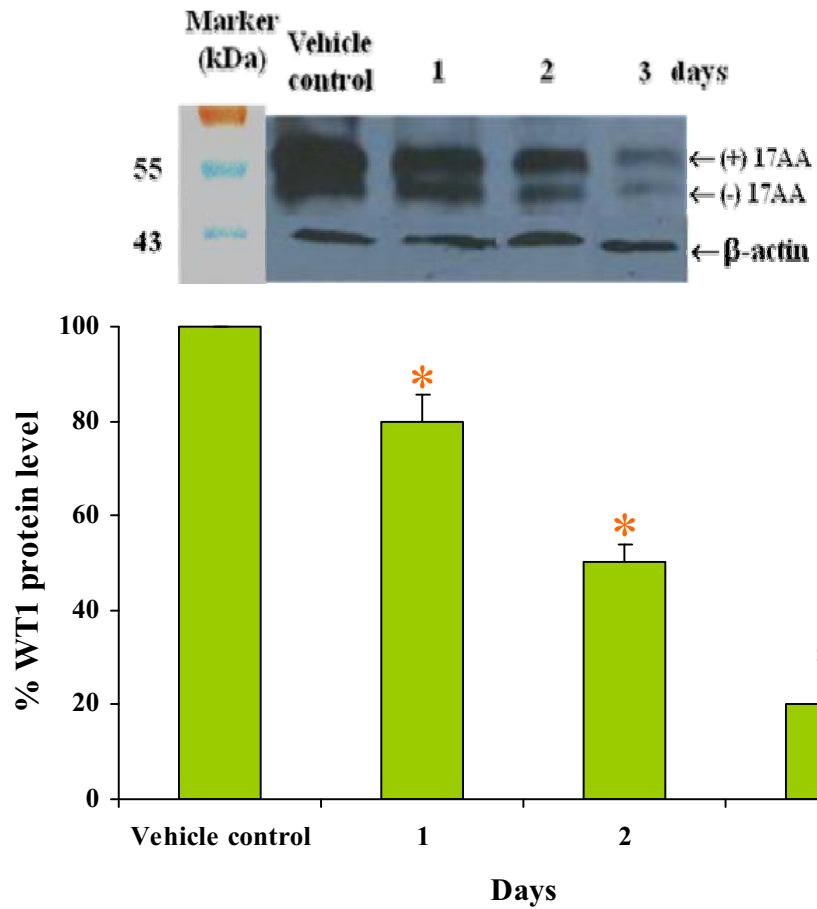
หมายเหตุ: Vehicle control = ชุดควบคุม เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

ผลการทดลองที่ 8. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 15 μ M ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ชนิด +/- ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

จากการศึกษาผลของการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ลดลงตามของความเข้มข้นของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่เพิ่มมากขึ้น ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่มต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยใช้ความเข้มข้นที่ 15 μ M เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน จากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลา 1-3 วัน มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันหลังทำการปรับเทียบค่ากับ β -actin เท่ากับร้อยละ 61 ± 5.5 , 36 ± 4.8 และ 22 ± 5.8 ตามลำดับ หรือมีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 20, 48 และ 68 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยระยะเวลาทั้ง 3 ให้ผลในการลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 31

ตารางที่ 12. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μ M ในระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform

การทดลอง	ระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (ร้อยละ)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
Vehicle control	100	100	100	100 $\pm$ 0
วันที่ 1	74	83	84	61* $\pm$ 5.5
วันที่ 2	47	56	54	36* $\pm$ 4.8
วันที่ 3	15	24	26	22* $\pm$ 5.8

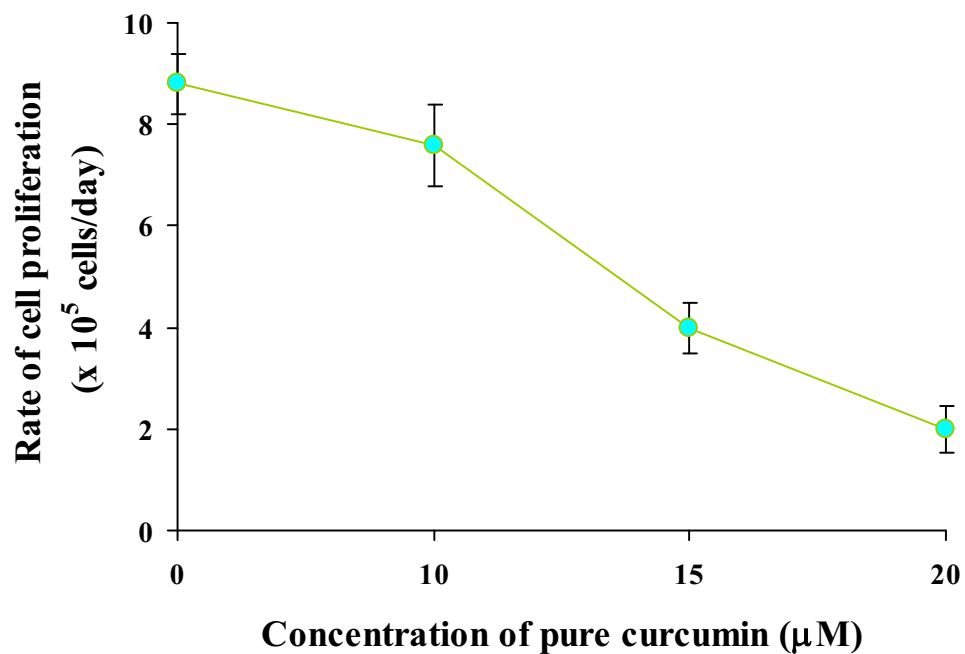


รูปที่ 31. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot ทำการทดลอง 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

หมายเหตุ: Vehicle control = ชุดควบคุม เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

ผลการทดลองที่ 9. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่สภาวะเหมาะสมต่ออัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 +/+

จากผลการศึกษาผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform เป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ สามารถลดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ได้จาก 8.6×10^5 cells/วัน เหลือ 2×10^5 cells/วัน ที่ความเข้มข้น 20 μM ซึ่งอัตราการแบ่งตัวจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 32



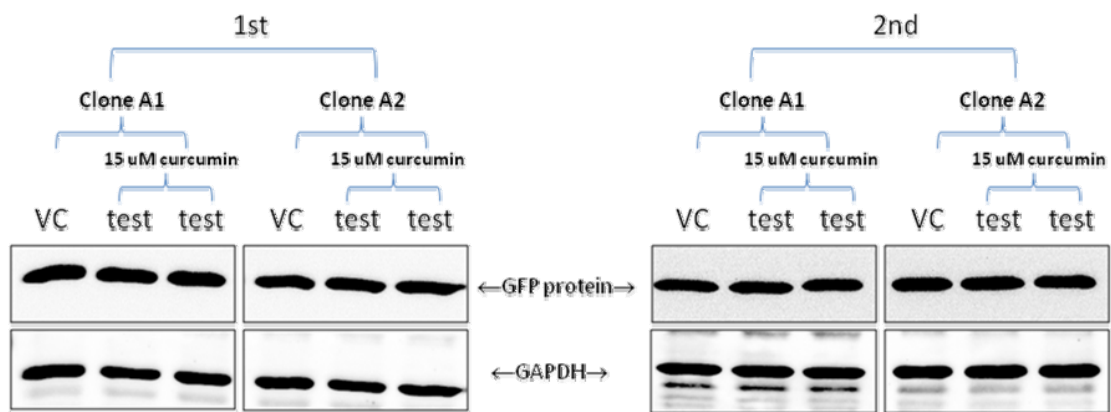
รูปที่ 32. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเหมาะสมและสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform

ผลการทดลองที่ 10 การศึกษากลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดลงของโปรตีนวิล์มทูวัน (+/+) ชนิด exogenous ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

การศึกษานี้เป็นการศึกษากลไกการลดลงของโปรตีนวิล์มทูวันชนิด +/+ ซึ่งเป็นโปรตีนวิล์มทูวันชนิด exogenous การทดลองได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการทำงานของ pCMV promoter เนื่องจากโปรตีนวิล์มทูวันชนิด exogenous เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ pCMV ในเวกเตอร์ของ pcDNA 3.1(+) ซึ่งไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิล์มทูวัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อโปรโมเตอร์ pCMV ว่าส่งผลต่อการลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูวันชนิด +/+ ได้อย่างไร การศึกษาทำโดยใช้ pcDNA3.1 (+) ที่ถูกปรับแต่งโดยการแทรกยีน GFP, epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2), ErbB3 หรือ leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1 (Lrig1) ที่ต่ออยู่กับยีน *c-myc* เพื่อเป็นรูปแบบตัวอย่างในการศึกษา หลังจากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ K562 โดยวิธี transfection เพื่อให้เซลล์มีการสร้างโปรตีนดังกล่าวออกมา และใช้ในการศึกษาว่าเคอร์คิวมินมีผลต่อโปรโมเตอร์ pCMV ที่ส่งผลต่อการสร้างโปรตีนหรือไม่ การทดลองทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 15 μ M หลังจากนั้นทำการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot จากการศึกษาพบว่า หลังจากการ treat เซลล์ด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ การแสดงออกของโปรตีน GFP อยู่ในช่วง 100 ± 0.5 ถึง 104 ± 5 จากการทดลองใน 2 clones และทำอย่างละ 2 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 13 รูปที่ 33 การแสดงออกของโปรตีน ErbB2 (676) อยู่ในช่วง 96.5 ± 1.5 ถึง 104 ± 5 จากการทดลองใน 2 clones และทำอย่างละ 2 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 14 รูปที่ 34 การแสดงออกของโปรตีน ErbB3 อยู่ในช่วง 101.5 ± 0.5 ถึง 103 ± 4 จากการทดลองใน 2 clones และทำอย่างละ 2 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 15 รูปที่ 35 และการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 อยู่ในช่วง 99 ± 1 ถึง 99 ± 2 จากการทดลองใน 2 clones และทำอย่างละ 2 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 16 รูปที่ 36 ดังนั้นสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์จึงไม่มีผลต่อการทำงานของ pCMV promoter เนื่องจากไม่สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน GFP, ErbB2, ErbB3 และ Lrig1 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p > 0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 13-16 และรูปที่ 33-36

ตารางที่ 13. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน GFP (%) (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

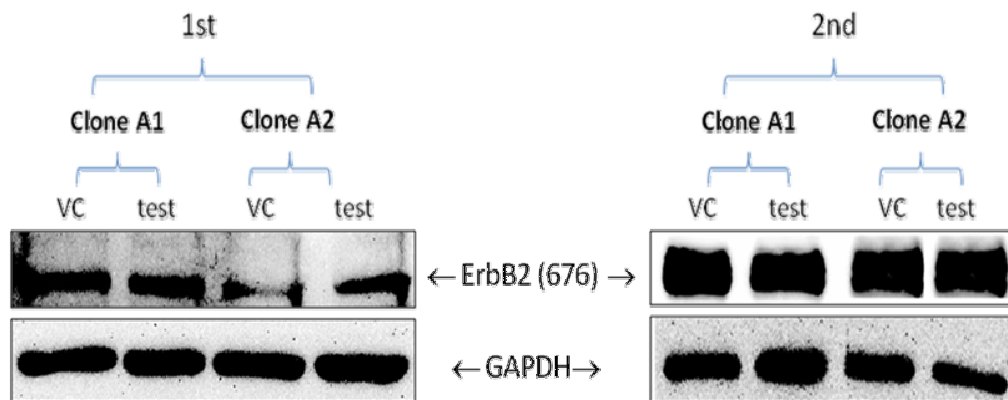
การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	100	100	100	100	100	100
15 μM curcumin (ซ้ำที่ 1)	99	101	104 $\pm$ 5	101	100	100 $\pm$ 0.5
15 μM curcumin (ซ้ำที่ 2)	102	100	101 $\pm$ 1	103	100	101.5 $\pm$ 1.5



รูปที่ 33. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน GFP ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

ตารางที่ 14. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB2 (676) (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

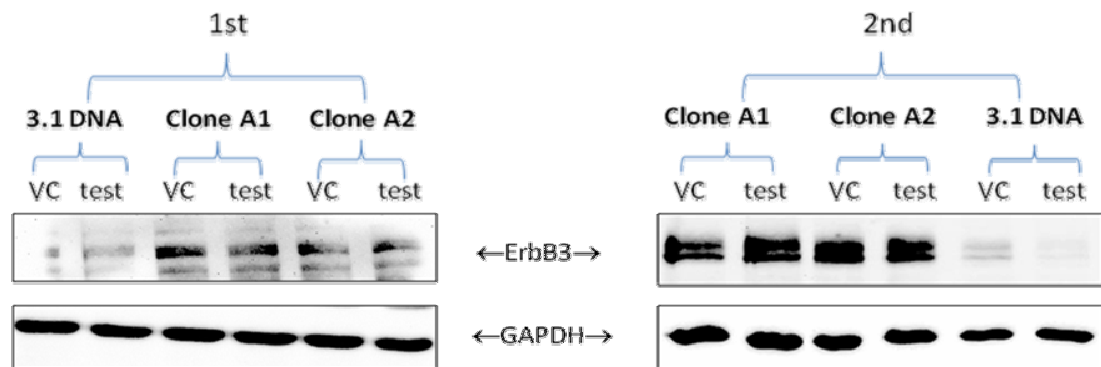
การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
Vehicle control	100	100	100	100	100	100
15 μM curcumin	99	109	104 $\pm$ 5	95	98	96.5 $\pm$ 1.5



รูปที่ 34. ผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB2 (676) ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

ตารางที่ 15. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB3 (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

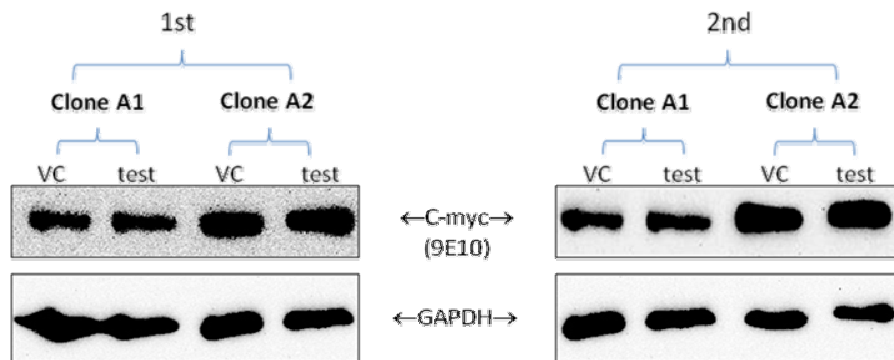
การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
Vehicle control	100	100	100	100	100	100
15 μM curcumin	99	107	103 $\pm$ 4	99	104	101.5 $\pm$ 0.5



รูปที่ 35. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB3 ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

ตารางที่ 16. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 (mean $\pm$ SD) ซึ่ง taq ด้วย c-myc ที่แทรกเข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
Vehicle control	100	100	100	100	100	100
15 μ M curcumin	100	98	99 $\pm$ 1	97	101	99 $\pm$ 2



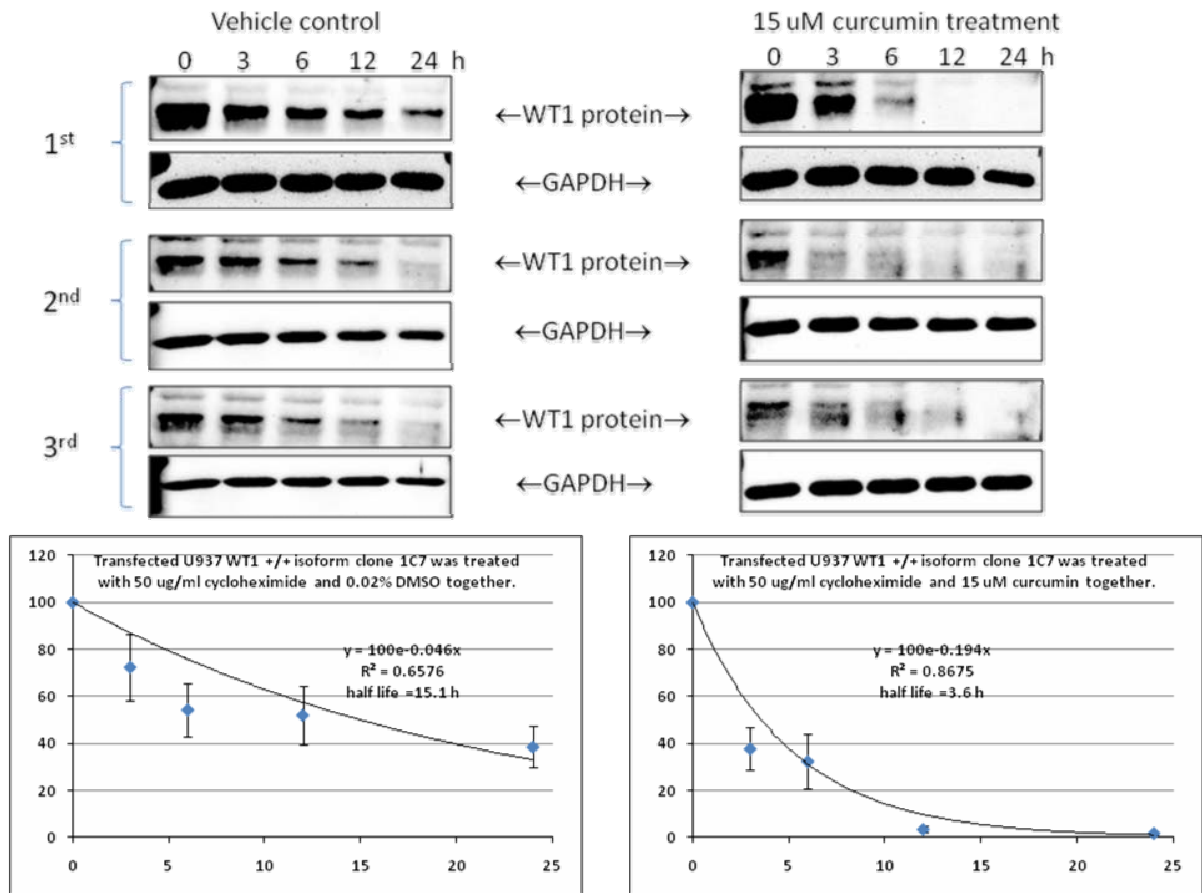
รูปที่ 36. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 ที่ต่อกับยีน c-myc ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

ผลการทดลองที่ 11 การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูวันชนิด +/- (protein stability) ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM สามารถการลดลงของโปรตีนวิล์มทูวันชนิด +/- ที่นำเข้าสู่เซลล์ U937 และการศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบอีกว่าการที่สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ได้นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดเคอร์คิวมินไปมีผลต่อการทำงานของ pCMV promoter (รูปที่ 28-36) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ที่นำเข้าสู่เซลล์ U937 โดยนำเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/- เลี้ยงร่วมกับ cycloheximide (เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง เอนไซม์ peptidyl transferase ของ 80S ใน eukaryotic ribosomes แต่ไม่ยับยั้ง 70S ในแบคทีเรีย) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัด เคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM จากการศึกษาพบว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ในเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/- มีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการทำลายโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงใน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 50 μM ร่วมกับ สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM มีค่าแตกต่างจากเซลล์ชุดควบคุม (เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะ cycloheximide ที่ความเข้มข้น 50 μM แต่ไม่มี สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM) โดยค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 15.1 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงใน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 50 μM ร่วมกับ สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM มีค่าเท่ากับ 3.6 ชั่วโมง ดังตารางที่ 17 และรูปที่ 37 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, $p < 0.05$

ตารางที่ 17 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัวหรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ในเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/-

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม (vehicle control)				ชุดการทดลอง (treatment)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
0	100	100	100	100 $\pm$ 0	100	100	100	100 $\pm$ 0
3	44	88	85	72 $\pm$ 14	21	39	53	38 $\pm$ 9
6	32	68	63	54 $\pm$ 11	9	43	45	32 $\pm$ 11
12	30	73	54	52 $\pm$ 12	3	1	6	2 $\pm$ 1
24	21	47	48	39 $\pm$ 9	1	1	3	1 $\pm$ 0.5
ค่าครึ่งชีวิต (half life) = 15.1 ชั่วโมง					ค่าครึ่งชีวิต (half life) = 3.6 ชั่วโมง			



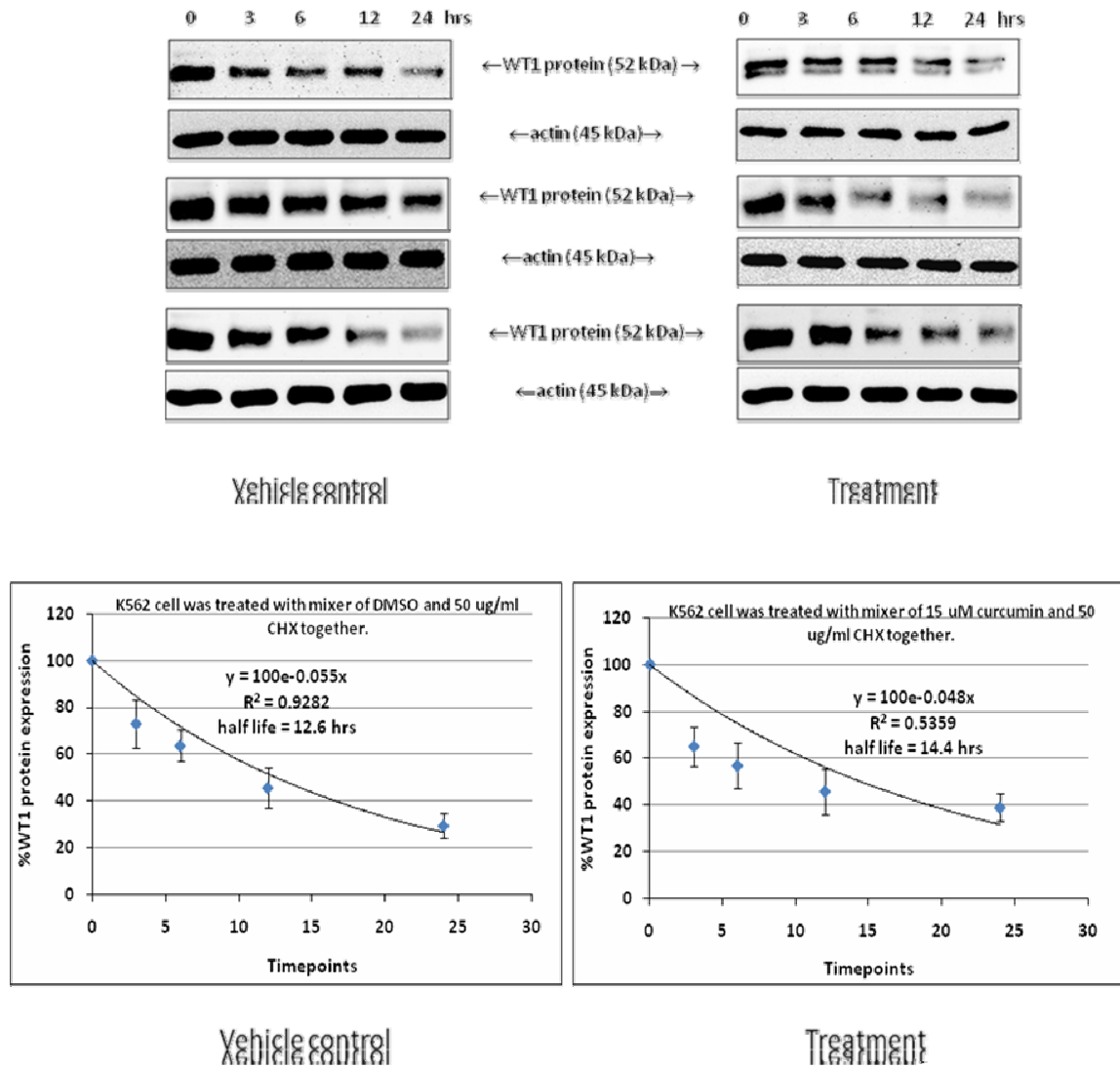
รูปที่ 37. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ร่วมกับ cyclohexamide ที่ความเข้มข้น 50 μ M ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ในเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด ++ และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot

ผลการทดลองที่ 12 การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูวัน (WT1 protein stability) ในเซลล์ K562

จากการศึกษาพบว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 โดยเลี้ยงร่วมกับ cyclohexamide ที่มีและไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ซึ่งใช้ความเข้มข้นเดียวกับที่ทำการทดลองในเซลล์ U937 จากผลการทดลองพบว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ K562 ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับสารสกัดเคอร์คิวมินมีค่าไม่แตกต่างกับเซลล์ K562 ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ K562 ที่เลี้ยงร่วมกับ cyclohexamide และไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินด้วยมีค่าเท่ากับ 12.6 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ K562 ที่เลี้ยงร่วมกับ cyclohexamide และมีสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ร่วมด้วยมีค่าเท่ากับ 14.4 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 18 รูปที่ 38 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลของ cyclohexamide โดยใช้ MG132 ซึ่งเป็น proteasome inhibitor เพื่อศึกษาการทำลายโปรตีนโดยผ่านกระบวนการของ proteasome จากการศึกษาค้นพบว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเมื่อเลี้ยงร่วมกับ MG132 ที่มีและไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์แสดงผลการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 39

ตารางที่ 18 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัวหรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิดในเซลล์ K562

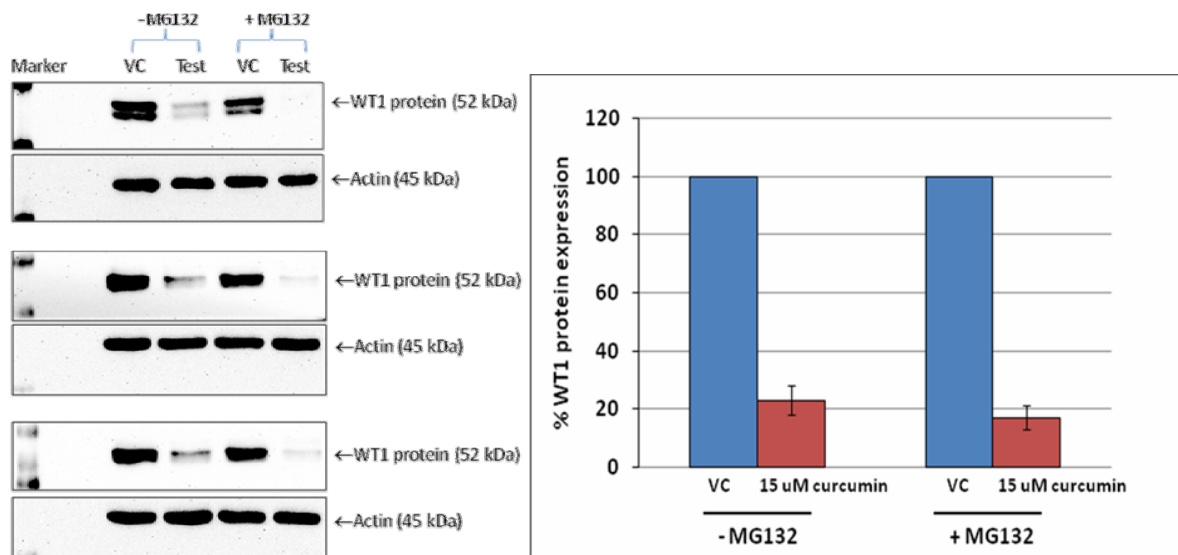
ระยะเวลา	ชุดควบคุม (vehicle control)				ชุดการทดลอง (treatment)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
0	100	100	100	100 $\pm$ 0	100	100	100	100 $\pm$ 0
3	70	62	88	73 $\pm$ 10	60	55	80	65 $\pm$ 8
6	72	46	74	64 $\pm$ 7	67	53	50	57 $\pm$ 9
12	44	64	30	46 $\pm$ 9	39	30	68	46 $\pm$ 10
24	37	39	16	30 $\pm$ 5	43	42	34	39 $\pm$ 6
ค่าครึ่งชีวิต (half life) = 12.6 ชั่วโมง					ค่าครึ่งชีวิต (half life) = 14.4 ชั่วโมง			



รูปที่ 38. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยใช้ cyclohexamide และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot

ตารางที่ 19 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อกระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway โดยใช้ MG 132 ในเซลล์ K562

การทดลอง		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	ไม่มี MG 132	100	100	100	100 $\pm$ 0
15 μ M curcumin		32	22	15	23 $\pm$ 5
ชุดควบคุม	มี MG 132	100	100	100	100 $\pm$ 0
15 μ M curcumin		24	16	10	17 $\pm$ 4



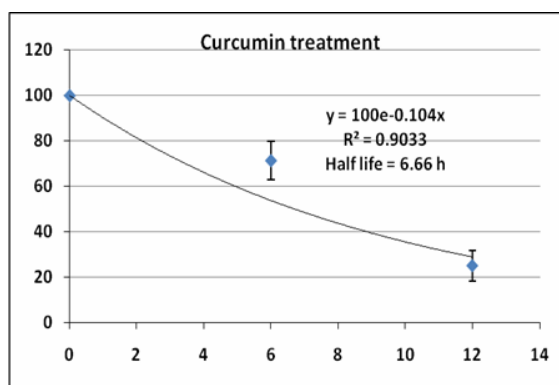
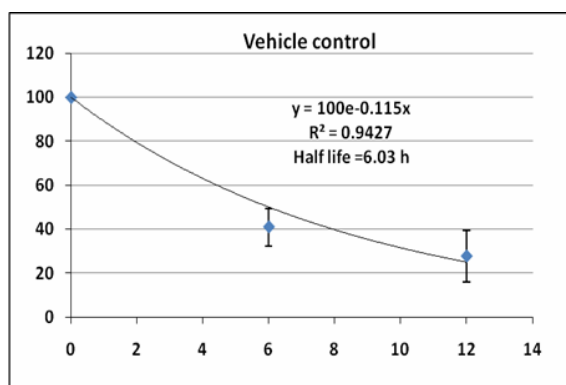
รูปที่ 39. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μ M ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ MG 132 ในเซลล์ K562 ต่อกระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน วิตามินเมอร์วัน โดยวิธี Western blot

ผลการทดลองที่ 13 การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพต่อความคงตัวของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ (WT1 mRNA stability) ในเซลล์ K562 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/- โดยวิธี real time PCR

จากผลการศึกษาพบว่า การลดลงของระดับวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ (WT1 mRNA) เมื่อถูกเลี้ยงในสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 15 μM นั้นไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพต่อความคงตัวของ WT1 mRNA พบว่าค่าครึ่งชีวิตของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอของเซลล์ K562 ในสภาวะที่มีหรือไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพพบว่าค่าครึ่งชีวิตของ WT1 mRNA มีค่าที่ไม่แตกต่างกัน โดยค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ K562 ที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพ มีค่าเท่ากับ 6.03 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ K562 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 15 μM มีค่าเท่ากับ 6.66 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 40

ตารางที่ 20 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 15 μM ต่อความคงตัวหรือค่าครึ่งชีวิตของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอชนิด +/- ในเซลล์ K562 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/-

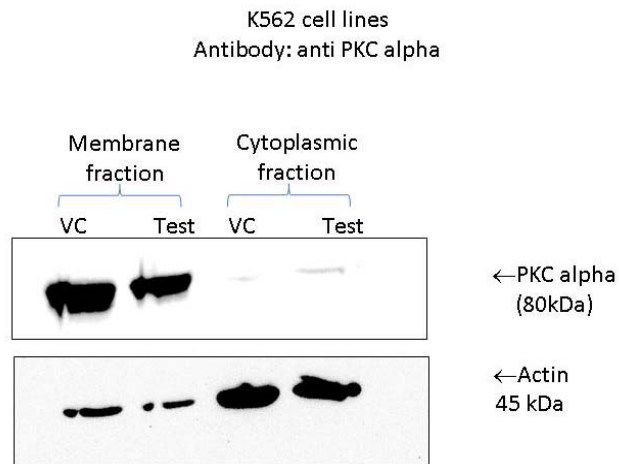
ระยะเวลา	ชุดควบคุม vehicle control				ชุดการทดลอง (treatment)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
0	100	100	100	100 $\pm$ 0	100	100	100	100
6	24	48	51	41 $\pm$ 9	55	76	83	71 $\pm$ 8
12	11	22	50	28 $\pm$ 12	12	28	35	25 $\pm$ 7
ค่าครึ่งชีวิต (half life) = 6.03 ชั่วโมง					ค่าครึ่งชีวิต (half life) = 6.66 ชั่วโมง			



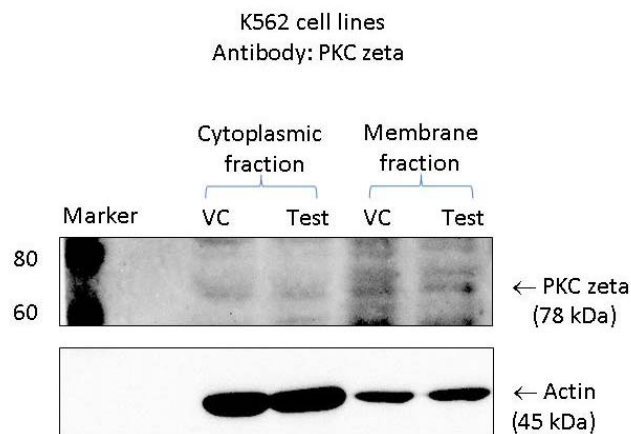
รูปที่ 40. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 15 μM ร่วมกับ actinomycin D ต่อความคงตัวของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ทำการศึกษาโดยใช้วิธี real time PCR

ผลการทดลองที่ 14 การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนไคเนส

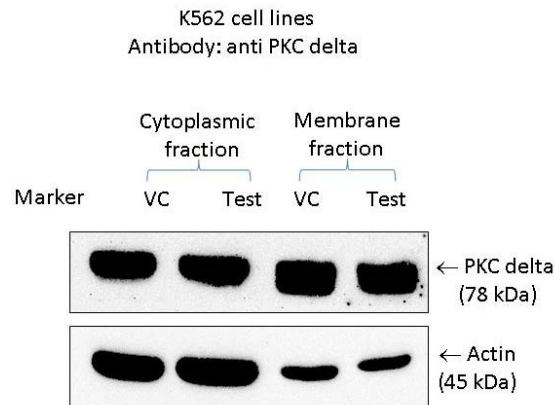
จากการศึกษาข้างต้นแสดงผลการทดลองอย่างชัดเจนว่าการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจากการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการทำลาย mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ดังนั้นกลไกของการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันน่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานเนื่องจาก การส่งสัญญาณภายในเซลล์ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ที่ส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัว ซึ่งยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ชัดเจน ในเบื้องต้นได้เคยมีผู้รายงานมาเรียบร้อยแล้วว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนไคเนสได้หลายชนิด โดยเฉพาะโปรตีนไคเนสซี (Protein kinase C; PKC) และยังมีผู้รายงานว่า โปรตีน WT1 กับ PKC น่าจะมีความเกี่ยวข้องกันหรือไม่? และอย่างไร? ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทดลองทำการศึกษาค้นคว้าผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณ (Signaling proteins) อื่นๆ โดยอาศัยวิธีการของ protein microarray จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนไคเนสชนิดแอลฟา (protein kinase C_{α}) ได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม การทดลองได้ทำการสกัดโปรตีนจากส่วนของเซลล์เมมเบรน (membrane) ซึ่งเป็นบริเวณที่มี activated protein kinase C มาสะสมอยู่บริเวณนี้ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นหรือเซลล์มีการ active และการทดลองนี้ได้ใช้ β -actin เป็นตัวปรับปริมาตร (loading control) จากการทดลองพบว่า PKC $_{\alpha}$ มีระดับการแสดงออกที่ลดลง 38% เมื่อ treat ด้วย เคอร์คิวมิน (รูปที่ 41) ส่วนการศึกษาในโปรตีนไคเนสซี ซีต้า (protein kinase C_{ζ}) และโปรตีนไคเนสซี แคลต้า (protein kinase C_{δ}) พบว่าหลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนไคเนสซีทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 42 และ 43 ตามลำดับ) และเมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ทั้งในรูปของ phosphorylated PKB form (p-Akt) และ non-phosphorylated PKB form (Akt) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ทั้งในรูปของ phosphorylated PKB (p-Akt) และ non-phosphorylated PKB form (Akt) (รูปที่ 44 และ 45) ดังนั้นจึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าโปรตีนไคเนสซี แอลฟา น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ส่วน โปรตีนไคเนสซี ซีต้า, แคลต้า, โปรตีนไคเนสบี ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์



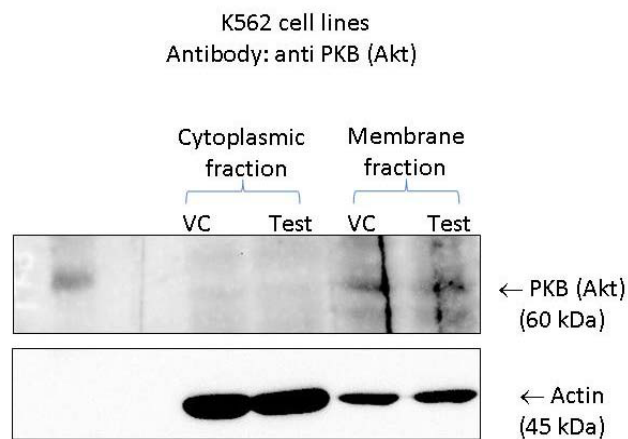
รูปที่ 41 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดแอลฟา (protein kinase C_{α}) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot



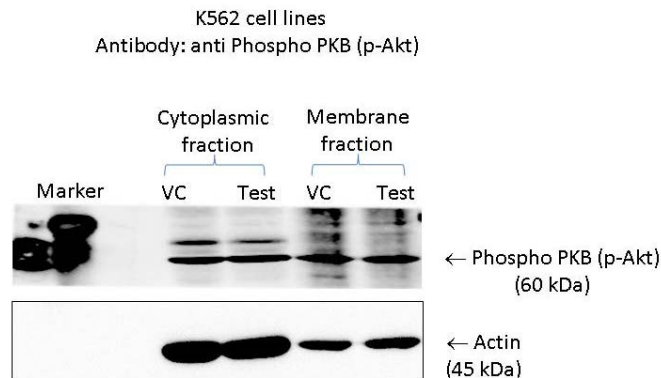
รูปที่ 42 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดซีต้า (protein kinase C_{ζ}) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot



รูปที่ 43 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดเดลต้า (protein kinase C δ) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

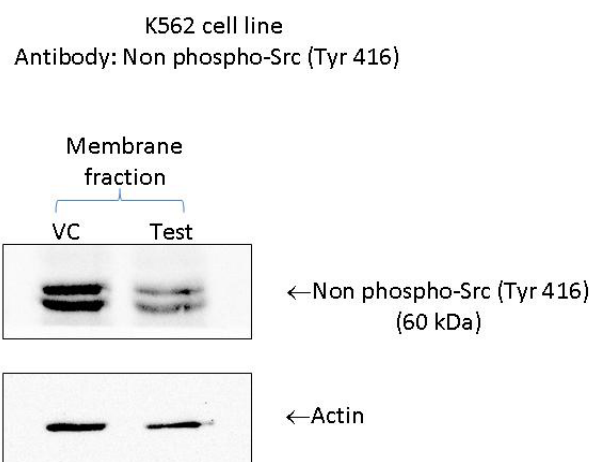


รูปที่ 44 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ชนิด non-Phosphorylated form ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

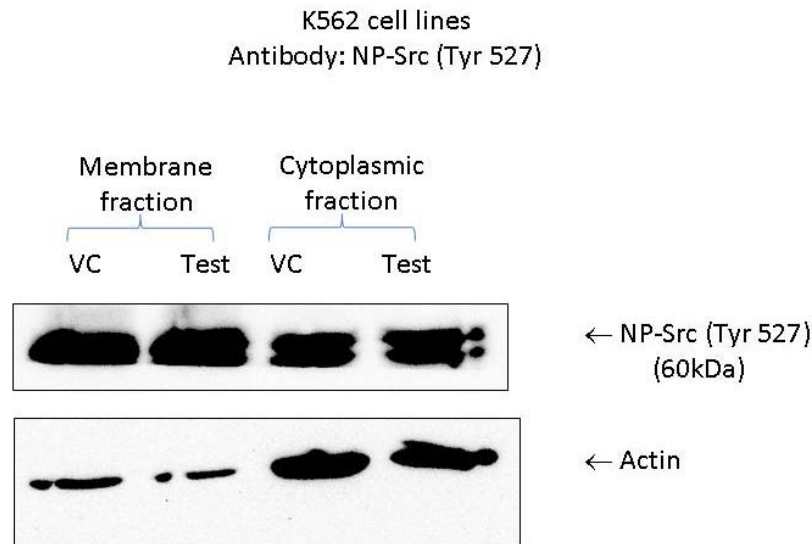


รูปที่ 45 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ชนิด Phosphorylated form ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

นอกจากโปรตีนไคเนสซีและโปรตีนไคเนสบีแล้ว ยังได้ลองทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนใน pathway อื่นๆ อีกด้วย เช่นใน pathway ของ tyrosine kinase โดยทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน Src ในรูปที่เป็น non-phosphorylated form (Tyr 416 และ 527) ผลการทดลองพบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Src ที่อยู่ในรูปของ non-Phosphorylated form (Tyr 416) ลง 23% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และปรับปริมาณด้วย β -actin (รูปที่ 46) ส่วน non-phosphorylated form (Tyr 527) นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงหลังจากการ treat ด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ (รูปที่ 47)

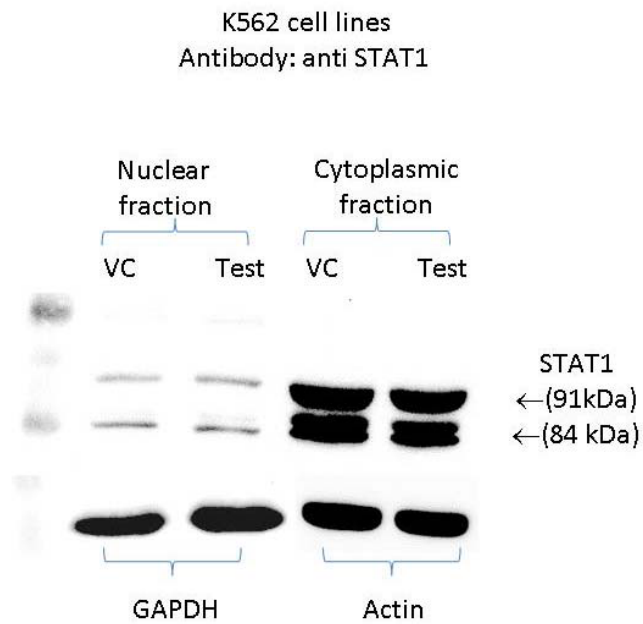


รูปที่ 46 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน Src ชนิด non-Phosphorylated form (Tyr 416) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

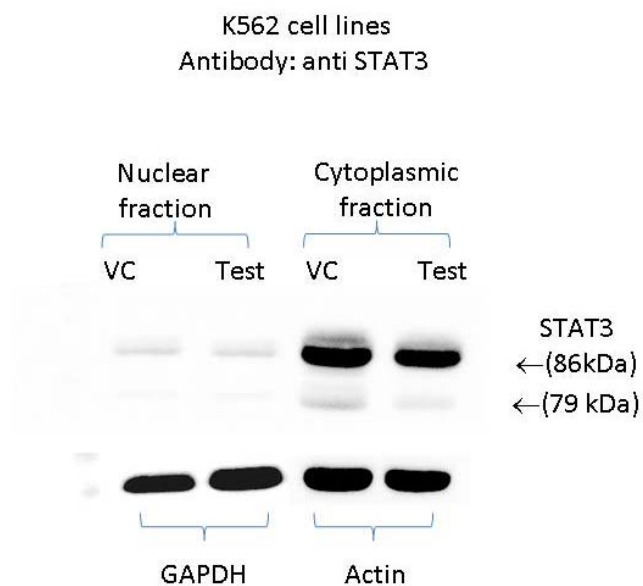


รูปที่ 47 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน Src ชนิด non-Phosphorylated form (Tyr 527) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

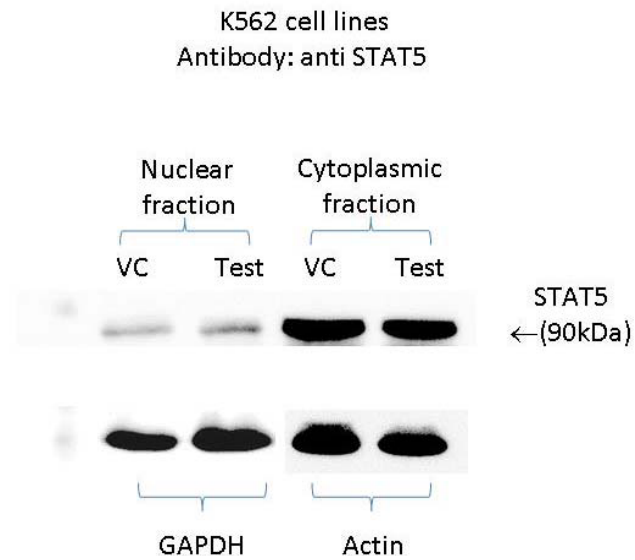
เมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อ STAT Pathway ในเซลล์ K562 พบว่า หลังจากการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ STAT 1, STAT 3, STAT 5 และ STAT 6 ซึ่งสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกในการส่งสัญญาณของโปรตีน STAT (รูปที่ 48-51)



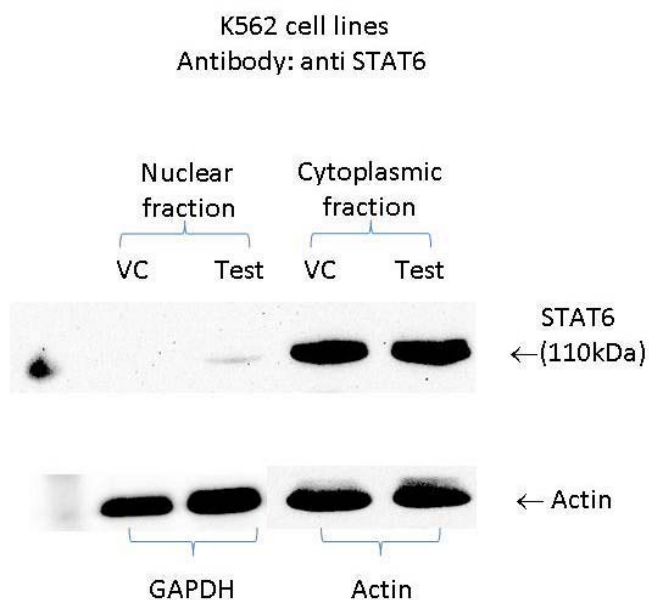
รูปที่ 48 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT 1 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot



รูปที่ 49 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT 3 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

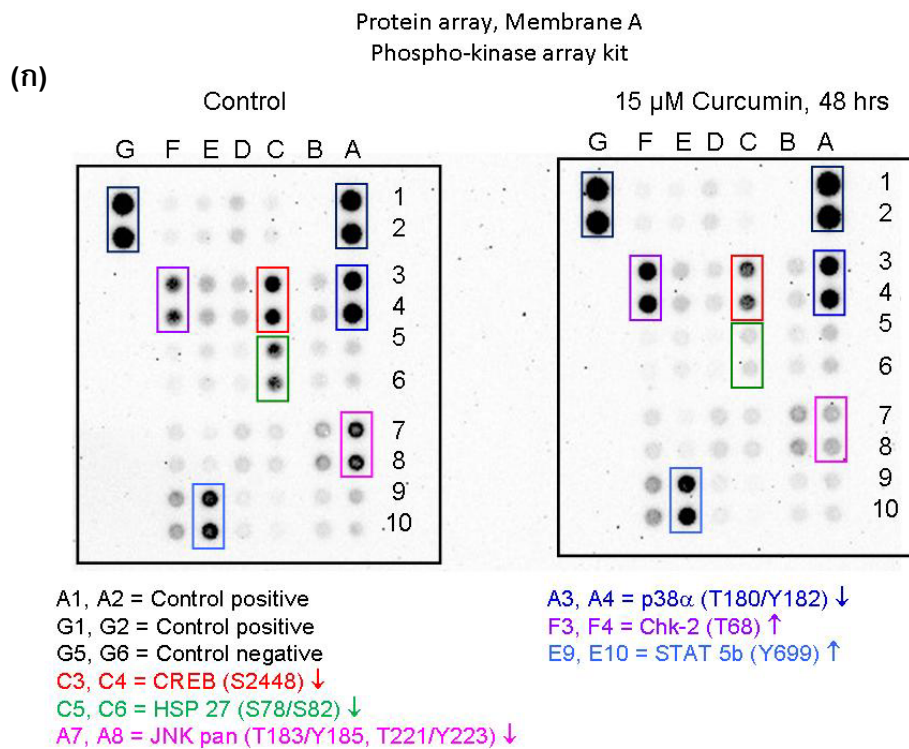


รูปที่ 50 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น $15 \mu\text{M}$ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT5 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

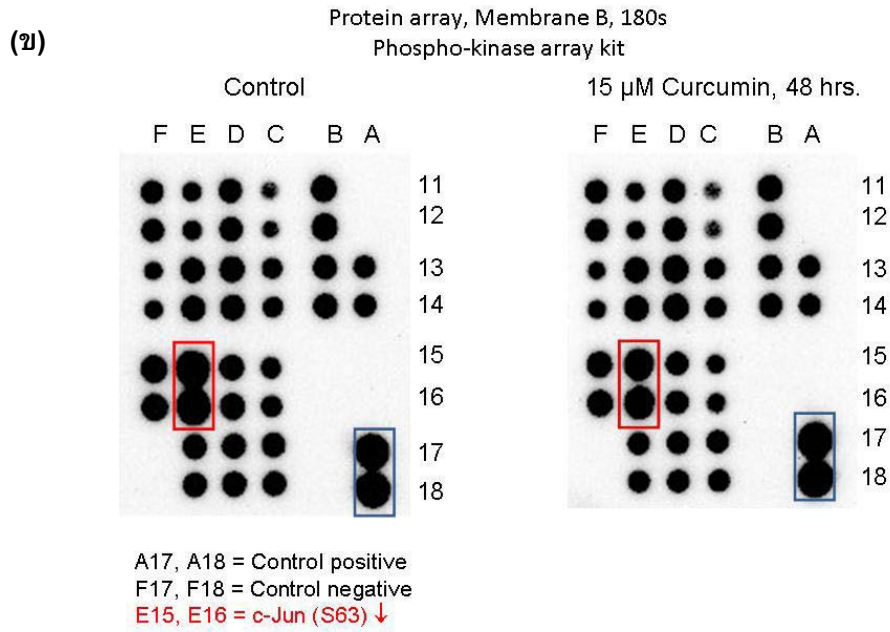


รูปที่ 51 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น $15 \mu\text{M}$ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT6 ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

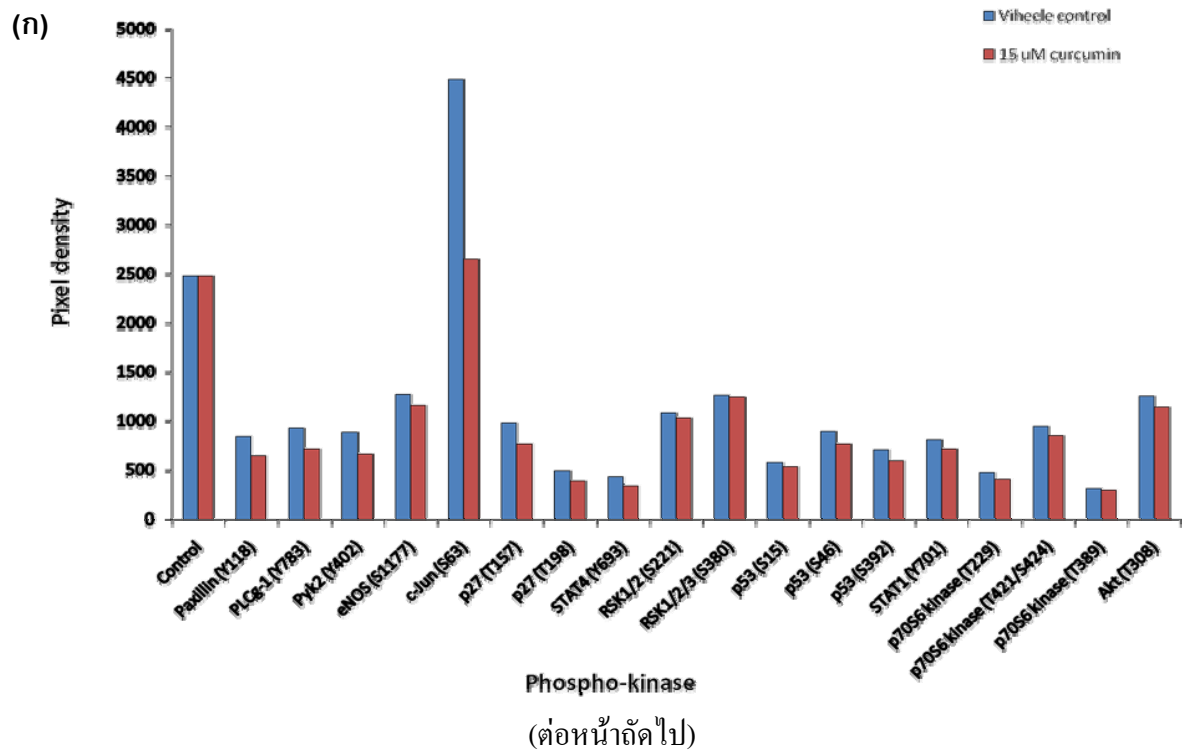
เมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อระดับการแสดงออกของ Phosphorylated protein kinases ชนิดต่างๆ โดยวิธี protein microarray ผลการทดลอง พบว่ามีโปรตีน phosphorylated kinase หลายชนิดที่ลดการแสดงออกหลังจากทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยโปรตีนที่มีปริมาณลดลงได้แก่ โปรตีน CREB (S2448), HSP27 (S78/S82), JNK pan (T183/Y185, T221/Y223), P38 α (T180/Y182) และ c-Jun (S63) ดังแสดงในรูปที่ 52 (ก และ ข) และ 53 (ก และ ข)

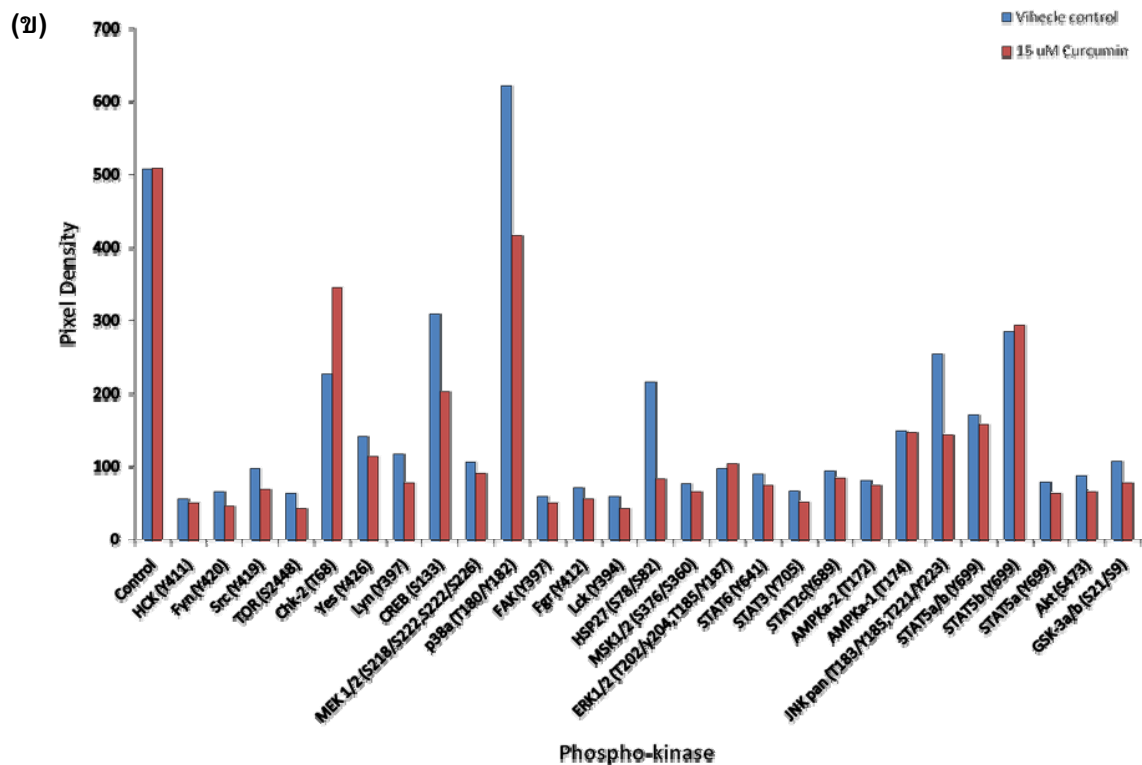


ต่อหน้าถัดไป



รูปที่ 52 Profile แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของ phosphorylated protein kinases ชนิดต่างๆ โดยวิธี protein microarray

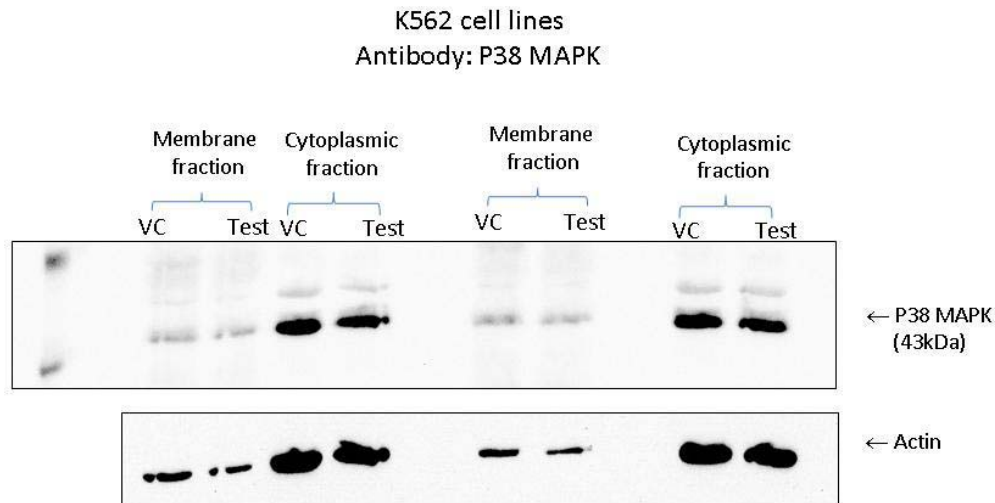




รูปที่ 53 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของ phosphorylated protein kinases ชนิดต่างๆ โดยวิธี protein microarray

จากการศึกษาด้วยวิธี protein microarray นั้นพบว่าโปรตีนที่น่าสนใจอยู่หลายตัวด้วยกัน ที่ลดลงเนื่องจากการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยในเบื้องต้นที่ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B; PKB) พบว่าไม่มีผลในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ดังนั้น CREB ซึ่งมีปริมาณที่ลดลง นั้นจึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องเนื่องจาก CREB เป็น transcription factor ตัวหนึ่งที่ส่วนใหญ่จะถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนไคเนสบี และ CREB ที่ลดลงก็ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของโปรตีน WT1 แต่อย่างใด ซึ่งการลดลงของ CREB อาจจะไปเกี่ยวข้องกับ pathway อื่นที่ไม่ใช่โปรตีนไคเนสบีก็เป็นได้ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึง pathway ของ p38 MAPK ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน WT1 ที่ถูกทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงด้วยหรือไม่ จากผลการทดลองโดย Western blot พบว่าการแสดงออกของ p38 MAPK นั้นมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เพียง 7% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และหลังจากปรับปริมาตรด้วย β -actin เรียบร้อยแล้ว (รูปที่ 54) ดังนั้น p38 MAPK นั้นไม่น่าเป็น pathway หลักที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน WT1 ซึ่งจาก

การพิจารณาจากผลการทดลองของ protein microarray ก็พบว่าการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK นั้นลดลงเพียงเล็กน้อย เหมือนกับการศึกษาด้วยวิธี Western blot



รูปที่ 54 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot

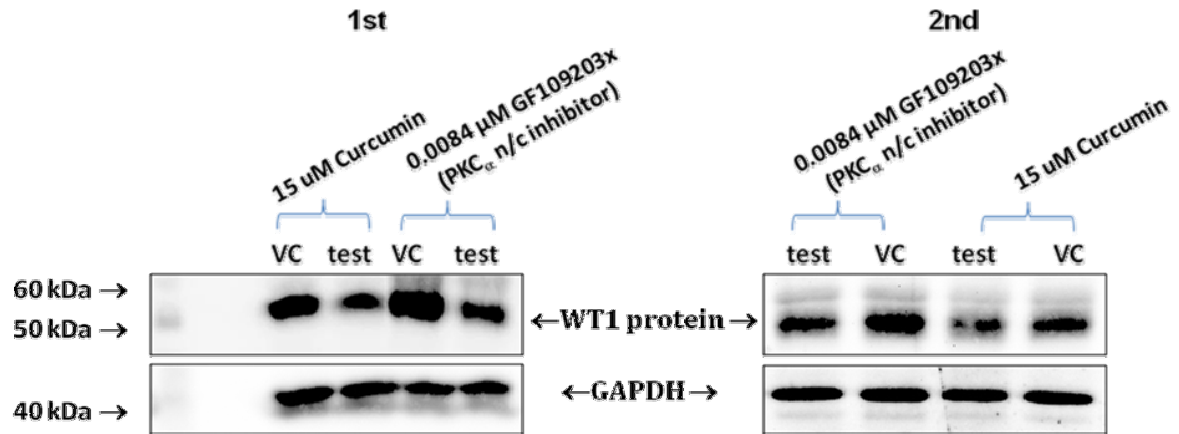
ผลการทดลองที่ 15 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ และ protein kinase $\text{C}\alpha$ inhibitor ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าโปรตีนไคเนสซี ชนิดแอลฟา น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน WT1 มากที่สุด ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยใช้ PKC inhibitor ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μM เป็นโมเดลในการศึกษา ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้เป็นความเข้มข้นที่ IC_{50} ของ $\text{PKC}\alpha$ มาทดสอบดูผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งผลการทดลองพบว่า GF109203x สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ โดยลดลงร้อยละ 16 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังทำการปรับเทียบปริมาตรด้วย GAPDH เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ โดยลดลง 36% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังทำการปรับเทียบปริมาตรด้วย GAPDH ดังแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 55

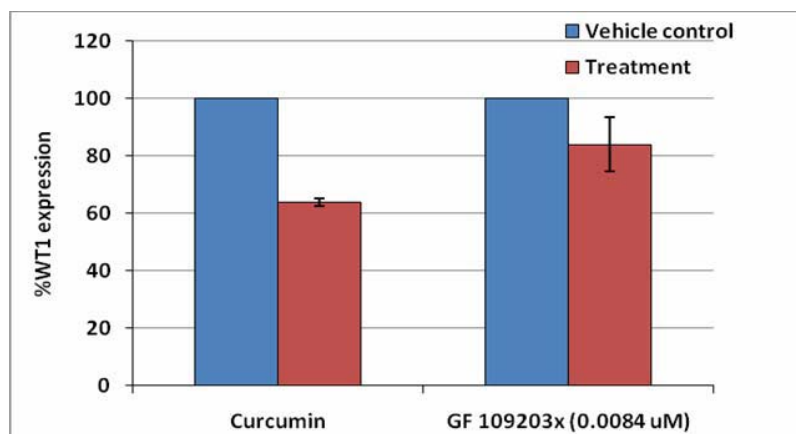
ตารางที่ 21. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM และ GF 109203x (PKC inhibitor) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μM ต่ระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562

การทดลอง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	100	100	100	100 $\pm$ 0
15 μM curcumin	62	66	64	64 $\pm$ 1.3
ชุดควบคุม	100	100	100	100 $\pm$ 0
0.0084 μM GF 109203x	70	88	77	84 $\pm$ 9.4

(ก)



(ข)



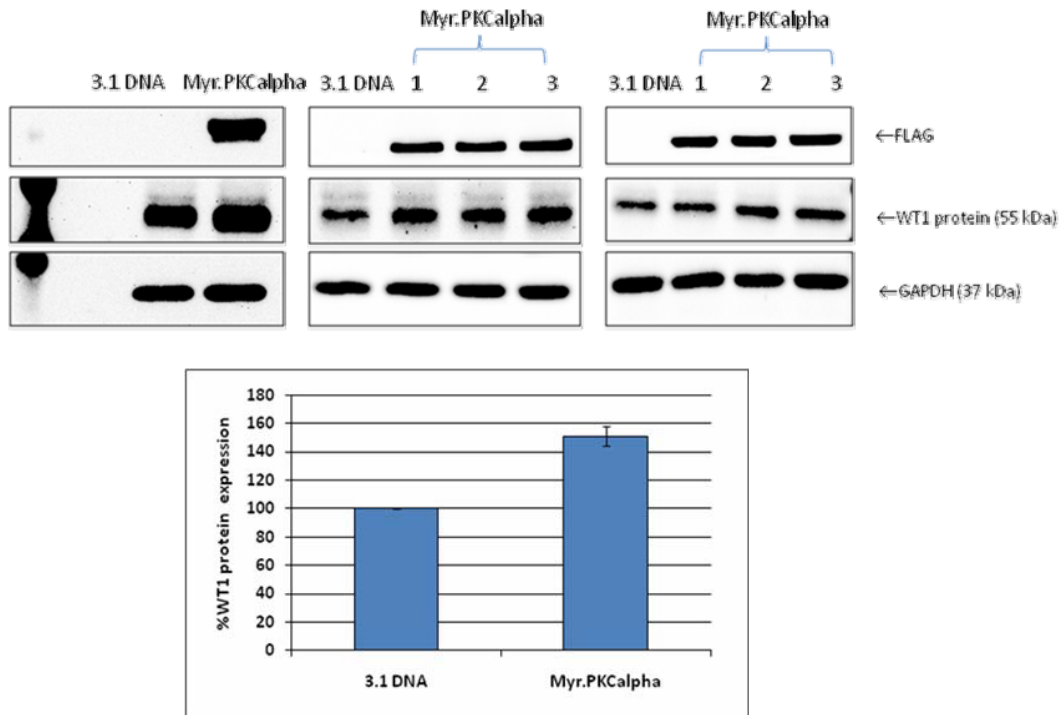
รูปที่ 55 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M และ PKC α inhibitor (GF109203x) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot (ก) แสดง Western blot analysis ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และ GAPDH ในเซลล์ K562 (ข) กราฟระดับการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 หลังปรับเทียบปริมาณด้วย GAPDH

ผลการทดลองที่ 16 การศึกษาผลของพีเคซีแอลฟา ($\text{PKC}\alpha$) ในรูปของที่ถูกกระตุ้น (active form) ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยการนำเวกเตอร์ที่ถูกตัดต่อด้วยยีนพีเคซีแอลฟา เข้าสู่เซลล์ K562

เป็นการศึกษาผลของพีเคซีแอลฟาที่อยู่ในรูปที่ถูกกระตุ้น (Myr. $\text{PKC}\alpha$) ต่อการการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งเป็นการศึกษาในสถานะที่เป็น *in vitro* โดยการนำเวกเตอร์ที่ถูกตัดต่อด้วยยีนพีเคซีแอลฟา และถูก taq ด้วย FLAG จากบริษัท Addgene นำเข้าสู่เซลล์ K562 จากผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเพิ่มขึ้นเมื่อมีการแสดงออกของพีเคซีแอลฟา ในรูปที่ถูกกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น โดยมีการแสดงออกของ โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเพิ่มเป็น 1.51 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 22 และรูปที่ 56 เมื่อเปรียบเทียบกับกับเซลล์ควบคุม (เซลล์ K562 ที่ถูกนำเข้าสู่ด้วย 3.1 DNA) ดังนั้นในการศึกษานี้เป็นการสนับสนุนผลการศึกษาของ PKC inhibitor ต่อการระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเกี่ยวข้องกับการทำงานของพีเคซีแอลฟา

ตารางที่ 22 แสดงระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ที่ถูก transfect ด้วย Myr. $\text{PKC}\alpha$ taq FLAG vector

การทดลอง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
3.1 DNA	100	100	100	100 $\pm$ 0
Myr.PKCalpha taq FLAG	148	164	141	151 $\pm$ 12



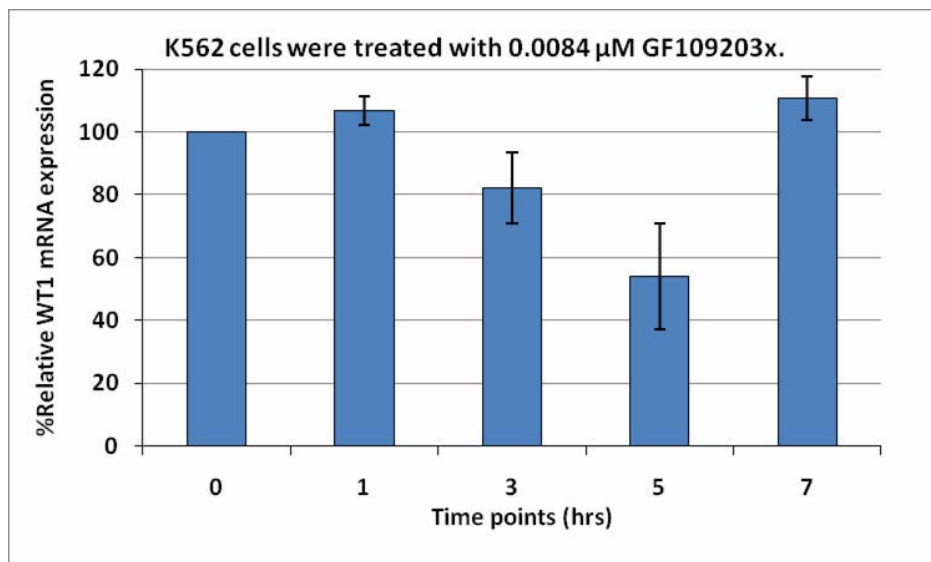
รูปที่ 56 ผลของพีเคซีแอลฟา (PKC_{α}) ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ที่ถูก transfect ด้วย Myr. PKC_{α} plasmid โดยวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันด้วยวิธี Western blot

ผลการทดลองที่ 17 ผลของ protein kinase inhibitor ที่ระยะเวลาที่ต่างกันต่อระดับการแสดงออกของ ยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี real time PCR

การศึกษาความสัมพันธ์ของ PKC_{α} ใน PKC pathway ต่อระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอใน เซลล์ K562 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ K562 ในอาหารเลี้ยงที่มี 0.0084 μ M (เป็นค่า IC_{50} ของ PKC_{α}) ของ GF109203x (PKC inhibitor) โดยทดสอบเป็นระยะเวลานาน 0, 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด อาร์เอ็นเอ แล้วตรวจระดับวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยวิธี real time PCR จากการทดลองพบว่าเมื่อทำ การยับยั้งการทำงานของ PKC_{α} โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.0084 ของ GF109203x เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอมีระดับที่ลดลงในชั่วโมงที่ 3 และ 5 ซึ่งมีค่า เท่ากับ 82 ± 11 และ 54 ± 17 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 23 และรูปที่ 57

ตารางที่ 23 ผลของ GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μM (IC_{50} ของ PKC_{α}) ต่อระดับการแสดงออกของยีน วิลล์ทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ในช่วงระยะเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
0	100	100	100 $\pm$ 0
1	110	104	107 $\pm$ 5
3	74	90	82 $\pm$ 11
5	42	66	54 $\pm$ 17
7	106	116	111 $\pm$ 7



รูปที่ 57 ผลของ GF109203x (PKC inhibitor) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μM (IC_{50} ของ PKC_{α}) ต่อระดับวิลล์ทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ K562 ในช่วงระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง ทำการทดลองโดยวิธี real time PCR

วิจารณ์ผลการทดลอง

ยีนวิลมทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1 gene* หรือ *WT1*) เป็นยีนที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1899 โดย Max Wilms ซึ่งในช่วงแรกได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งของไตในเด็กที่เรียกว่า Wilms' tumor หรือ nephroblastoma ต่อมา Call และคณะ (6) รวมทั้ง Gessler และคณะ (53) ได้ทำการศึกษาและพบว่า ยีนวิลมทูเมอร์วันนั้นมีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 และมีความยาวประมาณ 50 kb ซึ่งยีนนี้ประกอบไปด้วยส่วน exon ทั้งหมด 10 exons เมื่อเกิดกระบวนการ transcription จะได้ mRNA ที่มีขนาดประมาณ 3 kb และเมื่อมีการแปลรหัส (translation) จะได้โปรตีนที่เรียกว่าวิลมทูเมอร์วัน (Wilms' tumor 1 protein; WT1 protein) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 48 ถึง 55 kDa ขึ้นอยู่กับกระบวนการตัดแต่งของอาร์เอ็นเอที่เรียกชื่อว่า RNA alternative splicing (24, 25, 54, 55), RNA editing (56) และ translation initiation (57) ที่เกิดขึ้น ซึ่งจากกระบวนการเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดความหลากหลายในส่วนของ exon ที่ 5 ซึ่งเป็นส่วนที่ถอดรหัสให้ได้กรดอะมิโน 17 ตัว (± 17 amino acids) และกรดอะมิโน 3 ตัวได้แก่ lysine, threonine และ serine ($\pm$ KTS) ตรงบริเวณ exon ที่ 9 ระหว่าง zinc fingers ที่ 3 และ 4 (รูปที่ 3) จากกระบวนการตัดแต่งข้างต้นส่งผลให้ได้โปรตีนทั้งหมด 4 ชนิด (isoforms) ด้วยกัน ได้แก่ โปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ที่มีกรดอะมิโนครบทั้งหมดเป็น WT1(+/+) isoform หรือ wild type, วิลมทูเมอร์วัน ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 3 ตัว (KTS) เป็น WT1 (+/-) isoform, วิลมทูเมอร์วัน ที่ไม่มีกรดอะมิโน 17 ตัว เป็น WT1 (-/+) isoform และ วิลมทูเมอร์วัน ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้ง 17 ตัวและ KTS เป็น WT1 (-/-) isoform จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ด้วยวิธี Western blot จะพบแถบของโปรตีน 2 แถบด้วยกัน แถบด้านบนจะเป็นแถบของ WT1 (+/+) และ WT1 (+/-) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 ถึง 55 kDa ส่วนแถบล่างเป็นแถบของ WT1 (-/+) และ WT1 (-/-) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 ถึง 49 kDa ในระยะแรกของการศึกษายีนวิลมทูเมอร์วันโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้มีลักษณะเป็น tumor suppressor เหมือนกับมะเร็งชนิดอื่นๆ (7, 8) แต่เมื่อทำการศึกษาลึกขึ้น พบว่าโปรตีนวิลมทูเมอร์วันในมะเร็งเม็ดเลือดขาว รวมทั้งในเซลล์ตัวอ่อนของเม็ดเลือดขาวและแดง มีลักษณะเป็น ซึ่งโดยปกติแล้ว tumor suppressor ที่พบในเซลล์มะเร็ง มักพบว่าเกิดการกลายพันธุ์แล้วไม่สามารถควบคุมการเจริญของเซลล์ได้ ทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด แต่ลักษณะดังกล่าวไม่ได้พบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแต่อย่างใด ดังนั้นในเซลล์เม็ดเลือด โปรตีนวิลมทูเมอร์วันจึงทำหน้าที่เป็น transcription factor ตัวหนึ่งที่มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งตัวในทั้งเซลล์ตัวอ่อนและมะเร็งเม็ดเลือดขาว (9) การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ทำให้ทราบว่าเซลล์มีการพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งแล้ว เพราะโดยปกติ หลังจากที่เซลล์เม็ดเลือดมีการพัฒนาการเป็นเซลล์ตัวแก่แล้ว โปรตีนวิลมทูเมอร์วันจะมีปริมาณน้อยลง จนแทบไม่พบการแสดงออกเลย นอกจากนี้โปรตีนวิลมทูเมอร์วันในมะเร็ง

เม็ดเลือดขาวยังพบว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ (biological marker) และใช้ศึกษาการดำเนินของโรคได้อีกด้วย

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้เริ่มมีการศึกษาสารสัณฐานวิทยา เพื่อนำมาใช้เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ดยอนุชปรีดาและคณะ (46, 47, 74) ได้รายงานว่าการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน สามารถลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของการศึกษาและการศึกษาในเชิงลึกยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ผลการศึกษามีความชัดเจนมากขึ้น โดยการศึกษาเริ่มต้นเป็นการศึกษาถึงไอโซฟอร์ม (isoforms) ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่ถูกยับยั้งโดยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ จากการทดลองใช้สารสัณฐานวิทยาเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในเซลล์ U937 ที่ทำการ transfect ยีนวิล์มทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม เนื่องจากเซลล์ U937 มีโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่แสดงออกที่ค่อนข้างน้อย ทำให้สามารถศึกษาผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ง่ายมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถศึกษาถึงระดับการกระตุ้นของยีนโปรโมเตอร์ของยีนวิล์มทูเมอร์วันได้ เนื่องจากเวกเตอร์ของยีนวิล์มทูเมอร์วันที่นำมาใช้มีโปรโมเตอร์ที่เป็น pCMV ซึ่งสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้โดย pCMV เอง จากการศึกษาผลของสารสัณฐานวิทยาเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม พบว่าสามารถลดการแสดงออกได้ทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกลไกของสารสัณฐานวิทยาเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ที่ถูกนำเข้าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 นั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการลดของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 จากการทดสอบด้วยสารสัณฐานวิทยาเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ อาจกลไกของการทำลายโปรตีน โดยการศึกษาได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับความคงตัวหรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ หลังการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ผลการทดลองพบว่าสารสัณฐานวิทยาเคอร์คิวมินบริสุทธิ์มีผลต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ โดยทำให้ค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ลดลงประมาณ 4 เท่าเมื่อเทียบกับค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ที่ไม่ได้ถูกทดสอบร่วมกับสารสัณฐานวิทยาเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด ++ ที่สร้างมาจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 นั้นมีกระบวนการปรับแต่งโปรตีนหลังจากการสร้างซึ่งเรียกว่า post translation modification เช่นการเติมหมู่ functional group เพื่อให้โปรตีนเหล่านั้นสามารถทำงานได้ อาทิเช่น acetate, phosphate, lipid และ carbohydrate นอกจากนี้ยังมีกระบวนการการม้วนพับ (folding) ของสายอะมิโนเพื่อให้ได้โปรตีนที่สมบูรณ์และรูปร่างที่เหมาะสมที่สามารถทำงานได้ ดังนั้นที่สร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 อาจเกิดไม่สมบูรณ์แบบเนื่องจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 มีการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในระดับที่น้อยมาก แต่เมื่อถูก transfect ด้วย pcDNA 3.1(+) ซึ่งมี pCMV promoter อยู่ ถูกแทรกด้วยยีนวิล์มทูเมอร์วันชนิดต่างๆ ทำให้มี

การสร้างทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมากกว่าเดิมหลายเท่าจึงอาจทำให้กระบวนการเกิดปรับแต่งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันดังกล่าวอายุที่สั้นลงและเมื่ออยู่ในสภาวะที่สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ซึ่งอาจจะเป็นภาวะกดดัน (stress) สำหรับการเกิดกระบวนการของการปรับแต่งโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันหลังจากการจากการสร้างโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตามกลไกที่ชัดเจนยังจะต้องทำการศึกษาระดับของการ post translation modification ต่อไป

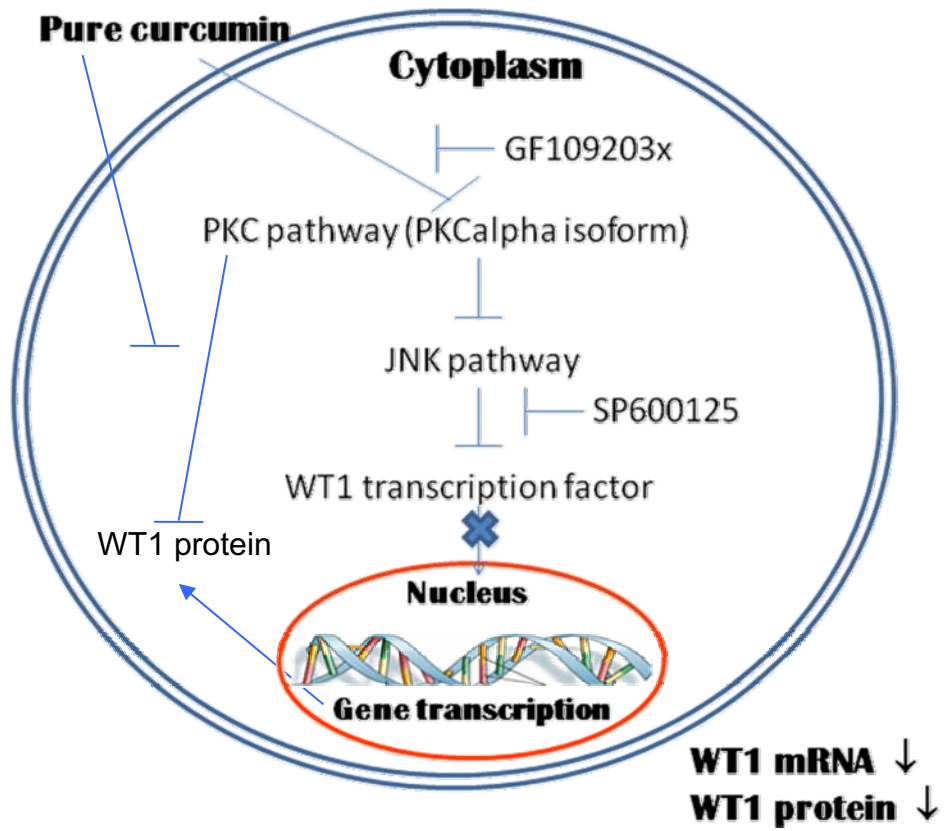
การศึกษาถึงกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยโปรโมเตอร์ของยีนวิล์มทูเมอร์วันหรือที่เรียกว่า เอนโดจีนัสวิล์มทูเมอร์วัน (endogenous Wilms' tumor 1) โดยอนุชปรีดาและคณะ (46, 47, 74) ได้ทำการศึกษาและรายงานว่สารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด K562 ได้ แต่ยังไม่ได้ทำการศึกษาถึงกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมิน-บริสุทธิ์ว่ามีผลต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์อย่างไรจึงทำให้มีการลดลงระดับการแสดงออกทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษากลไกในระดับอนุชีวโมเลกุลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยการศึกษาเริ่มต้น ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่มีผลต่อโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยตรงหรือมีผลโดยเข้าไปเกี่ยวข้องกับโปรตีนหรือปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์แล้วส่งผลให้การแสดงออกของทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันลดลง ทำให้มีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวลดลงไปด้วย ในการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยตรงนั้นทำการศึกษโดยการวัดระดับความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยการเลี้ยงในสาร cycloheximide ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนใหม่ ดังนั้นเราสามารถวัดระดับความคงตัวของโปรตีนโดยคำนวณค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน แล้วทำการเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้ถูกเลี้ยงในสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M โดยจากการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายโปรตีนโดยทั้งนี้เนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ มีค่าเท่ากับ 14.4 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างจากที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ คือ 12.6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลของ cycloheximide โดยการใช้สาร MG132 ซึ่งทำหน้าที่เป็น proteasome inhibitor พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ยังคงสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ แสดงให้เห็นว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์นั้นไม่เกี่ยวข้องและไม่ต้องอาศัยกระบวนการการทำงานของ proteasome pathway ดังนั้นสามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยสารสกัดเคอร์คิว-

มินิบริสุทธีไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการทำลายโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งผลการทดลองมีความแตกต่างจากผลการทดลองในเซลล์ U937 ที่เป็นเอ็กโซจีนวิล์มทูเมอร์วัน ของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ไอโซฟอร์ม ++ ที่พบว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ จะถูกทำลายโดยกระบวนการทำลายภายในเซลล์เอง อาจจะเนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของกระบวนการหลังสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ U937 เอง

ในการศึกษากลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธี ต่อการลดลงของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยใช้ actinomycin D ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอใหม่ การทดลองเห็นอย่างชัดเจนว่าการลดลงของระดับวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยสารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธีนั้น ไม่เกี่ยวข้องกับการทำลายหรือความคงตัวของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยค่าครึ่งชีวิตของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธีไม่แตกต่างกับค่าครึ่งชีวิตที่ไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธี ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.66 และ 6.03 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นการลดลงของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 สรุปได้ว่าไม่เกี่ยวข้องกับการทำลายหรือความคงตัวของเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน

จากการศึกษาข้างต้นที่พบว่า การลดลงของทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ไม่เกี่ยวข้องกับการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยตรง จึงได้ทำการศึกษาต่อไปว่า สารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธีมีผลต่อการกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์หรือไม่ อย่างไร จากการศึกษาได้เคยมีรายงานความสัมพันธ์ของเคอร์คิวมินอยด์กับกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์มาก่อนแล้ว พบว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส (protein kinase) ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ protein kinase C (PKC), protein kinase A (PKA) หรือ protein p38 MAPK (75,76) จึงเป็นไปได้ว่า protein kinase ชนิดใดชนิดหนึ่งน่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวก็เป็นได้ ดังนั้นการศึกษานี้ ได้ทำการทดลองผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ในระดับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signal transduction pathway) โดยใช้วิธีการตรวจสอบเบื้องต้นแบบ protein microarray (protein assay kit) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธีสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนในรูปของ phosphorylation ของ JNK pan (T183/Y185, T221/Y223), c-Jun (S63), CREB (S2448), HSP27 (S78/S82), และ P38 α (T180/Y182) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดเคอร์คิวมินิบริสุทธียังสามารถลดการแสดงออกของ active PKC α ได้ด้วย โดยวิธี Western blot หลังจากนั้นทำการยืนยันผลดังกล่าวโดยการใช้ GF109203x ซึ่งเป็น selective PKC inhibitor ที่ความเข้มข้นที่ 0.0084 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ค่า IC₅₀ ของ PKC α และใช้ SP600125 ซึ่งเป็น JNK inhibitor ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 หลังจากนั้นทำการวัดระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในรูปของ phosphorylation form ผลการทดลองพบว่า GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M (IC₅₀ ของ PKC α inhibitor) พบว่าในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงของการทดสอบ GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M

กับเซลล์ K562 สามารถลดการแสดงออกของยีนวิลัมทูเมอร์วัน ได้ 17% และในช่วงเวลาที่ 5 ชั่วโมง สามารถลดการแสดงออกของยีนวิลัมทูเมอร์วัน ได้มากที่สุดถึง 46% และจากการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของ phosphorylation kinase โดย protein array kit พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดการแสดงออกของ phosphorylation JNK pan (T183/Y185, T221/Y223) และ c-Jun (S63) ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของ JNK inhibitor ที่ความเข้มข้น 0.040 μM (ค่า IC_{50}) ทำการทดสอบกับเซลล์ K562 และวัดระดับการแสดงออกของยีนวิลัมทูเมอร์วันพบว่าช่วงเวลาที่ 5 สามารถลดการแสดงออกของยีนวิลัมทูเมอร์วันได้ 37% ดังนั้นจากผลการศึกษาของ PKC inhibitor และ JNK inhibitor ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิลัมทูเมอร์วัน ที่สอดคล้องกับสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิลัมทูเมอร์วัน ดังนั้นกลไกในการยับยั้งของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดลงของโปรตีนวิลัมทูเมอร์วัน น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ PKC และ JNK ซึ่งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่มี PKC เข้ามาเกี่ยวข้อง จะเป็นการส่งสัญญาณในระดับตอนบน (upstream) ของโปรตีน JNK โดยกลไกการยับยั้งที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจาก $\text{PKC}\alpha$ isoform ถูกยับยั้งการเติม ฟอสเฟต ให้กับโปรตีน JNK ทำให้การแสดงออกของยีนและโปรตีนวิลัมทูเมอร์วันลดลง ดังนั้น JNK น่าจะเป็นโปรตีนกระตุ้นต่อจาก PKC ที่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิลัมทูเมอร์วัน ดังนั้นจากการผลศึกษานี้สามารถสรุปกลไกการยับยั้งโดยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดการแสดงออกของทั้งยีนและโปรตีนวิลัมทูเมอร์วัน น่าจะเกิดจากสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ไปยับยั้งการแสดงออกของ $\text{PKC}\alpha$ ทำให้ $\text{PKC}\alpha$ ไม่สามารถทำหน้าที่เติมฟอสเฟตให้กับโปรตีน JNK ได้ ทำให้ JNK ไม่ทำงาน ทำให้ไม่สามารถเติมฟอสเฟตให้กับโปรตีนวิลัมทูเมอร์วันได้ ทำให้โปรตีนวิลัมทูเมอร์วันซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ไม่สามารถไปจับกับโปรโมเตอร์ของยีนวิลัมทูเมอร์วันได้ ส่งผลทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนวิลัมทูเมอร์วันได้ เป็นผลทำให้ไม่การสร้าง mRNA (transcription) และการสังเคราะห์โปรตีน (translation) ทำให้มีการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิลัมทูเมอร์วัน ซึ่งกลไกในการยับยั้งโดยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 58



รูปที่ 58 แสดงกลไกที่เกี่ยวข้องของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิลมทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการศึกษากลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์จากขมิ้นชันต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สารสกัดเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด exogenous ของวิล์มทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม โดยการตัดต่อเข้าไปใน pcDNA 3.1(+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 สารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ได้ดีที่สุด โดยผ่านกลไกการทำลายโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เนื่องจากการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 นั้น อาจสร้างได้ไม่สมบูรณ์เพราะเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 โดยปกติมีการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในระดับต่ำมาก เมื่อถูกกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนดังกล่าวมากขึ้นอาจทำให้กระบวนการที่เรียกว่า post translation modification ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่เพิ่มมากขึ้นไม่ปกติ ซึ่งการเติมฟอสเฟตให้กับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันหลังการสร้างโปรตีน น่าจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันไม่เสถียร เนื่องจากโปรตีนโคเนสซิถูกยับยั้งการทำงานโดยเคอร์คิวมิน

2. การศึกษากลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด endogenous ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยกลไกที่สำคัญคือสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ลดการทำงานของ PKC α ซึ่งอยู่ใน PKC signaling pathway โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ PKC α inhibitor (GF109203x ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M) ต่อการแสดงออกยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน คือเมื่อยับยั้งการทำงานของ PKC α ทำให้ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันด้วย นอกจากนี้ยังศึกษาต่อเนื่องในลำดับถัดไป (downstream) ของ PKC pathway พบว่าโปรตีน JNK เป็นโปรตีนอีกตัวที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากผลการศึกษาของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อโปรตีน phospho kinase โดยใช้ชุดตรวจสอบ phospho kinase array kit พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของ phosphorylation JNK pan (T183/Y185, T221/Y223) ได้ และเมื่อใช้ JNK inhibitor (SP600125 ที่ความเข้มข้น 0.040 μ M) ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการศึกษาของสารสกัดเคอร์คิวมิน คือสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ ดังนั้นกลไกที่สำคัญของที่เกี่ยวข้องในการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยสารสกัดเคอร์คิวมิน คือผ่านกลไกการส่งสัญญาณของ PKC ซึ่งเป็นการส่งสัญญาณทางด้านบน และส่งผ่านมาทางโปรตีน JNK และโปรตีน JNK น่าจะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งความสำคัญของกลไกความรู้พื้นฐานที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เพื่ออธิบายกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ในการนำไปใช้ประโยชน์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคตต่อไปได้

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-mutagenecity 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. <http://www.thailabonline.com/sec7castat.htm>
23. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD: A tumor suppressor and oncogene: the *WT1* story. *Leukemia*. 21:868-876. 2007
24. 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 U S A*. 88:9618-9622. 1991.
25. Laity JH, Chung J, Dyson HJ, Wright PE: Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry*. 39:5341-5348. 2000.
26. Sugiyama H: Wilms tumor gene (*WT1*) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Leuk Lymphoma*. 30:55-61. 1998.
27. Sugiyama H: [Genetic diagnosis of leukemia: diagnosis of relapse and complete remission, and prediction of leukemia onset]. *Rinsho Byori*. 48:155-161. 2000.
28. Sugiyama H: Wilms tumor gene *WT1* as a tumor marker for leukemic blast cells and its role in leukemogenesis. *Methods Mol Med*. 68:223-237. 2002.

29. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A, Pastan I, Wittig S, Pfaffendorf N, Voigt A, Zintl F, Gruhn B: Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 12:2434-2441. 2006.
30. Svedberg H, Chylicki K, Gullberg U: Downregulation of Wilms' tumor gene (*WT1*) is not a prerequisite for erythroid or megakaryocytic differentiation of the leukemic cell line K562. *Exp Hematol.* 27:1057-1062. 1999.
31. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H: Wilms' tumor gene (*WT1*) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 91:2969-2976. 1998.
32. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ: A *WT1* antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene.* 12:1005-1014. 1996.
33. Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T: Growth inhibition of human leukemic cells by *WT1* (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of *WT1* in leukemogenesis. *Blood.* 87:2878-2884. 1996.
34. Miwa H, Beran M, Saunders GF: Expression of the Wilms' tumor gene (*WT1*) in human leukemias. *Leukemia.* 6:405-409. 1992.
35. Fu J, Wang L, Wang W, Chen Z: [Expression of the Wilms' Tumor Gene *WT1* and Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 8:211-215. 2000.
36. Smith SI, Weil D, Johnson GR, Boyd AW, Li CL: Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, *WT1*, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood.* 91:764-773. 1998.
37. Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E: Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol.* 83:745-750. 2004.
38. Im HJ, Kong G, Lee H: Expression of Wilms tumor gene (*WT1*) in children with acute leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 16:109-118. 1999.

39. Wu X, Wang Y, Pei X: [Expression of Wilms' tumor gene (*WT1*) in leukemias and its clinical implication]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 19:16-19. 1998.
40. Wu X, Wang Y, Pei X: [Expression of *WT1* gene in leukemia and its significance]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 19:46-48. 1998.
41. Yokota S, Okamoto T: [The minimal residual disease (MRD) in hematological malignancies]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 28:762-768. 2001.
42. Liu Yin JA: Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 15:119-135. 2002.
43. Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith MM, Ambudkar SV, Limtrakul PN: Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. *Biochem Pharmacol*. 64:573-582. 2002.
44. Tima Singkome. Effect of tumeric curcuminoid on *Wilms' tumor1 (WT1)* gene and *WT1* protein expression in leukemic cell lines. M.S. Thesis, Chiang Mai university, 2006.
45. Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M, Delhalle S, Galteau MM, Dicato M, Diederich M: Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. *Ann N Y Acad Sci*. 1010:389-392. 2003.
46. Anuchapreeda S, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P, Limtrakul P: Curcumin inhibits *WT1* gene expression in human leukemic K562 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 27:360-366. 2006.
47. Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P: Inhibitory effect of curcumin on *WT1* gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res*. 29:80-87. 2006.
48. สาคร พรประเสริฐ. มะเร็งเม็ดเลือดขาว. ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ส.การพิมพ์, 2542.
49. พรเทพ เทียนสีวากุล และคณะ. โลหิตวิทยาคลินิกขั้นสูง. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
50. ยุทธนา หมั่นดี. การตรวจวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาว. เชียงใหม่: แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.
51. Mazumder A, Neamati N, Sunder S, Schulz J, Pertz H, Eich E, Pommier Y: Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J Med Chem*. 40:3057-3063. 1997.

52. Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK: Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem.* 279:51163-51171. 2004.
53. Gessler M, Konig A, Bruns GA: The genomic organization and expression of the *WT1* gene. *Genomics.* 12:807-813. 1992.
54. Laity JH, Dyson HJ, Wright PE: Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11932-11935. 2000.
55. Simms LA, Algar EM, Smith PJ: Splicing of exon 5 in the *WT1* gene is disrupted in Wilms' tumour. *Eur J Cancer.* 31A:2270-2276. 1995.
56. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Sukumar S: RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, *WT1*. *Genes Dev.* 8:720-731. 1994.
57. Bruening W, Pelletier J: A non-AUG translational initiation event generates novel *WT1* isoforms. *J Biol Chem.* 271:8646-8654. 1996.
58. 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.* 7:970-977. 1993.
59. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, Miyake S, Tamaki H, Oji Y, Yamagami T, Tatekawa T, Soma T, Kishimoto T, Sugiyama H: Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (*WT1*) in human leukemia. *Blood.* 89:1405-1412. 1997.
60. Bergmann L, Maurer U, Weidmann E: Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma.* 25:435-443. 1997.
61. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D: High levels of Wilms' tumor gene (*wt1*) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood.* 90:1217-1225. 1997.
62. Tamaki H, Ogawa H, Inoue K, Soma T, Yamagami T, Miyake S, Oka Y, Oji Y, Tatekawa T, Tsuboi A, Tagawa S, Kitani T, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H, Miwa H, Kita K: Increased expression of the Wilms tumor gene (*WT1*) at relapse in acute leukemia. *Blood.* 88:4396-4398. 1996.
63. Inoue K, Sugiyama H: [*WT 1* and leukemia]. *Rinsho Ketsueki.* 36:552-558. 1995.

64. Jian Z, Chen F, Xie Q, Liu W, Zhong M: [Expression of *WT1* gene mRNA in leukemia]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 24:341-342. 1999.
65. Gaiger A, Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Greinix H, Kalhs P, Tisljar K, Priglinger S, Laczika K, Mitterbauer M, Novak M, Mitterbauer G, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jager U: Detection of the *WT1* transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2:1886-1894. 1998.
66. Dumur CI, Dechsukhum C, Wilkinson DS, Garrett CT, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A: Analytical validation of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction quantitation of different transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*). *Anal Biochem*. 309:127-136. 2002.
67. Han Y, San-Marina S, Liu J, Minden MD: Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by *WT1* protein. *Oncogene*. 23:6933-6941. 2004.
68. Gu WY, Chen ZX, Hu SY, Zhu J, Wang ZL, Yan F, Wang W, Cen JN, Shen HL, Qian J: [Significance of dynamic detection of *WT1* expression on monitoring minimal residual disease in leukemia patients following allogeneic bone marrow transplantation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 85:444-447. 2005.
69. Gu WY, Chen ZX, Cao XS, Hu SY, Zhu J, Wang ZL, Yan F, Wang W, Cen JN, Shen HL, Qian J: [Detection of *WT1* expression in bone marrow of acute leukemia patients with real-time quantitative RT-PCR.]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 25:728-731. 2004.
70. Bader P, Niemeyer C, Weber G, Coliva T, Rossi V, Kreyenberg H, Gerecke A, Biondi A: *WT1* gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia? *Eur J Haematol*. 73:25-28. 2004.
71. Ye Y, Raychaudhuri B, Gurney A, Campbell CE, Williams BR: Regulation of *WT1* by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *Embo J*. 15:5606-5615. 1996.
72. Bentov I, LeRoith D, Werner H: The *WT1* Wilms' tumor suppressor gene: a novel target for insulin-like growth factor-I action. *Endocrinology*. 144:4276-4279. 2003.
73. Ito K, Oji Y, Tatsumi N, Shimizu S, Kanai Y, Nakazawa T, Asada M, Jomgeow T, Aoyagi S, Nakano Y, Tamaki H, Sakaguchi N, Shirakata T, Nishida S, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Tsujimoto Y, Sugiyama H: Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene*. 25:4217-4229. 2006.

74. Anuchapreeda S, Tima S, Duangrat C, Limtrakul P. Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on *WT1* gene expression in leukemic cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 62:585-594. 2008.
75. Ajaikumar BK, Preetha A, Bharat BA. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer letters.* 269: 199-225. 2008.
76. Bharat BA, Anushree K, Alok CB. Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer research.* 23:363-398. 2003.

OUTPUT ที่ได้จากโครงการ

Full Length Research Paper

Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines

Chadarat Ampasavate¹, Siriporn Okonogi¹ and Songyot Anuchapreeda^{2*}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

²Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

Accepted 3 December, 2009

This study examined the antileukemic activity of non edible parts of 13 common Thai tropical fruits. Their ethanolic extracts were tested for cytotoxic effects on U937, K562, HL60, Molt 4 and normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Three of 20 crude plant extracts (kaffir lime leaves, mangosteen peels, and wampee leaves) had strong cytotoxic effects on K562, U937, and Molt4 cells. The IC₅₀ values of kaffir lime leaves on those cells were 26.1, 9.0 and 11.9 µg/ml respectively, whereas those of mangosteen peel were 23.6, 4.5 and 10.1 µg/ml, and those of wampee leaves were 71.9, 13 and 70.4 µg/ml. Furthermore, pomegranate peel extract had a potent cytotoxic effect on HL60 cells (IC₅₀ of 8.0 µg/ml), but was non-toxic to normal PBMCs, indicating that as a potential source of antileukemic agents.

Key words: Fruit plants, cytotoxicity, leukemic cell line.

INTRODUCTION

Leukemia was first recognized by the German pathologist Rudolf Virchow and John Bennett in 1845 (Virchow, 1845; Craigie, 1845). Leukemia refers to a group of acute or chronic malignant diseases that involve the blood-forming organs, characterized by an abnormal proliferation, differentiation, and excessive production of white blood cells and their precursors in the bone marrow, with or without a corresponding increase of those in the circulating blood. This results in decreased production and function of normal blood cells. Leukemia can spread to the lymph nodes, spleen, liver, central nervous system, and other organs. To date, the rapid growth of advanced technologies and new discoveries in the diagnosis and treatment of leukemia have made surviving from leukemia more likely than in the past. Chemotherapy is one of the methods used most frequently in the treatment of leukemia. It works by restraining leukemic cells from growing or multiplying and then causing their disruption. Many varieties of fruits and vegetables have been evaluated for their protective activity against cancer. Significant alteration of the incidence of colorectal cancer

has been reported as resulting from the consumption of a diet high in fruits and vegetables. The antioxidative activity of major substances in this diet group has generated interest in fruit and vegetable species as potential sources of chemotherapeutic compounds (McCann et al., 2007). Recently, we investigated antioxidative and cytotoxic activities against Caco-2 and PBMCs cells of several fruit peel extracts. Pomegranate peel had the highest antioxidative activity, followed by the extracts of rambutan, mangosteen, and banana peels. Interestingly, mangosteen peel extract exhibited cytotoxicities against Caco-2 and PBMCs cells. These results were of interest for investigating the cytotoxicity of these plants against other cancer cells (Okonogi et al., 2007).

Natural antioxidant compounds such as curcumin possess the ability to induce cell death in two leukemic cell lines: K562 and Jurkat cells (Duvoix et al., 2003). Curcumin I and III exhibited *in vitro* cytotoxicity against human chronic myeloid leukemia (Nagabhushan and Bhide, 1992). Kuo et al. (1996) have shown that the dietary component pure curcumin induced apoptosis in human leukemia HL60 cells at a concentration of 3.5 µg/ml. In the course of searching for new chemical entities or remedies from ethnomedicine, the extracts derived from plants, especially fruits or related waste parts

*Corresponding author. E-mail: songyot@chiangmai.ac.th.

are of interest as sources of chemotherapeutic agents. Approximately 25% of the drugs prescribed worldwide come from plants, 121 such active compounds being in current use. About 60% of anti-tumor and anti-infectious drugs launched on the market or under clinical trial are of natural origin (Shup, 1998).

In Thailand, tropical fruits are widely grown for domestic consumption and for export. However, their waste products, such as leaves, peels or seeds, are often discarded as garbage. Several types of fruit were selected for this study, based on high levels of consumption in Thailand, ethnomedical use, and their various pharmacological properties. Screening for antileukemic agents from the edible and non edible portions of several fruit plants was conducted on four representative leukemic cell lines (K562, U937, Molt4, and HL60 as well as the normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)).

MATERIALS AND METHODS

Fruit plants

Thirteen species of fruits, grown in Thailand and either are commonly consumed or possess phytopharmaceutical properties were purchased from local grocery stores in Chiang Mai, Thailand. The species examined were: star fruit (*Averrhoa carambola* L.), wampee leaves (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels), kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.), coconut (*Cocos nucifera* L.), longan (*Euphoria longan* Lam. or *Dimocarpus longan* Lour.), banana (*Musa sapientum* L.), mangosteen (*Garcinia mangostana* L.), dragon fruit (*Hylocereus undatus*), long-gong (*Lansium domesticum* Correa), rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), passion fruit (*Passiflora foetida* L.), Guava (*Psidium guajava* L.) and pomegranate (*Punica granatum* L.).

Chemicals

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and Histopaque®-1077 were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). RPMI 1640 and penicillin-streptomycin from GIBCO™ Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biochrom AG (Berlin, Germany). Ethanol was purchased from Fluka Chemicals (Buchs, Switzerland). All other chemicals were of the highest grade available.

Ethanolic extracts

The dried and ground parts of each fruit were extracted with 95% ethanol for three days at room temperature, filtered and concentrated using a rotary evaporator (Eyela N-100, Tokyo, Japan) at 45°C.

The extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with complete RPMI 1640 medium to give final concentrations of total extract ranging from 3.13 - 100 µg/ml.

Cell culture and cytotoxicity

The erythroid leukemic cell line (K562), human promyeloid leukemia

(HL60), human monocytic leukemia (U937), and human lymphoblastic cell line (Molt4) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mM L-glutamine, 100 Units/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin, 10% inactivated FCS, and adjusted to pH 7.2 by the addition of 15 mM HEPES. All cell lines were maintained in a humidified incubator with an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C.

Cell viability was determined by the MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) test method. MTT (5 mg/ml) was dissolved in PBS. The solution was filtered through a 0.2 µm filter and stored at 2 - 8°C. Cells were cultured in 96-well plates (3.0 x 10⁴ cells/ well) containing 100 µl medium, prior to the treatment with plant extract or vincristine (a chemotherapy drug used for some types of cancer) at 37°C for 24 hrs. After that, 100 µl fresh medium containing various concentrations of plant extracts or vincristine were added to each well, and incubated for another 48 hrs. Diluted plant extract or vincristine solutions were freshly prepared in DMSO prior to each experiment. The metabolic activity of each well was determined by the (MTT) assay and compared to those of untreated cells. After removal of 100 µl medium, MTT dye solution was added (15 µl / 100 µl medium) and the plates were incubated at 37°C for 4 hrs in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After that, 100 µl of DMSO were added to each well, and mixed thoroughly to dissolve the dye crystals. The absorbance was measured using an ELISA plate reader (Biotek EL 311) at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. High optical density readings corresponded to a high intensity of dye color, that is, to a high number of viable cells able to metabolize MTT salts. The fractional absorbance was calculated by the following formula:

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

The average cell survival obtained from triplicate determinations at each concentration was plotted as a dose response curve. The 50% inhibition concentration (IC₅₀) of the active substances was determined as the lowest concentration which reduced cell growth by 50% in treated compared to untreated culture. The IC₅₀s were compared for their activities. An IC₅₀ less than 20 µg/ml of crude extract was considered as an active compound against cancer cells, following the standard National Cancer Institute (NCI) criteria (Chen et al., 1988; Geran et al., 1972).

Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Blood samples from healthy volunteers were collected by venepuncture and transferred into 15 ml heparin coated test tubes. It was diluted at 1:1 ratio with PBS, layered onto Histopaque®-1077 at a volume ratio of 3:1 and centrifuged at 1,000 xg for 30 min. During the centrifugation the PBMCs moved from the plasma and were suspended in the density gradient, isolating them from erythrocytes and granulocytes. The PBMCs layer was removed and then washed twice with PBS. The supernatant was then removed and the cells were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mM L-glutamine, 100 Units/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin, 10% inactivated FCS, and adjusted to pH 7.2 by the addition of 15 mM HEPES. Cell viability was determined by the trypan-blue dye exclusion method. The PBMC cell density used in the cytotoxicity study was 1 x 10⁵ cells/ well of the 96-well tissue culture plate. Dose-response curves between percentage of cell viability and concentrations of the extracts were constructed. The IC₅₀ was determined from the plotted curve.

Table 1. Percent yield of extracts from different parts of non edible fruit products.

No.	Common name	Scientific name	Family	Parts	% yield
1	Raw banana	<i>Musa sapientum</i> L.	Musaceae	Peels	7.66
2	Ripe banana	<i>Musa sapientum</i> L.	Musaceae	Peels	14.44
3	Coconut	<i>Cocos nucifera</i> L.	Palmae	Peels (inside)	5.80
4	Dragon fruit	<i>Hylocereus undatus</i> (Haw) Britt. & Rose	Cactaceae	Peels	1.40
5	Guava	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Leaves	8.70
6	Guava	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Stems	1.12
7	Raw guava	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Raw Fruit	4.65
8	Kaffir lime	<i>Citrus hystrix</i> DC.	Rutaceae	Peels	17.52
9	Kaffir lime	<i>Citrus hystrix</i> DC.	Rutaceae	Leaves	7.42
10	Kaffir lime	<i>Citrus hystrix</i> DC.	Rutaceae	Stems	1.97
11	Longan	<i>Euphoria longan</i> Lam. <i>Dimocarpus longan</i> Lour.	Sapindaceae	Seeds	9.59
12	Long-gong	<i>Lansium domesticum</i> Correa	Meliaceae	Peels	5.71
13	Mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i> L.	Guttiferae	Peels	7.21
14	Passion fruit	<i>Passiflora foetida</i> L.	Plasifloraceae	Peels	2.60
15	Raw Pomegranate	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Peels	6.21
16	Pomegranate	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Leaves	11.27
17	Pomegranate	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Seeds	4.46
18	Rambutan	<i>Nephelium lappaceum</i> L.	Sapindaceae	Peels	10.68
19	Raw star fruit	<i>Averrhoa carambola</i> L.	Oxalidaceae	Raw Fruit	11.66
20	Wampee	<i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels	Rutaceae	Leaves	8.66

Microscopic Analysis

Cell morphology of HL60 was examined after being treated with 8 and 50 µg/ml pomegranate extract at 37°C for 48 hrs under the inverted microscope (Olympus, IX71, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

Yield of extracts

Table 1 shows the percent yield of extracts obtained from different parts of fruit waste products. The yields expressed are based on the dried weight of sample raw materials. Among these extracts, the highest (17.52%) and the lowest (1.12%) yields of extraction were observed from the kaffir lime peels and guava stems, respectively. Sultana et al. (2008) reported that the percent yield of dry matter banana and pomegranate peels after extracting with 80% methanol was 16.4 and 29.9%, respectively. Our result showed that the percent yield of banana peel extract is similar to the ripe banana peel extract (14.4%), whereas the pomegranate peel extract was different in percent yield (6.21%). In contrast, Akamine et al., 2009 found that the percent yield of fresh banana peel extract was 2.3%. In addition, the percent yield of extractable components using ethanol from Kaffir lime leaves as 2.56% (Hiran et al., 2009) and mangosteen peel 29.46% (Bullangpoti et al., 2004). Variation in the percent yield of extracts might be because of different

plant materials themselves for example the chemical composition of plant, nature of the soil and agro-climatic condition. The other factors could be the effectiveness of the extracting solvent to dissolve endogenous compounds.

Cytotoxicity test

Four human-origin cancerous cell lines (K562, U937, Molt4, and HL60) and a normal human cell type (PBMC) were used for the cytotoxicity test. The cancerous cell lines possess differences in their origin, morphology and genomes, resulting in susceptibility differences to the chemotherapeutic agents. In 1971, the hematopoietic cell line Molt4 was established from the peripheral blood of a patient in relapse from ALL by Minowada et al. (1972). These cells lacked surface and cytoplasmic immunoglobulins. This cell line contains several copies of the Epstein Bar virus (EBV) genome. The most distinctive characteristic of the Molt4 cells was their rosette-forming ability with sheep, goat, horse, and pig erythrocytes.

Furthermore, K562, the first myeloid-erythroid cell line, was established from a Ph⁺ chromosome positive CML blast crisis patient (Lozzio and Lozzio, 1975; Lozzio and Lozzio, 1979; Andersson et al., 1979). More than fifty leukemic cell lines have been generated in order to make cell available for leukemia studies, including U937 and HL60 cells. U937, a monocytic cell line, was established

Table 2. IC₅₀ values (µg/ml) of fruit extracts on four leukemic cell lines and PBMCs.

No.	Common name	Parts	IC ₅₀ (µg/ml) ^Δ (Mean + SD)				
			PBMC	K562	U937	Molt4	HL60
1	Raw banana	Peels	>100	>100	>100	>100	>100
2	Ripe banana	Peels	>100	>100	>100	>100	>100
3	Coconut	Peels (inside)	>100	>100	>100	>100	77.3 ± 0.2
4	Dragon fruit	Peels	>100	>100	>100	>100	>100
5	Guava	Leaves	>100	>100	>100	>100	>100
6	Guava	Stems	>100	>100	>100	>100	>100
7	Raw guava	Fruit	>100	>100	>100	>100	31.8 ± 2.5
8	Kaffir lime	Peels	47.5 ± 0.9	>100	70	38.6 ± 0.9	>100
9	Kaffir lime	Leaves	12.5 ± 0.6**	26.1 ± 1.2	9 ± 0.5**	11.9 ± 0.6**	17.1 ± 0.4**
10	Kaffir lime	Stems	>50	>100	>100	70.4 ± 2.2	36.4 ± 0.8
11	Longan	Seeds	>100 [#]	84 ± 0.7	>100	>100	44.3 ± 1.1
12	Long-gong	Peels	>100	>100	97 ± 0.2	>100	>100
13	Mangosteen	Peels	4.9 ± 0.2**	23.6 ± 0.7	4.5 ± 1.6**	10.1 ± 1.4**	77.3 ± 0.8
14	Passion fruit	Peels	>100	>100	>100	>100	>100
15	Raw pomegranate	Peels	>100 [#]	>100	>100	>100	7.9 ± 1.9**
16	Pomegranate	Leaves	>100	>100	>100	>100	86.4 ± 1.7
17	Pomegranate	Seeds	>100	>100	>100	>100	43.2 ± 1.6
18	Rambutan	Peels	>100	>100	>100	>100	>100
19	Raw star fruit	Fruit	>100	>100	>100	>100	>100
20	Wampee	Leaves	25 ± 1.8	71.9 ± 1.6	13 ± 2.1**	70.5 ± 1.9	59.1 ± 1.5

^Δ Asterisks denote mean of three independent experiment ($n = 3$).

** Asterisks denote IC₅₀ less than 20 µg/ml which are considered as an active compound against cancer cells.

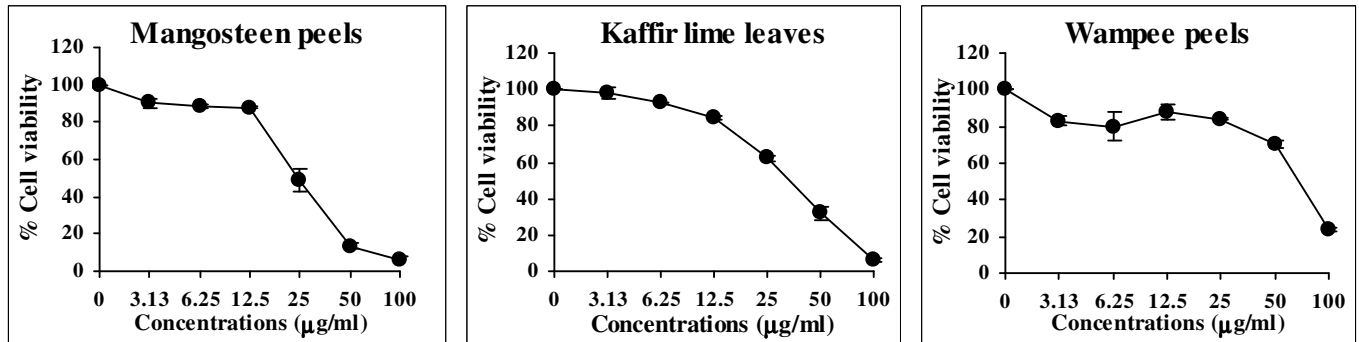
[#] Asterisks denote effective dose for cell stimulation (ED₅₀): ED₅₀ of longan seed extract = 50 ± 1.2 µg/ml, ED₅₀ of raw pomegranate peel extract = 44.4 ± 0.4 µg/ml.

from histiocytic lymphoma. HL60, a promyelocytic cell line, was established from AML-M3, M2 (Epatein et al., 1976; Schneider et al., 1977; Gillis and Watson, 1980; Collins et al., 1977). These selected cell lines are representative of four human leukemias, M3 (promyelocytic leukemia; HL60), M4 (monocytic leukemia; U937), erythrocytic leukemic cells derived from chronic myelogenous leukemia (CML; K562), and acute lymphoblastic leukemia (ALL; Molt4).

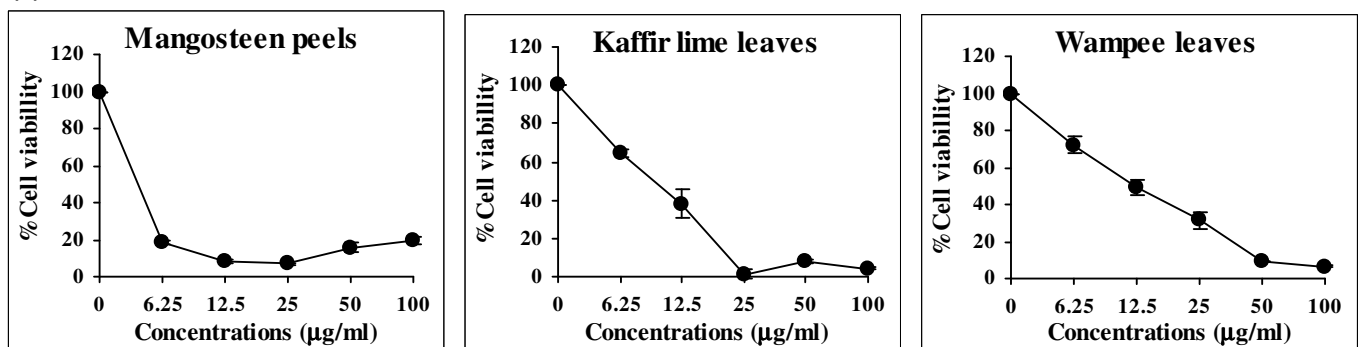
The cytotoxicity and selectivity of the fruit extracts against the selected cancerous cell lines are summarized in Table 2. According to the standard National Cancer Institute criteria (Chen et al., 1988; Geran et al., 1972), crude extracts possessing an IC₅₀ less than 20 µg/ml are considered active against the tested cancer cells. The extracts with the IC₅₀ less than 20 µg/ml against the cancer cell lines were kaffir lime leaves (9 µg/ml for U937; 11.9 µg/ml for Molt4; 17.1 µg/ml for HL60), mangosteen peels (4.5 µg/ml for U937; 10.1 µg/ml for Molt4), wampee leaves (13 µg/ml for U937) and raw pomegranate peels (8 µg/ml for HL60) (Table 2 and Figure 1). PBMC cells are frequently used as the model for the cytotoxicity test in normal cells. Many studies have utilized PBMCs to assess the effects of chemicals or extracts on the proliferation of normal cells (Anazetti et

al., 2003; Liu et al., 2004). In this study, the highly cytotoxic activity of the extracts against PBMCs was a generally observed range (4.9 - 25 µg/ml), except the extract from raw pomegranate peels, which exhibited cell stimulatory activity (Table 2 and Figure 2). In addition, pomegranate peel extract had no inhibitory effect on cell proliferation in K562, U937, and Molt4 cell lines. In this regard, the cytotoxicity of the active extracts was highly selective against the HL60 leukemic cell type (Table 2 and Figure 1). Various parts of *Punica granatum* (pomegranate), especially the fruits, have been reported for their pharmacological activities. There have been a long ethnomedical history for the pomegranate fruits, and thus have been of interest to the pharmacological researchers. Juice and peels of pomegranate fruits possess potent antioxidant, anticancer, and antiinflammatory activities (Okonogi et al., 2007; Lansky and Newman, 2007). The stimulatory activity of pomegranate extract on PBMC proliferation indicates selectivity of the extract against specific leukemic cells (HL60) and nontoxicity to normal cells. In order to improve the immune response, such stimulation of PBMC proliferation might be beneficial for patients with immunodeficiency. Longan seeds and pomegranate peels appear to be the best candidates for stimulating PBMCs (Figure 2). Most of the extracts

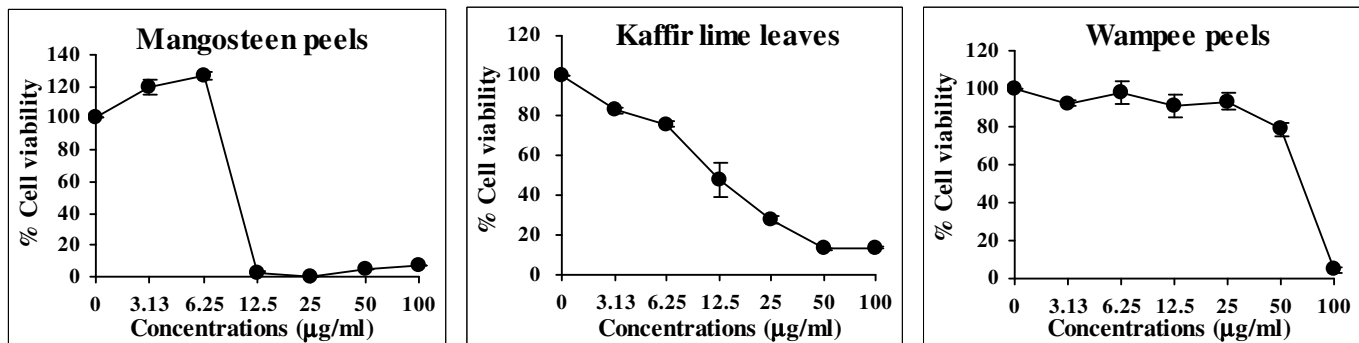
(a) K562



(b) U937



(c) Molt4



(d) HL60

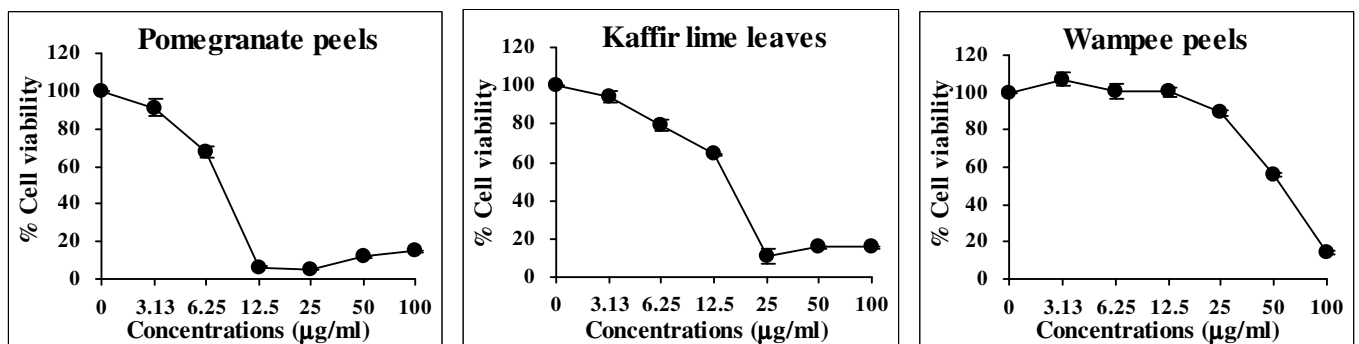


Figure 1. Effect of the active extracts on leukemic cells; (a) K562, (b) U937, (c) Molt4, and (d) HL60.

PBMC

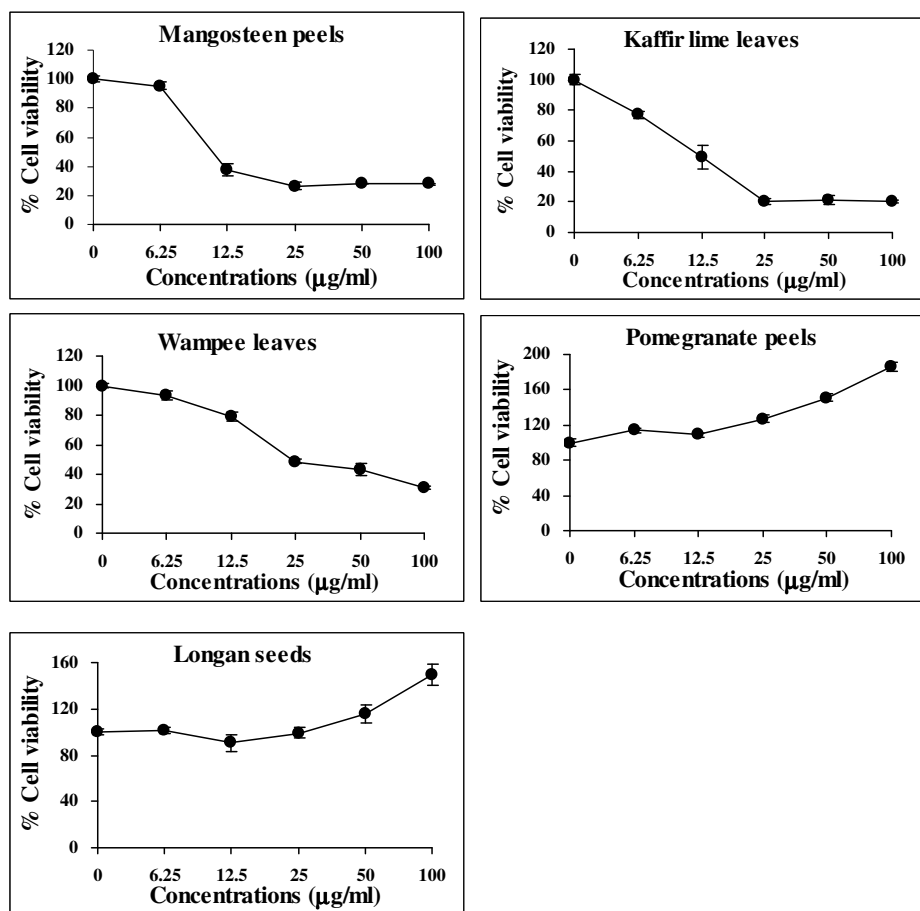


Figure 2. Effect of the active extracts on normal PBMC cells.

had no cytotoxic activity (IC_{50} values higher than 100 µg/ml) against the studied cell types. The extract from kaffir lime leaves, mangosteen peels, and wampee leaves contained potential cytotoxic agent (s), as observed from both cancerous and normal cells. Matsumoto et al. (2004) had reported antiproliferative activity of α -mangostin, an active compound from mangosteen pericarp, on several human leukemic cell lines. The compound demonstrated induction of apoptosis through mitochondria as the target site. However, the cytotoxicity on normal cells was not measured in that study. Essential oil from kaffir lime leaves, an essential spice in Thai food, displayed cytotoxic activity against KB and P388 cell lines (Manosroi et al., 2006). The IC_{50} values for KB and P388 were 99.7 µg/ml and 74.6 µg/ml respectively, whereas lower IC_{50} values were observed for the extracts in our study (9 µg/ml for U937 and 11.93 µg/ml for Molt4). Lime oil possessed components those can induce apoptosis-mediated cells death in human colon adenocarcinoma cells (Patil et al., 2009). Moreover, kaffir lime leave extract

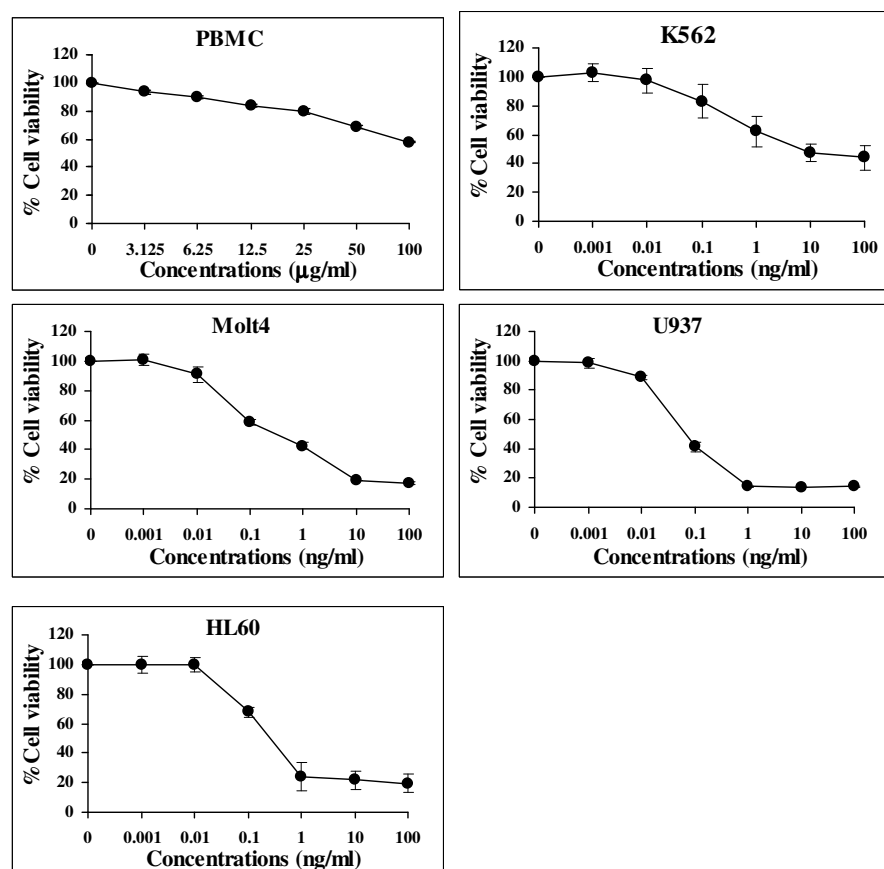
was known to exert strong anti-promoting activity in a test of promoter-induced Epstein - Barr virus (EBV) activation (Tiawech et al., 2000). No antiproliferative activity on cancer cells has been reported for wampee leaves. However, the anticancer activity of wampee peel extract had been reported that 50 µg/ml of ethyl acetate fraction exhibited strong anticancer activities against SGC-7901, HepG-2 and A-549 cell lines with the corresponding inhibitory activities of 78.5, 72.4 and 69.2%, respectively (Prasad et al., 2009).

Vincristine, a chemotherapy drug used as a treatment for some cancer types, had cytotoxic effects on K562, U937, Molt4, and HL60 cell lines with the IC_{50} values 8, 0.09, 0.63, and 0.39 ng/ml, respectively. However, PBMCs were not affected by vincristine (IC_{50} value higher than 100 µg/ml) (Table 3 and Figure 3). Most of the fruit extracts which exhibited cell inhibition to leukemic cell lines, also expressed cytotoxicity to the PBMCs. Interestingly, the extracts from pomegranate, raw guava and coconut peels inhibited the proliferation of HL60, but no

Table 3. IC₅₀ values (ng/ml) of Vincristine on PBMC, K562, U937, Molt4, and HL60.

Chemotherapeutic agent	IC ₅₀ (ng/ml)*				
	PBMC	K562	U937	Molt4	HL60
Vincristine	>100	8	0.09	0.63	0.39

* Asterisks denote mean of three independent experiment ($n = 3$).

**Figure 3.** Effect of vincristine on normal PBMC, K562, U937, Molt4, and HL60.

toxicity to the PBMCs.

Regarding the mechanism of cytotoxicity of pomegranate extract in HL60 cells, microscopic analysis showed the blebbing pattern of cell apoptosis at concentrations of 8.0 $\mu\text{g/ml}$ (IC₅₀) and 50 $\mu\text{g/ml}$ as compared to the vehicle control (Figure 4). This suggested that cytotoxicity of pomegranate might involve the apoptosis pathway. Future work will be designed to identify the possible signalling cascade.

The cytotoxicity test is required for future work regarding the target inhibitory protein in order to gain insight into the mechanism of inhibitory effect on the proliferation of the leukemia cells. The noncytotoxic doses in terms of IC₂₀ can be used for gene expression determination,

especially Wilms' tumor 1 (WT1) mRNA and protein level. The *WT1* gene is one promising biological marker for measuring cell proliferation (Anuchapreeda et al., 2006). In addition, further purification to eliminate toxic agent (s) against normal cells is necessary. Testing purified compounds will help to determine the specific cytotoxic chemicals responsible for the observed inhibitory effects on leukemia cell lines.

Conclusion

We tested the cytotoxicity to leukemic cells for various fruit extracts. Pomegranate peel extract strongly inhibited HL60 cells, and was non-toxic to normal cells. Interes-

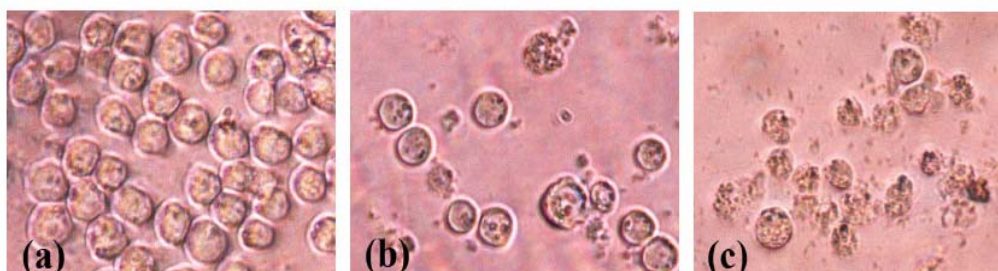


Figure 4. HL60 cell morphology after pomegranate extracts treatment for 2 days. Cell morphology of HL60 was examined after treatment with (a) vehicle control, (b) 8 µg/ml, and (c) 50 µg/ml pomegranate extract.

tingly, we observed a stimulating activity of this extract on PBMC proliferation, indicating the selectivity of the extract against only specific leukemic cells (HL60). The peel of this plant is a promising source of antioxidant or anticancer agents, since the fruits are widely cultivated in different parts of the world. Mangosteen peels, kaffir lime leaves, and wampee leaves also inhibited of K562, U937, and Molt4 cell lines. Even though they were toxic to PBMCs, noncytotoxic doses can be analyzed for their effects on leukemia biological markers, such as the *WT1* gene. However, further study of the activity associated with the different species, cultivation conditions, and investigation the active constituents of these plants may provide useful comparative information in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Thailand Government Budget, National Research Council of Thailand (NRC) and The Thailand Research Fund (TRF). We gratefully acknowledge Dr. Dale E. Taneyhill for his critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Akamine K, Koyama T, Yazawa K (2009). Banana Peel extract suppressed prostate gland enlargement in testosterone-treated mice. *Biosci. Biotechnol.* 73: 1911-1914.
- Anazetti MC, Melo PS, Duran N, Haun M (2003). Comparative cytotoxicity dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology* 188: 261-274.
- Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG (1979). Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Nature* 278: 364-365.
- Anuchapreeda S, Thanarattanakorn R, Sittpreachacharn S, Chanarat P, Limtrakul P (2006). Curcumin inhibits WT1 gene expression in human leukemic K562 cells. *Acta Pharmacologica Sin.* 27: 360-366.
- Bullangpoti V, Visetson S, M John, Pornbanlualap S (2004). Effects of Mangosteen's Peels and Rambutan's Seeds on Toxicity, Esterase and Glutathione-S-transferase in Rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Kasetsart J. Nat. Sci.* 38: 84-89.
- Chen CF, Hwang JM, Lee W, Chiang HC, Lin JC, Chen HY (1988). Search for antitumor agent for Chinese herbs I. Antitumor screening method. *Chin. Med. J. Taipei* 41: 177-184.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349.
- Craigie D (1845). Cases of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Med. Surg. J.* 64: 400-413.
- Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M, Delhalle S, Galteau MM, Dicato M, Diederich M (2003). Curcumin induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. *Ann. NY Acad. Sci.* 1010: 389-392.
- Epatein AL, Henle W, Henle G, Hewetson JF, Kaplan HS (1976). Surface marker characteristics and Epstein-Barr virus studies of two established North American Burkitt's lymphoma cell lines. *PNAS USA* 73: 228-232.
- Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rept.* 3: 103.
- Gillis S, Watson J (1980). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulator molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* 152: 1709-1719.
- Hiran P, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N (2009). Efficacy of plant extract from lime, kaffir lime, and pummelo on microbial inhibition. *Agric. Sci. J.* 40: 91-94.
- Kuo ML, Huang TS, Lin JK (1996). Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1317: 95-100.
- Lansky E, Newman RA (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* 109: 177-206.
- Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, Kuo YC (2004). The extracts from *Nelumbo nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci.* 75: 699-716.
- Lozzio BB, Lozzio CB (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* 3: 363-370.
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975). Human chronic myelogenous leukaemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334.
- Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* 235: 114-120.
- Matsumoto K, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Kobayashi E, Iinuma M, Nozawa Y (2004). Preferential target is mitochondria in α -mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 5799-5806.
- McCann MJ, Gill CIR, Brien GO, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1224-1230.
- Minowada J, Onuma T, Moore GE (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 49: 891-895.

- Nagabhushan M, Bhide SV (1992). Curcumin as an inhibitor of cancer. J. Am. Coll. Nutr. 11(2): 192-198.
- Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. Food Chem. 103: 839-846.
- Patil JR, Jayaprakasha GK, Murthy KNC, Tichy SE, Chetti MB, Patil BS (2009). Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. Food Chem. 114: 1351-1358.
- Prasad MN, Hao J, Yi C, Zhang D, Qui S, Jiang Y, Zhang M, Chen F (2009). Antioxidant and anticancer activities of wampee (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) peel. J. Biomed. Biotechnol. 2009: 1-6.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int. J. Cancer 19: 621-626.
- Shu, Y (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod. 61: 1053-1071.
- Sultana B, Anwar F, Rafique AM, Shahid CSA (2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. Grasas Y Aceites. 59: 205-217.
- Tiwawech D, Hirose M, Futakuchi, Lin C, Thamavit W, Ito N, Shirai T (2000). Enhancing effects of Thai edible plants on 2-amino-3, 8-dimethylimidazo (4,5-f) quinoxaline-hepatocarcinogenesis in a rat medium-term bioassay. Cancer Lett. 158: 195-201.
- Virchow R (1845). Weisses blut. Forrieps Notizen. 36: 151-156.

Accepted Manuscript

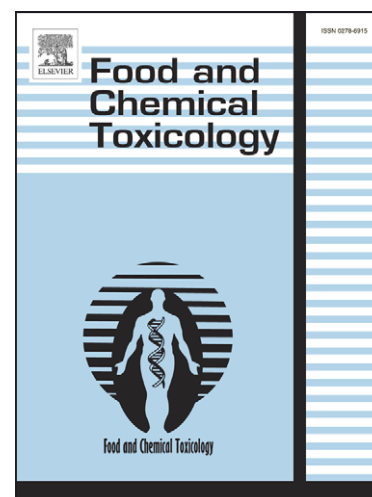
Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines

Ruttiros Khornkarn, Siriporn Okonogi, Chadarat Ampasavate, Songyot Anuchapreeda

PII: S0278-6915(10)00290-5
DOI: [10.1016/j.fct.2010.05.014](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.014)
Reference: FCT 5410

To appear in: *Food and Chemical Toxicology*

Received Date: 6 February 2010
Accepted Date: 7 May 2010



Please cite this article as: Khornkarn, R., Okonogi, S., Ampasavate, C., Anuchapreeda, S., Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines, *Food and Chemical Toxicology* (2010), doi: [10.1016/j.fct.2010.05.014](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.014)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with
antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines**

Ruttiros Khornkarn^a, Siriporn Okonogi^{a,*}, Chadarat Ampasavate^a, Songyot Anuchapreeda^b

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University;

Chiang Mai, 50200, Thailand

^bFaculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University; Chiang Mai, 50200,

Thailand

*Corresponding author

Department of Pharmaceutical Sciences

Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University

Chiang Mai, 50200

THAILAND

Tel +66-53-944311

Fax +66-53-278708

E-mail: sirioko@chiangmai.ac.th.

1. Introduction

Cancer is a major cause of mortality worldwide and cancer incidents rapidly increase from year to year. In 2000, there were 10.4 million new cancer cases and it is expected that this number will be doubled in 2030 (Global cancer control, 2008). Recent studies have

shown strong evidence that biological reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals ($\text{OH}^\bullet$) and the superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) are involved in the development of cancer. Aerobic organisms possess mechanisms of ROS scavenging exploiting antioxidant systems including enzyme-based antioxidants such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and glutathione reductase. However, tissue damage can be developed from an imbalance between ROS-generating and these *in vivo* defense systems, resulting in pathogenesis of a variety of degenerative disorders. The role of ROS in the pathogenesis of cancer is that these species react with DNA resulting in cell malfunction. Ultimately it can lead to malignancies by accumulation of somatic mutations (Hursting et al., 1999).

As ROS are involved in cancer development, compounds with high ROS reduction activity are likely able to prevent cancer incidence. It has been shown that both synthetic and natural antioxidants play an important role in ROS reduction, resulting in prevention and treatment of ROS-induced tissue degenerations (Shukla and Pal, 2004). Natural antioxidants have received much attention in recent years because they are relative safe as compared to their synthetic counterparts. Fruits and vegetables are the major source of natural antioxidants and contain various kinds of antioxidant compounds such as vitamin C, vitamin E, **carotenoids**, lutein, lycopene, etc. (Cai et al., 2004). Among these compounds, polyphenolic compounds display antioxidant activity through different mechanisms, in particular by free radical scavenging and by chelating of metal ions (Du et al., 2009; Jacob et al., 2008). Recently, many studies reported that plant extracts with high levels of polyphenolic compounds **have** anticancer activity due to neutralization of ROS (Moongkarndi et al., 2004; Russo et al., 2005).

The extracts of rambutan, mangosteen, and coconut peels were reported to possess high antioxidant potential (Esquenazi et al., 2002; Pallanisamy et al., 2008; Yu et al., 2007). The aim of **the present** study was to evaluate the antioxidant activity and cytotoxicity of

these plant extracts toward both cancer and normal cells. The total phenolic content of the extracts was determined in order to investigate the relationship between the observed activities and the phenolic content of the extracts. For cytotoxicity tests, KB (human oral squamous carcinoma cell), and Caco-2 (human colon adenocarcinoma cell) cancer cell lines were used as cancer cell models. Moreover, **peripheral blood mononuclear cells (PBMC)** were also used as human normal cells for cytotoxic evaluation of the plant extracts.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Ethanol, hexane, ethyl acetate, acetone, methanol, and hydrochloric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin–Ciocalteu reagent, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,4,6-tri(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), sodium carbonate, potassium persulfate, ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), gallic acid, butylated hydroxytoluene (BHT), vitamin E, dimethyl sulfoxide (DMSO), Histopaque®-1077, and 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trolox was obtained from Aldrich Chemical Company (Steinheim, Germany). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biochrom AG (Berlin, Germany). Eagle's minimal essential medium (EMEM), RPMI 1640, trypsin–EDTA, and penicillin–streptomycin were purchased from GIBCO™ Invitrogen (Grand Island, NY, USA). All other chemicals were of the highest **purity** available.

2.2. Plant materials

Ripe fruits of rambutan (*Nephelium lappaceum*), mangosteen (*Garcinia mangostana*), and coconut (*Cocos nucifera*) were purchased **fresh from** markets in Chiang Mai, Thailand.

2.3. Preparation of plant extracts

Fruit peels of rambutan, mangosteen, and coconut were washed with clean water and subsequently cut into small pieces and placed in a circulating oven at 45 °C until complete dryness. The stalk of mangosteen peels **was** removed and only **the** mesocarp part of the coconut peel were used in the study. The dried plant materials were ground into fine powders.

2.3.1. Crude extracts

The dried powders of each plant **material** (~100 grams) were macerated with 95% ethanol (~500 mL, 48 h × 3) at room temperature. The extracts were combined, filtered and the solvent was removed under vacuum using a rotary evaporator at 45 °C. The obtained crude extracts were kept in a vacuum desiccator at 4 °C until further use.

2.3.2. Fractionated extracts

Four solvents of different polarity (hexane, ethyl acetate, butanol, and methanol) were used to consecutively extract the powders of the selected plants. Firstly, the dried powder (~100 grams) was extracted with hexane through maceration (~500 mL, 48 h × 3) at room temperature. The residue after the third extraction was dried for 24 h at room temperature in order to remove hexane. Next, the dried residue was further extracted by maceration in ethyl acetate, butanol, and methanol, respectively, in the same way as described for hexane. Extracts of the same solvent were pooled and **filtered**. The solvent was removed under

reduced pressure using a rotary evaporator at 45 °C. The **extracts obtained** were stored in a desiccator at 4 °C for further studies.

2.4. Determination of total phenolic content

The total content of phenolic compounds of the different extracts was determined by the colorimetric Folin–Ciocalteu method with slight adaptation as described by Sato et al. (1996). Briefly, samples of the obtained extracts were diluted in ethanol and pipetted into 96-well plates. Next, Folin–Ciocalteu reagent and sodium carbonate were added to each well. The mixture was incubated for 2 h at room temperature in the dark. The blue color that developed was measured using a microtitre plate reader. Gallic acid was used for calibration. The phenolic content of the extracts is expressed in gallic acid equivalent (GAE) concentration (mg/mL).

2.5. Antioxidant activity assays

2.5.1. ABTS assay

This assay measures the free radical scavenging activity of agents based on the decolorization of ABTS free radicals. The assay was done in the same manner as described previously (Tachakittirungrod et al., 2007). Briefly, ABTS radical cations were generated by reaction of ABTS and potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) in water. The ABTS free radical solution was diluted to an absorbance of 0.7 ± 0.2 at 750 nm and stored in the dark for 12 h. Next, extracts in ethanol were added to the ABTS free radical solution. The absorbance of the mixture was measured for 5 min using a microtitre plate reader. Vitamin E and BHT were

used as positive controls and trolox was used for calibration. The antioxidant potential is expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) value.

2.5.2. FRAP assay

This assay measures the reducing properties of antioxidants based on the reduction of the ferric ion. The measurements were done in the same manner as described previously (Okonogi et al., 2007). In short, FRAP reagent was prepared by mixing TPTZ and FeCl_3 solution in acetate buffer. The extracts dissolved in ethanol were mixed with the FRAP reagent in 96-well plates and allowed to react for 5 min at room temperature. Vitamin E and BHT were used as positive controls and ferrous sulfate was used for calibration. A microtitre plate reader was used to measure the absorbance of the resulting mixture. The antioxidant activity of the extracts is expressed as equivalent capacity (EC) using ferrous sulfate for calibration. A higher value of EC implies a higher reducing activity of the extracts.

2.6. Cytotoxicity assays

KB (human epidermal carcinoma of the mouth with HeLa contaminant) and Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma) cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin and 0.1 mg/mL of streptomycin. Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO_2 . The culture medium was renewed on alternate days. When the cells had reached confluency, they were subcultured at a split ratio of one to four by trypsinizing with 0.25% trypsin-EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). The cytotoxicity study was performed when the cells

reached 80–90% confluence. Caco-2 and KB cells were seeded into the 96-well plates at a density of 8×10^3 cells/well and 3×10^3 cells/well, respectively.

Blood samples from healthy volunteers were collected by venipuncture and transferred into **heparin-coated, 15 mL test tubes**. Blood was diluted at 1:1 ratio with PBS, layered onto Histopaque®-1077 at a volume ratio of 3:1 and centrifuged at 1000 xg for 30 min. With this procedure, the PBMCs were separated from the erythrocytes, granulocytes, and platelets. The PBMC layer was removed and then washed twice with PBS. Subsequently, the cells were resuspended in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL of penicillin, 0.1 mg/mL of streptomycin. Cell viability was determined by using the trypan-blue dye exclusion method (Tennant, 1964). The cell density of PBMCs used in the cytotoxicity study was 1×10^5 cells/well of the 96-well tissue culture plates.

The cytotoxicity of the different extracts was tested by using a standard MTT assay described by Alley et al., (1988) with a minor modification. Briefly, KB cells suspended in 100 μ l of medium were plated into 96 well tissue culture plates. After 24 h incubation, 100 μ L fresh medium containing various concentrations of plant extracts (5–100 μ g/mL) were added to each well, and incubated for another 48 h. Next, 100 μ L of the medium was removed and 15 μ L of 5 mg/mL MTT dye in PBS was added to the wells. Plates were incubated at 37 °C for 4 h in humidified 5% CO₂ atmosphere. **Subsequently**, the MTT solution was removed, 200 μ L of DMSO was added and mixed thoroughly to dissolve the dye crystals. The absorbance at 570 nm was measured using a microtitre plate reader at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. The cell viability was determined by the following formula:

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

Mean absorbance in control wells

Dose–response curves of percentages of cell viability plotted against concentrations of the extracts were constructed. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) in case of cell inhibition, or effective dose (ED_{50}) in case of cell stimulation was determined from the obtained plots.

2.7. Statistical analysis

The experiments were done in the triplicate and the results are expressed as mean $\pm$ S.D. Statistical analysis was done using one-way ANOVA and P value at a level of 95% confidence limit.

3. Results and discussion

3.1. Extraction yields and total phenolic contents

Table 1 shows the results of the extraction of the three plants (*Cocos nucifer*, *Garcinia mangostana*, and *Nephelium lappaceum*) with ethanol. The highest yield (10.7 %) was obtained from rambutan fruit peels while the lowest yield (5.8 %) was from coconut fruit peels. The total phenolic contents as measured using Folin-Ciocalteu assay ranged from 0.63–0.72 mg/mL. It is noted that the fruit peels of rambutan and mangosteen demonstrated significantly higher total phenolic content than that of coconut peels. <Insert **Table 1** here>

The plant powders were consecutively fractionated with organic solvents with increasing polarity. The yields of these extractions and the total phenolic contents are

reported in Table 2. <Insert **Table 2** here> It was found that extraction of the different plants with methanol gave the highest yields (16-26 %), whereas the yields obtained after extraction with hexane were the lowest (0.6-0.9 %). This is in line with the findings of Singh et al. (2002) who reported that extraction of pomegranates with methanol gave the highest yield. Extraction of the different plants with ethyl acetate and butanol gave intermediate yields (ranging from 3-12 %). **The hexane extracts not only gave low yields, but** also contained the lowest levels of phenolic compounds (0.1-0.3 mg/mL). The extracts of the more polar solvents (ethyl acetate, butanol, and methanol) contained substantially higher levels of phenolic compounds (ranging from 0.7-2.3 mg/mL) and comparable with those found in the ethanolic extracts (Table 1). Also in other studies, extracts **obtained with** relatively polar solvents (methanol or aqueous methanol mixtures) had the highest **content of** polyphenolic compounds (Dufour et al., 2007).

3.2. Antioxidant activities of the different plant extracts

Many methods have been used to determine the antioxidant activity of natural **products** (Antolovich et al., 2002). No single assay however can establish the full antioxidant potential of compounds, because multiple reactions and mechanisms are involved in antioxidative processes (Chu et al., 2000). Therefore, at least two different methods should be applied in order to evaluate the antioxidant capacity of extracts of fruits, vegetables, and other plant products (Du et al., 2009). In **the present** study, the antioxidant potency of our extracts was evaluated using the ABTS assay, which determines the free radical scavenging activity, and the FRAP assay, which measures the ferric ion reducing ability. Fig. 1 shows the results **obtained with** the ethanolic extracts. <Insert **Fig. 1** here>

Fig. 1A shows that the TEAC values of the ethanolic extracts of the different plants were between 13.8 to 15.6 mM/mg. The antioxidant activity of the extracts was around the same as that of BHT but significantly higher than that of vitamin E. The crude coconut peel extract had higher TEAC activity than vitamin E but lower than that of BHT. Fig. 1B demonstrates that the antioxidant activities of the ethanolic extracts were about the same as that of vitamin E but around 3-fold higher than that of BHT. It is important to mention that the extracts of the **plant peels** have both excellent radical scavenging (Fig. 1A) and ferric ion reducing capacities (Fig. 1B). Because of the high antioxidant activity and polyphenolic content of the crude ethanolic extracts, we fractionated the plants using solvents of increasing polarity (hexane, ethyl acetate, butanol, and methanol) in order to investigate whether fraction(s) with higher antioxidant levels could be obtained. The results are shown in Fig. 2 (ABTS assay) and Fig. 3 (FRAP assay). Fig. 2 shows that by far the lowest antioxidant activity, as determined by the ABTS assay, was found in the hexane fractions (TEAC values ranging from 0.6-2.1 mM/mg) which can be ascribed to their very low polyphenolic contents (Table 2). The extracts of the more polar solvents had substantially higher activity (ranging from 6-23 mM/mg) which is corresponding to their high polyphenolic levels (Table 2). The ERP fraction even had 1.5 and 2.5 higher activity than that of BHT and vitamin E, respectively. <Insert Fig. 2 here>

Fig. 3 indicates in line with the data of Fig. 2 that the hexane fractions had low antioxidant activity as determined by the FRAP assay (EC values ranging from 0.6-1.0 mM/mg). The extracts obtained with the more polar solvents had higher activities (EC values from 2.1 to 20.2 mM/mg). The highest activity found in the MRP fraction exceeded the activity of vitamin E and BHT by a factor of ~2 and 7, respectively. These results show that by using solvents with different polarity, fractions were obtained with higher antioxidant activity than that of the crude ethanolic extracts. Taken together, it should be emphasized that

the ERP and MRP fractions had significantly better antioxidant activity in both assays than the controls, BHT and vitamin E ($p < 0.05$). <Insert **Fig. 3** here>

The correlation of TEAC and EC values is reported in Fig. 4 which shows that there is a linear relationship ($R^2 = 0.979$) between the values obtained with both assays. It can not be concluded, yet, whether one or more compounds in the same extracts has both radical scavenging activity and ferric ion reduction capacity, or that different compounds are responsible for the different activities. Therefore, further fractionation of the extracts is necessary. <Insert **Fig. 4** here>

3.3. The relationship between the total phenol contents and antioxidant activities

Fig. 5 and Fig. 6 show the relationship between the total phenolic contents and the TEAC ($R^2 = 0.897$), and the EC ($R^2 = 0.886$) values, respectively. This good linear relationship indicates that the antioxidant activity in the different fractionated extracts is, as anticipated, due to polyphenolic compounds. <Insert **Fig. 5** and **Fig. 6** here>

3.4. Cytotoxicity test

Fig. 7, Fig. 8, and Fig. 9 show the dose-response curve of the tested fractions against KB, Caco-2, and PBMCs, respectively. Table 3 summarizes the IC_{50} and EC_{50} values as derived from these figures. It was found that the ECP and BCP extracts stimulate the proliferation of these cells (ED_{50} values ranging from ~13 - 82 $\mu\text{g/mL}$). This suggests that the application of this extract, as a natural antioxidant in food or drug products for humans, should be done with caution. Interestingly, the HCP extract shows a potent antiproliferative effect on the **KB tumor** cell line ($IC_{50} = 7.7 \mu\text{g/mL}$), but has no antiproliferative effect on

normal cells (PBMCs). Therefore this fraction is an interesting natural source for a potential novel antiproliferative **agent inhibitory to cancer** cell growth, but that **is** nontoxic to healthy human cells. Combined with the results of Fig. 2 and Fig. 3 it can be concluded that the antiproliferative activity of the HCP extract is not related to its antioxidant activity, which suggests that the responsible compounds are not polyphenolic. The fractions obtained by extractions with the more polar solvent (ECP, BCP, MCP) did not have antiproliferative activities. **Neither did the fractions of rambutan peel** show strong cell growth inhibition nor stimulation except BRP and MRP which showed some stimulation on KB cell (ED_{50} values of 15.7 and 9.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Although ERP and MRP showed high antioxidant activity, ERP is preferred as antioxidant because MRP may induce cancer cell growth. <Insert **Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9** and **Table 3** here>

The HMP, EMP, and BMP extracts showed potent antiproliferative activity on KB and Caco-2 cell line (IC_{50} values ranging from ~8 - 97 $\mu\text{g/mL}$). This is in line with the results reported by Moongkarndi et al. (2004) who found that the crude methanolic extract from the pericarp of mangosteen **showed** strong antiproliferation and induction of apoptosis on SKBR3 human breast cancer cells. Moreover, **the** ethanolic extract from mangosteen peels had strong cytotoxic effects on K562, U937, and Molt4 cell lines with the IC_{50} values of 23.6, 4.5, and 10.1 $\mu\text{g/mL}$ (Ampasavate et al., 2010). Mangosteen fruit is a rich source of phenolic compounds such as xanthone, α -mangostin, and tannin (Zadernowski et al., 2009). It has been reported that six xanthenes from pericarps of mangosteen had potent cytotoxic activity against human leukemia HL60 cells (Matsumoto et al., 2003) and α -mangostin induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells (Nakagawa et al., 2007). Table 4 shows that all mangosteen peel fractionated extracts had cytotoxic action on PBMCs with IC_{50} values ranging from ~6 - 24 $\mu\text{g/mL}$. This limits the application of this fraction as a source of novel anticancer agents. In this respect the HCP extract has the highest potential.

4. Conclusion

In this study we have shown that rambutan peel extracts, particularly the ERP and MRP fractions possess strong radical scavenging activity and ferric ion reduction capacity. It was shown that polyphenolic compounds in extracts are most likely responsible for the observed antioxidant action. Interestingly, HCP showed a high cytotoxic effect towards KB cells, but possessed no detectable cytotoxicity towards PBMCs. In future studies, it is our aim to establish the chemical structures and biological activities of the compounds present in ERP responsible for the antioxidant activity and present in HCP responsible for the antiproliferative activity.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

The authors are grateful for the financial support of the Royal Golden Jubilee (RGJ) Grant by the Thailand Research Fund (TRF). We also thank Professor Dr. Wim E. Hennink of the Faculty of Science, Utrecht University, the Netherlands, for valuable discussions.

References

- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48, 589–601.
- Ampasavate, C., Okonogi, S., Anuchapreeda, S., 2010. Cytotoxicity from fruit plants against leukemic cell lines. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4 (1), 013-021.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 127 (1), 183-198.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74 (17), 2157-2184.
- Chu, Y. H., Chang, C. L., Hsu, H. F., 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (5), 561-566.
- Du, G., Li, M., Ma, F., Liang, D., 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry* 113 (2), 557-562.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hehert, M. E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J., 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* 111 (1), 22-28.
- Esquenazi, D., Wigg, M. D., Miranda, M. M. F. S., Rodrigues, H. M., Tostes, J. B. F., Rozental, S., da Silva, A. J. R., Alviano, C. S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology* 153 (10), 647-652.
- Global cancer control, 2008. A call to action from the global cancer community. Draft World Cancer Declaration.

- Hursting, S. D., Slaga, T. J., Fischer, S. M., DiGiovanni, J. Phang J. M., 1999. Mechanism-based cancer prevention approaches: Targets, examples, and the use of transgenic mice. *Journal of the National Cancer Institute* 91 (3), 215-224.
- Jacob, J. K., Hakimuddin, F., Paliyath, G., Fisher, H., 2008. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Research International* 41 (4), 419-428.
- Matsumoto, K., Akao, Y., Kobayashi, E., Ohguchi, K., Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., Nozawa, Y., 2003. Induction of apoptosis by xanones from mangosteen in human leukemia cell lines. *Journal of Natural Products* 66 (8), 1124-1127.
- Moongkarndi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., Neungton, N., 2004. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 90 (1), 161-166.
- Nakagawa, Y., Iinuma, M., Naoe, T., Nozawa, Y., Akao, Y., 2007. Characterized mechanism of [alpha]-mangostin-induced cell death: Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (16), 5620-5628.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchapreeda, S., Tachakittirungrod, S., Chowwanapoonpohn, S., 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry* 103 (3), 839-846.
- Palanisamy, U., Cheng, H. M., Masilamani, T., Subramaniam, T., Ling, L. T., Radhakrishnan, A. K., 2008. Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry* 109 (1), 54-63.

- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., Garbarino, J. A., 2005. Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* Sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 100 (3), 323-332.
- Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H., 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1), 37-41.
- Singh, R. P., Murthy K. N. C., Jayaprakasha, G. K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (1), 81-86.
- Shukla, Y., Pal, S. K., 2004. Dietary cancer chemoprevention: An overview. *The International Journal of Human Genetics* 4 (4), 265-276.
- Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., Chowwanapoonpohn, S., 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry* 103 (2), 381-388.
- Tennant, J. R., 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2 (6), 685-694.
- Yu, L., Zhao, M., Yang, B., Zhao, Q., Jiang, Y., 2007. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 104 (1), 176-181.
- Zadernowski, R., Czaplicki, S., Naczek, M., 2009. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry* 112 (3), 685-689.

Fig. captions

- Fig. 1. Antioxidant activity of the ethanolic extracts (Table 1) from the fruit peels of three plants using ABTS (A) and FRAP (B) assays. Vitamin E and BHT were used as standards. Calibration was done with trolox (ABTS assay) and ferrous sulfate (FRAP assay).
- Fig. 2. Antioxidant activity of fractionated extracts (Table 2) using ABTS assay. Vitamin E and BHT were used as standards.
- Fig. 3. Antioxidant activity of extract fractions (Table 2) using FRAP assay. Vitamin E and BHT were used as standards.
- Fig. 4. Correlation between TEAC and EC values of the different fractionated extracts of three fruit peels
- Fig. 5. Correlation between TEAC values and total phenolic contents of the different extracts
- Fig. 6. Correlation of EC values and total phenolic contents of the different extracts
- Fig. 7. Dose-response curves of viability of KB cell line (A), Caco-2 cell line (B), and PBMC cells (C) and concentration of **fractionated peel** extracts of **coconut**
- Fig. 8. Dose-response curves of viability of KB cell line (A), Caco-2 cell line (B), and PBMC cells (C) and concentration of fractionated peel extracts of rambutan**
- Fig. 9. Dose-response curves of viability of KB cell line (A), Caco-2 cell line (B), and PBMC cells (C) and concentration of fractionated peel extracts of mangosteen**

Table 1

Yields of the ethanolic extracts (% w/w) and total phenolic content from the fruit peels of three plants

Plant names		Sample	Yield	GAE
		Code	(%, w/w)	(mg/mL)
Common name	Scientific name			
Coconut	<i>Cocos nucifera</i>	CP	5.8	0.63 ± 0.03
Rambutan	<i>Nephelium lappaceum</i>	RP	10.7	0.72 ± 0.05
Mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i>	MP	7.2	0.68 ± 0.06

Table 2

Yields and total phenolic content of **fractionated plant peel** extracts

Plant	Solvent	Sample code	Yield (%, w/w)	GAE (mg/mL)
Coconut	hexane	HCP	0.6	0.30 ± 0.01
	ethyl acetate	ECP	3.7	1.31 ± 0.01
	butanol	BCP	4.1	1.06 ± 0.04
	methanol	MCP	15.9	0.67 ± 0.07
Rambutan	hexane	HRP	0.6	0.29 ± 0.01
	ethyl acetate	ERP	3.0	2.28 ± 0.02
	butanol	BRP	7.4	1.73 ± 0.03
	methanol	MRP	25.5	2.05 ± 0.11
Mangosteen	hexane	HMP	0.9	0.09 ± 0.01
	ethyl acetate	EMP	5.5	1.16 ± 0.17
	butanol	BMP	11.6	0.49 ± 0.05
	methanol	MMP	18.8	1.64 ± 0.06

Table 3

IC₅₀ and ED₅₀ values of the **fractionated peel** extracts for KB cell line, Caco 2 cell line and PBMC normal cells

Fractionated Extracts	KB		Caco-2		PBMC	
	IC ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ (µg/ml)
HCP	7.7 ± 0.5	ND	ND	>100	>100	ND
ECP	ND	13.4 ± 5.6	ND	48.3±2.7	ND	>100
BCP	ND	33.5 ± 1.3	ND	>100	ND	>100
MCP	>100	ND	ND	>100	ND	>100
HRP	ND	>100	>100	ND	ND	>100.
ERP	>100	ND	>100	ND	ND	>100
BRP	ND	15.7±6.9	>100	ND	ND	>100
MRP	ND	9.8±3.4	>100	ND	ND	>100
HMP	97.4±17.7	ND	13.0±3.8	ND	13.4±1.8	ND
EMP	24.3±0.3	ND	8.1±0.1	ND	5.9±0.2	ND
BMP	8.2±1.6	ND	33.7±2.8	ND	24.2±1.2	ND
MMP	ND	>100	98.8±2.8	ND	11.3±0.2	ND
Tamoxifen	ND	ND	4.0±0.4	ND	4.0±0.7	ND

ND = Not detectable

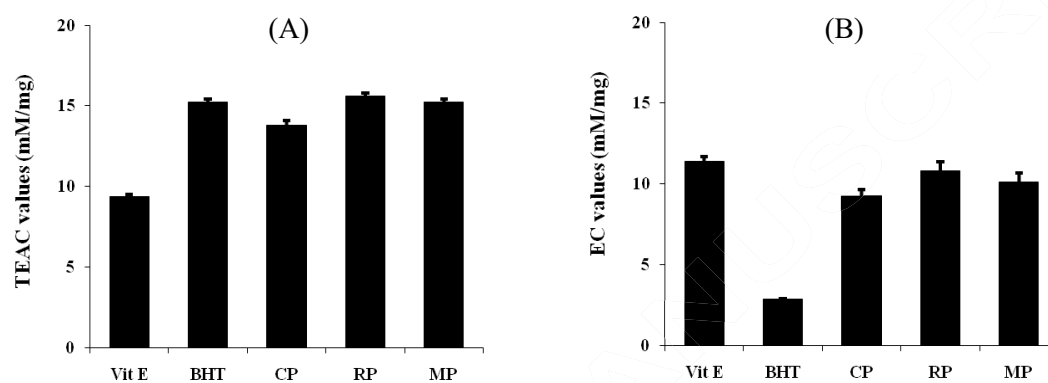


Figure 1

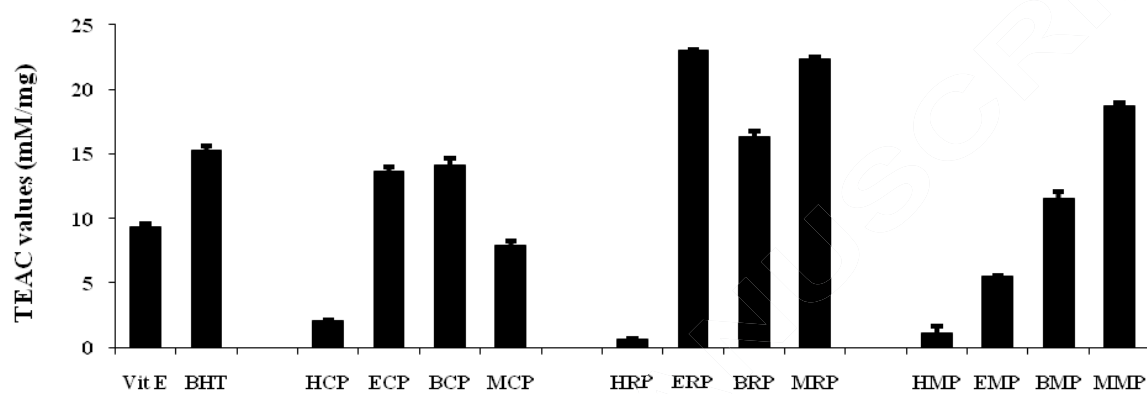


Figure 2

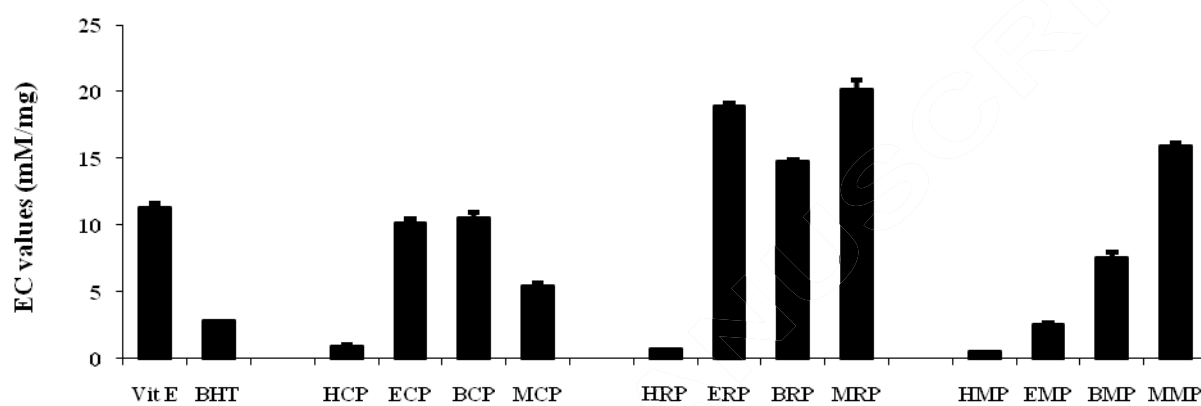


Figure 3

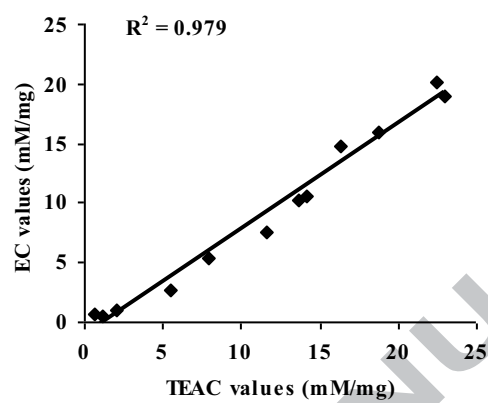


Figure 4

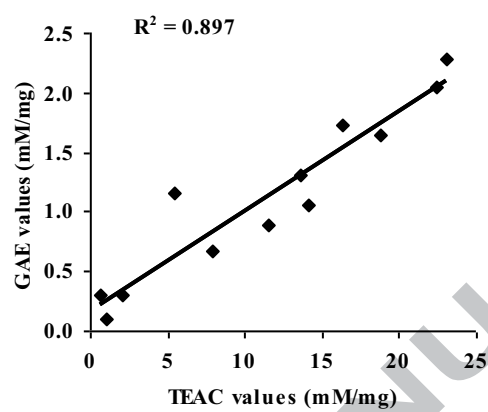


Figure 5

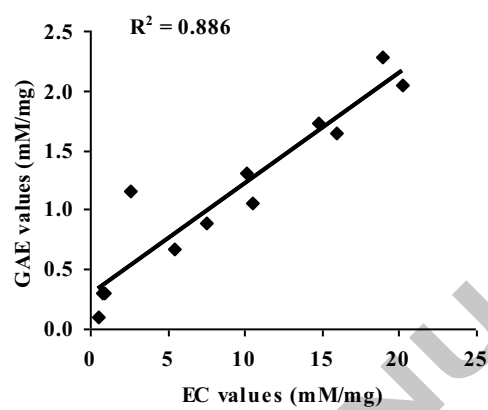
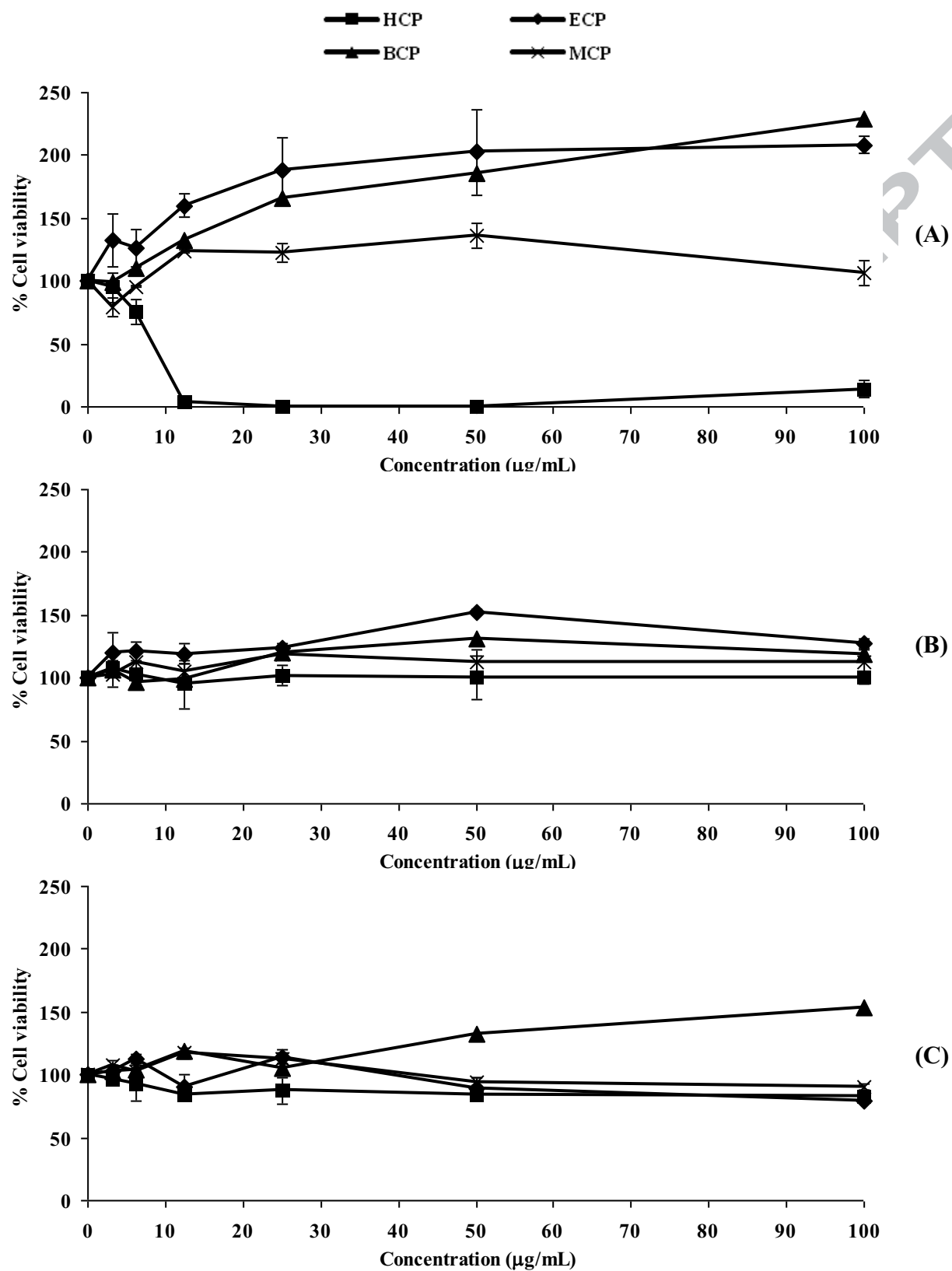
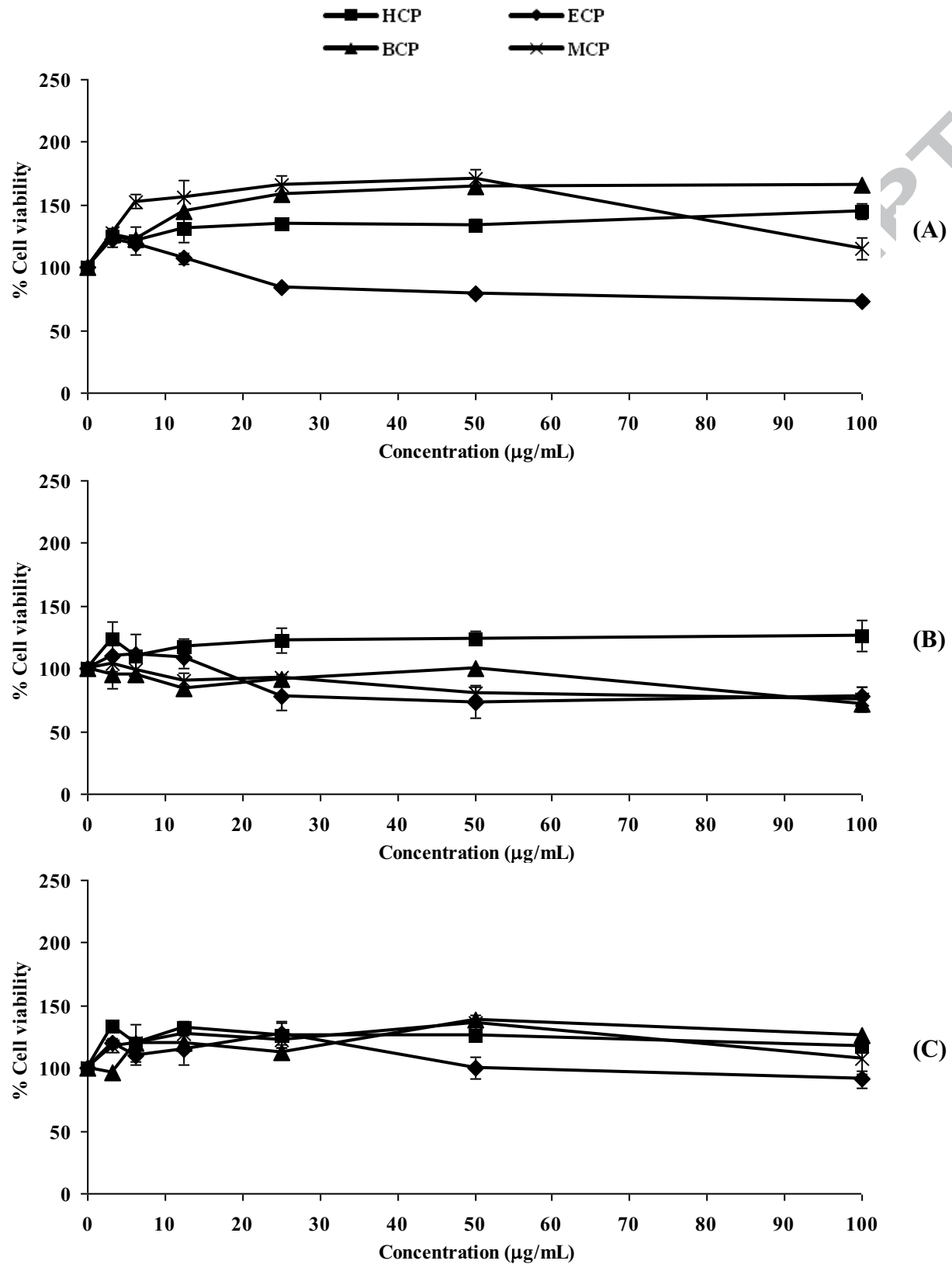
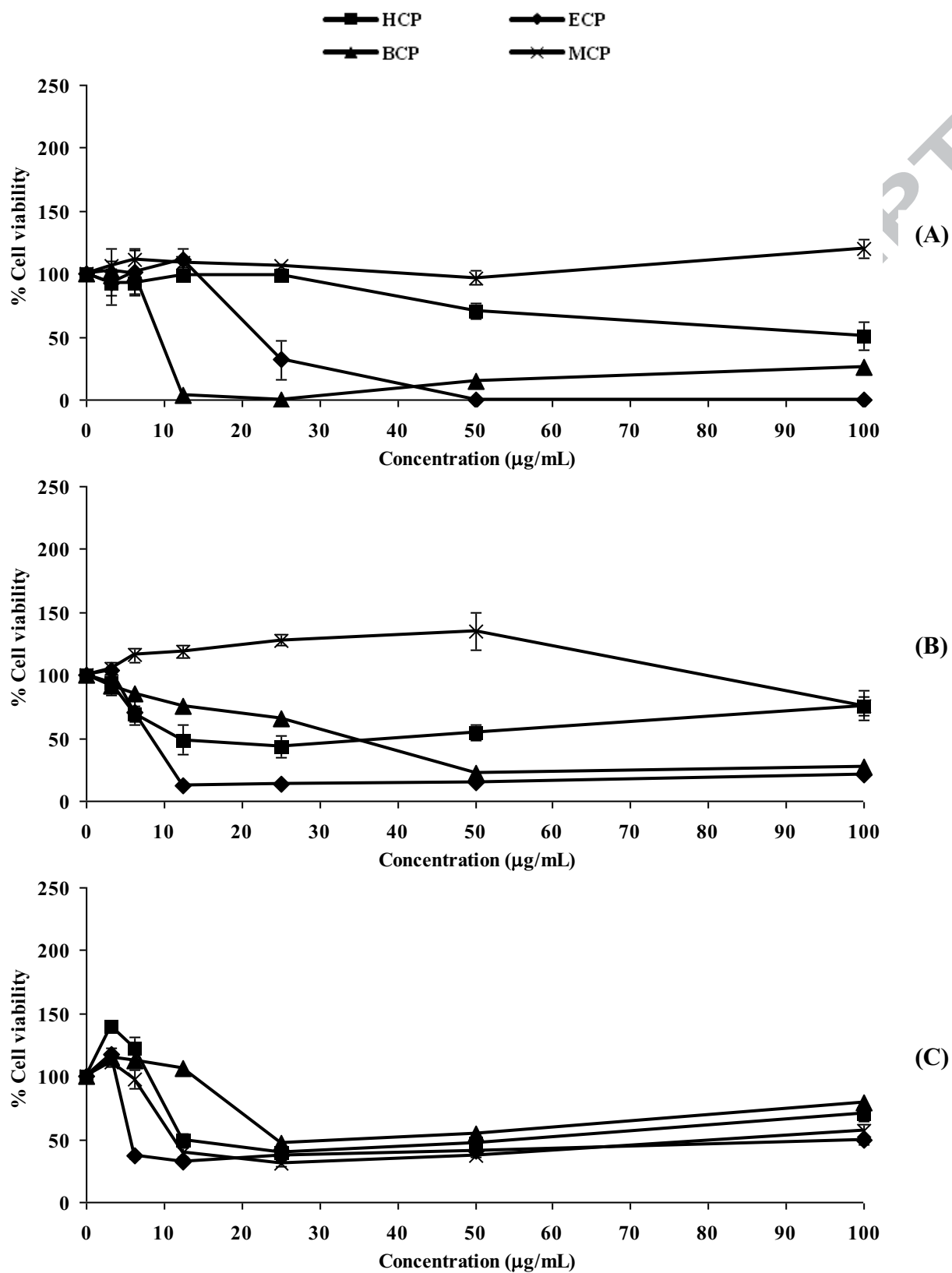


Figure 6

**Figure 7**

**Figure 8**

**Figure 9**

Elsevier Editorial System(tm) for Food and Chemical Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number: FCT-D-10-00203R1

Title: Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines

Article Type: Full Length Article

Keywords: Cytotoxicity; human cell lines, antioxidant, rambutan; coconut; mangosteen

Corresponding Author: Dr. Siriporn Okonogi, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University

First Author: Ruttiros Khornkarn

Order of Authors: Ruttiros Khornkarn; Siriporn Okonogi, Ph.D.; Chadarat Ampasavate; Songyot Anuchapreeda

Abstract: The aim of this study was to evaluate antioxidant activity and cytotoxicity against human cell lines of fruit peel extracts from rambutan, mangosteen and coconut. The highest antioxidant activity was found from rambutan peel crude extract where the highest radical scavenging capacity via ABTS assay was from its ethyl acetate fraction with a TEAC value of 23.0 mM/mg and the highest ferric ion reduction activity via FRAP assay was from its methanol fraction with an EC value of 20.2 mM/mg. Importantly, using both assays, these fractions had a higher antioxidant activity than butylated hydroxyl toluene and vitamin E. It was shown that the ethyl acetate fraction of rambutan peel had the highest polyphenolic content with a gallic acid equivalent of 2.3 mg/mL. The results indicate that the polyphenolic compounds are responsible for the observed antioxidant activity of the extracts. Interestingly, the hexane fraction of coconut peel showed a potent cytotoxic effect on KB cell line by MTT assay ($IC_{50} = 7.7 \mu\text{g/mL}$), and no detectable cytotoxicity toward normal cells. We concluded that the ethyl acetate fraction of rambutan peel is a promising resource for potential novel antioxidant agents whereas the hexane fraction of coconut peel may contain novel anticancer compounds.

Original Article

Effect of bioflavonoids on MMP-3 and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line

Kanokkarn PHROMNOI¹, Supachai YODKEEREE¹, Songyot ANUCHAPREEDA², Pornngarm LIMTRAKUL^{1,*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand; ²Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Aim: Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3; MMP-3) is an enzyme known to be involved in tumor invasion and metastasis. In this study, flavonoids from vegetables and fruits, such as quercetin, kaempferol, genistein, genistin, and daidzein, were tested for their ability to modulate the secretion and activity of MMP-3 in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. In addition, we investigated the *in vitro* effects of flavonoids on MDA-MB-231 cell invasion.

Methods: The toxic concentration range of flavonoids was evaluated using the MTT assay. The ability of MDA-MB-231 cells to invade was evaluated using a modified Boyden chamber system. The activity of MMP-3 was determined by casein zymography. The secretion of MMP-3 was evaluated using western blotting, casein zymography and confirmed by ELISA.

Results: Some putative flavonoids, *ie*, quercetin and kaempferol (flavonols), significantly inhibited the *in vitro* invasion of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner, with IC₅₀ values of 27 and 30 µmol/L, respectively. Quercetin and kaempferol also reduced MMP-3 activity in a dose-dependent manner, with IC₅₀ values in the range of 30 µmol/L and 45 µmol/L, respectively. None of the flavonoids had a significant effect on the secretion of MMP-3.

Conclusion: These data show that the flavonols quercetin and kaempferol have higher anti-invasion potency and higher MMP-3 inhibitory activity than isoflavones genistein, genistin and daidzein. In contrast, neither flavonols nor isoflavones have any effect on MMP-3 secretion.

Keywords: matrix metalloproteinase 3 (MMP-3); invasion; flavonoids; MDA-MB-231 breast cancer cell; casein zymography

Acta Pharmacologica Sinica advance online publication, 11 May 2009; doi: 10.1038/aps.2009.107

Introduction

Metastatic invasion is the primary cause of patient mortality during breast cancer progression. For a transformed cell to metastasize to a distant site in the body, it must first lose adhesion, penetrate and invade the surrounding extracellular matrix (ECM), enter the vascular system, and adhere to distant organs^[1]. The inhibition of invasion of cancer cells has been an important strategy in cancer treatment^[2]. A crucial step in the invasive processes is the proteolytic degradation of the ECM and basal membranes^[3]. Several studies have shown that among the enzymes responsible for ECM degradation, the matrix metalloproteinases (MMPs) appear to play a critical role^[4–6]. MMPs are zinc-dependent endopeptidases, which

collectively can degrade all constituents of the ECM. Based on their structure and substrate specificity, they can be divided into subgroups of collagenases, stromelysins, gelatinases, membrane-type MMPs and other MMPs^[7].

Breast cancer is the major cause of malignancy-related deaths of women worldwide. In Thailand, breast cancer is the second most common cancer among women and its incidence is increasing^[8]. Cancer invasion and metastasis are leading causes of morbidity and mortality in patients with breast cancer. Several studies have demonstrated that upregulation of MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, and -14 is associated with breast cancer cell invasion^[9–11].

MMP-3, also designated stromelysin 1, is a member of the matrixin family, which plays a pivotal role in the degradation and remodeling of the ECM. MMP-3 degrades several components of the ECM, such as fibronectin, laminin, collagen type IV^[12–14] and proteoglycans, and is thought to play an important role in rheumatoid arthritis, osteoarthritis^[15,16], tumor cell inva-

* To whom correspondence should be addressed. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

E-mail plimtrak@mail.med.cmu.ac.th

Received 2009-03-26 Accepted 2009-05-31

sion and metastasis^[17]. Previous studies have demonstrated that the most invasive breast cancers exhibit the highest levels of MMP-3, while cells with an intermediate level of invasiveness have lower expression levels of MMP-3; noninvasive human breast cancer cells have undetectable levels of MMP-3. Recently, experimental evidence has shown that specific down-regulation of MMP-3 by anti-sense gene transfer leads to a loss of breast cancer invasion^[18]. In addition, inhibition of MMP-3 activity with synthetic inhibitors reduces the invasion and migration of various human malignant cell lines^[19,20]. Therefore, every level of regulation of MMP-3 expression and activity has been considered as a possible target for therapeutic intervention^[21].

Flavonoids, 2-phenyl-benzo- α -pyrones, are polyphenolic compounds that occur ubiquitously in fruits, vegetables, and plant-derived beverages^[22]. These compounds possess a common phenylbenzopyrone structure (C6-C3-C6), with one or more hydroxyl substituents (Figure 1). They are categorized (according to the saturation level and opening of the central pyran ring) primarily into flavonols, flavones, flavanols, isoflavones, flavonones, and flavanonols. These polyphenolic compounds have several biological activities, which include anti-mutagenic, antiproliferative and antioxidant effects, as well as involvement in cell signaling, cell cycle regulation and angio-

genesis^[23]. Furthermore, an increasing number of *in vitro* and *in vivo* studies have been conducted on the potential anti-metastasis activity of flavonoids in various tumor cells including human breast cancer. For example, quercetin and genistein have been shown to reduce human breast cancer cell invasion via down-regulation of MMP-1, -2, and -9 expression^[24-26]. In an *in vivo* study, intraperitoneal administration of quercetin into syngeneic mice resulted in significant inhibition of lung colonization in a dose-dependent manner^[27]. Moreover, kaempferol, genistin and daidzein inhibited MDA-MB-231 cell invasion, with a concomitant reduction in the expression of ECM degradation enzymes^[28].

However, the correlation between MMP-3 and flavonoids *in vitro* remains unclear. In the present study we designed experiments to compare the effect of flavonoids in the form of flavonols (quercetin and kaempferol) and isoflavones (genistein, genistin and daidzein) on MMP-3 secretion, MMP-3 activity and invasive activity in MDA-MB-231 human invasive breast cancer cells. Our results demonstrate that the flavonols quercetin and kaempferol show higher anti-invasion potency and better MMP-3 inhibitory activity than isoflavones.

Materials and methods

Materials

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with or without phenol red, penicillin-streptomycin, and trypsin-EDTA was purchased from GIBCO-BRL (Grand island, NY, USA). Fetal bovine serum was purchased from Hyclone (Logan, Utah, USA). The antibody against MMP-3 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Matrigel was purchased from Becton Dickinson (Bedford, MA, USA). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), β -casein, quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Cell lines and culture conditions

MDA-MB-231, a highly invasive breast carcinoma cell, was grown in Leibovitz L-15 medium with 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 10% heat-inactivated FBS. The cells were grown as a monolayer at 37 °C in a humidified atmosphere without CO₂. MCF-7, a non-invasive breast carcinoma cell, and NIH3T3 fibroblasts cells were grown in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 10% heat-inactivated FBS. Cultures were grown as a monolayer at 37 °C in a 5% CO₂ /95% air atmosphere.

MTT assay for cell viability

Cell viability was measured by the conventional MTT reduction assay as previously described^[29]. Briefly, MDA-MB-231 cells were inoculated at a density of 5×10^3 cells/well in 96 well plates for 24 h in 100 μ L of DMEM with 10% FCS. Following seeding, the culture supernatant was removed and serum-free DMEM medium containing various concentrations of quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein was added and the cells were incubated for 24 and 48 h. MTT dye (10

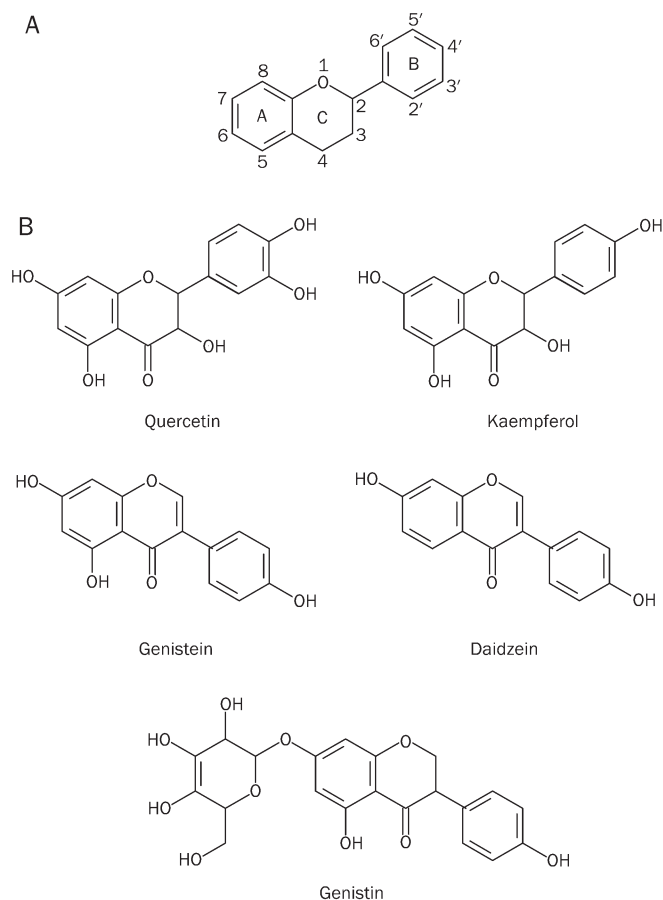


Figure 1. Nuclear structure of flavonoids (A). Structure of the different flavonoids tested in this study (B).

μL , 5 mg/mL) was added to each well and the plate was incubated for an additional 4 h. The absorbance of MTT-formazan was measured using a microplate reader at 540 nm with a reference wavelength of 630 nm.

Cell invasion assay

The invasive behavior of MDA-MB-231 cells was tested using the modified Boyden chamber assay^[30]. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filters (Millipore, Co Cork, Ireland) (8 μm pore sized) were coated with Matrigel (10 μg /filter). The lower chamber contained serum-free conditioned medium from NIH 3T3 fibroblast cells, which acts as a chemoattractant. MDA-MB-231 cells (1.25×10^5 cells/chamber) were plated onto the upper chamber with or without various concentrations of flavonoids and incubated for 6 h at 37 °C, 5% CO_2 . After incubation, the noninvading cells were removed from the upper surface of the membrane. The invading cells on the lower surface of the membrane were fixed with methanol for 1 min and stained with toluidine blue for 5 min. The cells that had actively migrated to the underside surface of the filter were dissolved with 20% acetic acid and indirectly quantified by measuring the absorbance at 570 nm. A control experiment was performed in the absence of chemoattractant. The results of duplicate independent experiments were averaged after background subtraction.

Preparation of conditioned media

MDA-MB-231 cells (1×10^6 cells) were seeded into a 75-mm³ T flask and maintained for 24 h in DMEM with 10% FBS. Subconfluent cell cultures were incubated for 48 h with various non-toxic concentrations of flavonoids in serum-free DMEM without phenol red. After treatment, the culture supernatant was collected and concentrated with Amicon-Ultra4 (Millipore, Co Cork, Ireland) for further studies.

Casein zymography

To determine MMP-3 activity in conditioned culture medium, MDA-MB-231 cells were incubated in serum-free DMEM without phenol red for 24 h at 37 °C in a 5% CO_2 /95% air atmosphere. The culture supernatant was collected and concentrated with Amicon-Ultra4 (Millipore, Co Cork, Ireland). Ten micrograms of unheated protein from concentrated culture supernatants underwent electrophoresis under non-reducing conditions in 0.2% *w/v* casein-containing 10% polyacrylamide gels (PAGE) in the presence of SDS. Gels were washed twice for 60 min in 2.5% Triton X 100 to remove SDS and subsequently incubated in Tris buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2 , pH 7.4) in the presence of various concentrations of flavonoids (0, 5, 25, and 50 $\mu\text{mol/L}$) and phenantroline 50 $\mu\text{mol/L}$ (positive control) for 48 h at 37 °C. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R (0.1% *w/v*) and destained in 30% methanol, 10% acetic acid. Caseinolytic activity appeared as a clear band on a blue background. Digestion bands were quantified by Bio 1 D software (Viber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

To evaluate MMP-3 secretion by casein zymography, MDA-

MB-231 cells were incubated in serum-free DMEM without phenol red containing various concentrations of flavonoids (0, 10, 20, or 30 $\mu\text{mol/L}$). Ten micrograms of unheated protein from concentrated culture supernatants were subjected to electrophoresis under non-reducing conditions in 0.2% *w/v* casein-containing/10% polyacrylamide gels in the presence of SDS. Gels were washed, stained and destained as described above.

Western blot analysis of MMP-3

To investigate the effect of flavonoids on the secretion of MMP-3, western blot analysis was performed. Equal amounts of concentrated conditioned media proteins from control and treated cells were resuspended in sample buffer and separated by SDS-PAGE, using 10% acrylamide gels. After electrophoresis, proteins were electroblotted to a Hybond-C Extra nitrocellulose membrane (Amersham). The membrane was blocked at room temperature (RT) with 4% BSA in TBST (20 mmol/L Tris pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.3% Tween 20) for 2 h. Membranes were further probed with mouse monoclonal antibody against MMP-3 in 4% BSA in TBST (1:200; Santa Cruz Biotechnology, USA) at 4 °C overnight. The blots were washed in TBST and probed with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (1:5,000; Chemicon, France). After incubation, the immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence and exposed to X-ray film (Kodak, Windsor, Colorado, USA) for 30–60 min.

MMP-3 ELISA

To further confirm the effect of flavonoids on MMP-3 secretion, human MMP-3 double-sandwiched ELISA was performed using commercial ELISA kits according to the manufacturer's protocol (Calbiochem). Briefly, 50 μL standard dilutions of recombinant human MMP-3 or experimental conditioned media and biotinylated detector monoclonal antibody were aliquoted into a 96-well microtiter plate coated with mouse anti-MMP-3 monoclonal antibody. The plate was sealed, incubated at RT for 2 h, and washed three times with 1 $\times$ washing buffer; 100 μL diluted horseradish peroxidase conjugated to streptavidin was added and incubated for 30 min at RT and subsequently washed three times. Aliquots of 100 μL of the color reagent 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were then applied for 30 min to develop a blue color, and the reaction was stopped by adding 100 μL of 2.5 mol/L sulfuric acid. Absorbance was read at 450 nm by a spectrophotometric plate reader with a reference wavelength of 595 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA. $P < 0.05$ or $P < 0.01$ were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS 13.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

In vitro cytotoxicity assay

The effect of flavonoids on cell viability was measured by the MTT assay. As shown in Figure 3, MDA-MB-231 cells treated

with the indicated amounts of quercetin, kaempferol and daidzein (0–100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h showed a concentration-dependent inhibition of cell proliferation. Genistein and genistin did not show pronounced effects on cell viability. After a 24 h incubation, MDA-MB-231 cells showed eighty percent viability when treated with bioflavonoids at concentrations below 60 $\mu\text{mol/L}$. The IC_{50} values at 48 h incubation calculated from the dose effect curve were 44.3 ± 21.7 , 60.0 ± 16.3 , >100 , >100 , and 65 ± 15 $\mu\text{mol/L}$ for quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein, respectively (Figure 2).

Effect of flavonoids on invasion activity

Cell invasion assays were performed with non-cytotoxic concentrations (10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$) of bioflavonoids. The invasive behavior of MDA-MB-231 was tested using the modified Boyden chamber assay. MDA-MB-231 cells have the ability to invade through Matrigel. MDA-MB-231 cells were treated with quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein (0, 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$) for 6 h. Quercetin and kaempferol significantly inhibited the ability of the MDA-MB-231 cells to penetrate the reconstituted basement membrane, with an inhibitory concentration at 50% of control (IC_{50}) values of 27 and 30 $\mu\text{mol/L}$, respectively. In contrast, genistein, genistin and daidzein had minimal effects on cell invasion even at high concentrations (Figure 3).

Effect of flavonoids on activity of MMP-3 in MDA-MB-231 cell lines

Matrix metalloproteinases are key enzymes involved in the process of cancer cell invasion. Concentrated serum-free

media revealed digested bands at 57 and 45 kDa, corresponding to proMMP-3 and active MMP-3, respectively (Figure 4). The activity of MMP-3 was reduced by quercetin and kaempferol with IC_{50} values of 30 and 45 $\mu\text{mol/L}$, respectively. In contrast, the activity of MMP-3 was unaffected by genistein, genistin and daidzein treatment.

Effect of flavonoids on secretion of MMP-3 in MDA-MB-231 cell lines

To elucidate the effect of flavonoids on MMP-3 secretion, western blot analysis and casein zymography were carried out. MDA-MB-231 cells (1×10^6 cells) were incubated with quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein at 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h. The secretion of MMP-3 was unaffected by treatment with flavonoids (Figure 5). To confirm these results the experiment was repeated using ELISA (data not shown). For the three methods, all tested flavonoids had no effect on MMP-3 secretion.

Discussion

Invasiveness or migration through the extracellular matrix (ECM) is a fundamental property of malignant cancer cells. It has been shown that elevated expression of different MMPs is associated with different metastatic stages in the progression of various types of tumors^[31]. We found that the level of MMP3 in MDA-MB-231 (highly invasive breast cancer cells) was four-fold higher than that in MCF-7 (poorly invasive breast cancer cells), suggesting that the expression levels of MMP3 correlate with the metastatic potential of cancer cells. Elevated levels of MMPs are generally thought to contribute

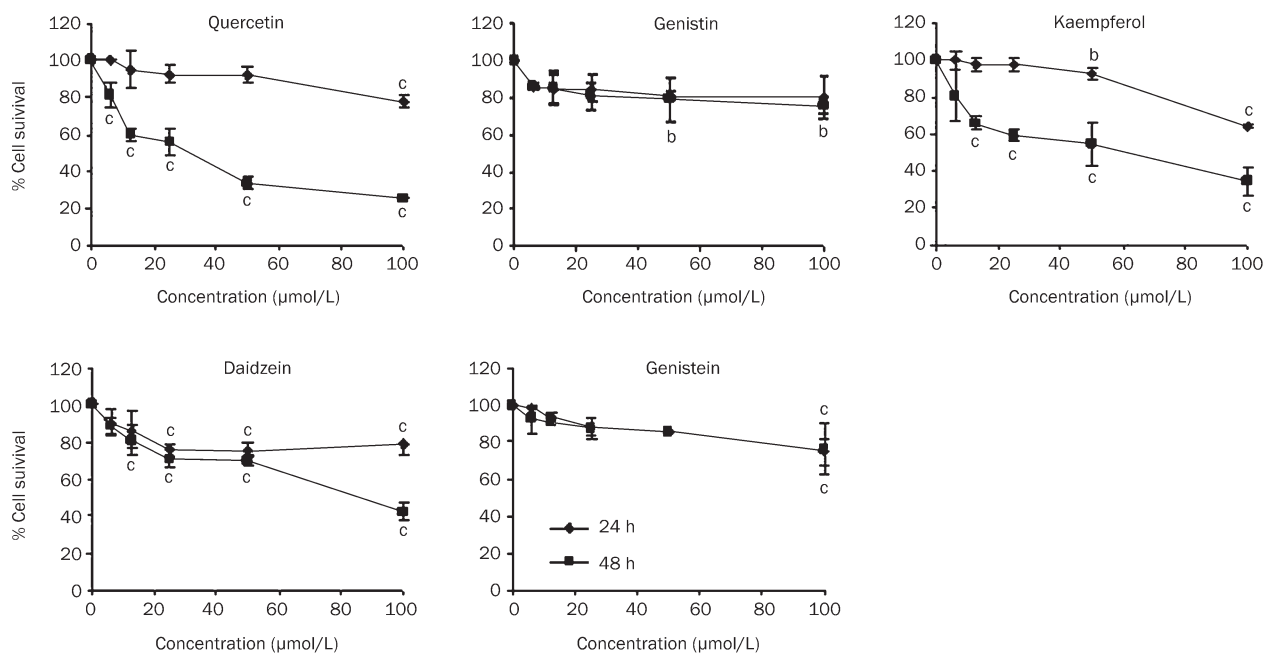


Figure 2. Effect of flavonoids on cell viability in MDA-MB-231 cells. Cells were exposed to the indicated amounts of each flavonoids (0, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 and 48 h. The number of viable cells was determined by MTT assay. Viable cells were expressed as a percentage of untreated control cultures for each line. Results represent the mean $\pm$ SD of three different experiments performed in triplicates. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA. ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ was considered statistically significant.

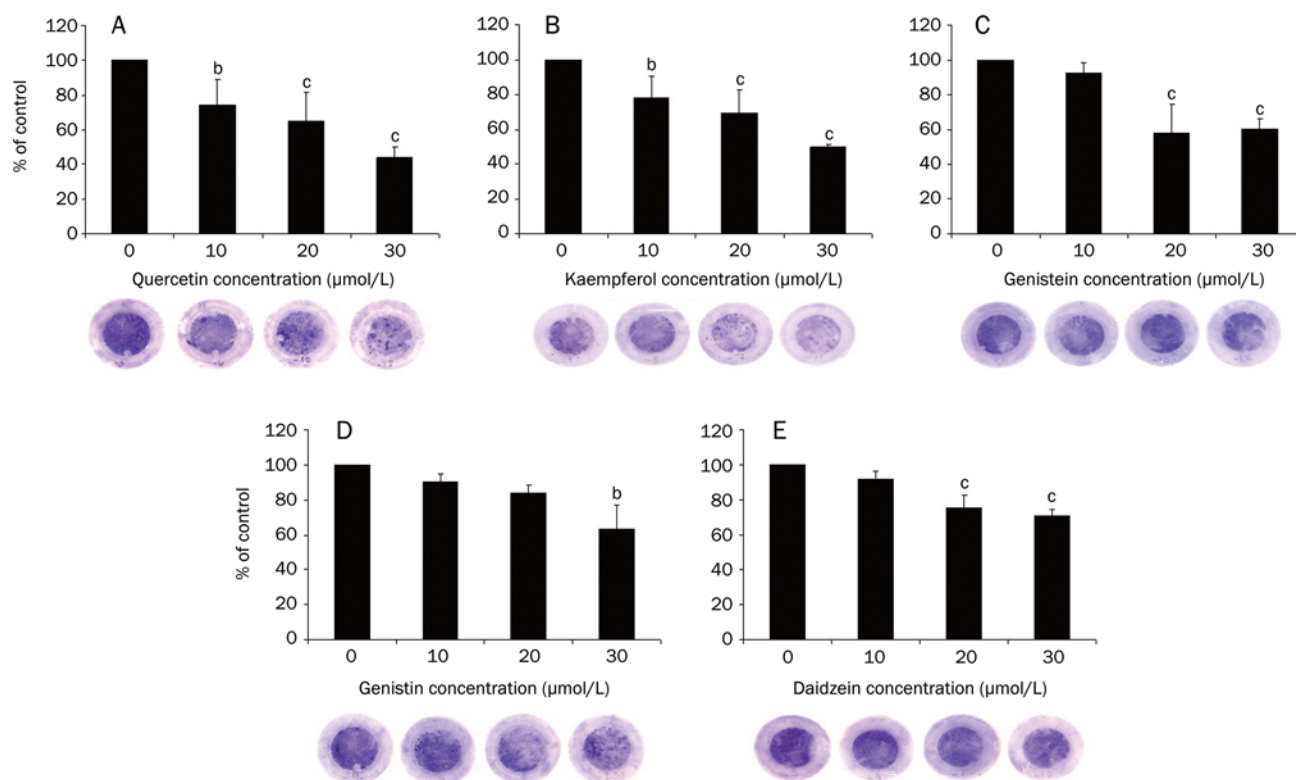


Figure 3. Effect of flavonoids on MDA-MB-231 cells invasion. MDA-MB-231 cells were seeded onto a Matrigel-coated filter containing quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein as various indicated concentrations (0, 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$), incubated for 6 h in 37 °C. The cells that active migrated to lower surface of filters were quantitated as described in material and methods. Invasion was expressed as a percentage of control. The data represent the mean $\pm$ SD of three-independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA. ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$ were considered statistically significant.

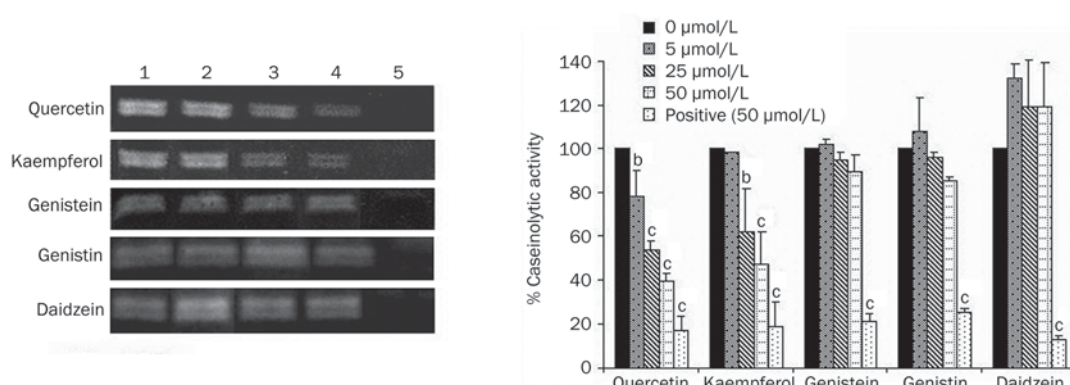


Figure 4. Effect of flavonoids on the caseinolytic activity of MMP-3 as determined by the casein zymography assay. Condition media of MDA-MB-231 were collected and concentrated and subjected to electrophoresis. The gels were washed, incubated with various concentrations of flavonoids (0, 5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) and phenantroline 50 $\mu\text{mol/L}$ (positive control) for 48 h at 37 °C, stained and destained as described in Methods. Caseinolytic activity appeared as a clear band on a blue background. 1: Negative control; 2: 5 $\mu\text{mol/L}$; 3: 25 $\mu\text{mol/L}$; 4: 50 $\mu\text{mol/L}$; 5: phenantroline 50 $\mu\text{mol/L}$ (positive control). The relative caseinolytic activity of MMP-3 were quantified by Bio 1D software (Viber Lourmat, Marne-la-Vallée, France), where the untreated group represented 100%. The data represent the mean $\pm$ SD of three-independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA. ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$ were considered statistically significant.

to tumor progression. More recently it has become clear that a complex dual role in tumor progression exists for some MMPs, such as MMP-3^[32]. Conflicting results have been published

regarding the role of MMP-3 in tumorigenesis and metastasis. A recent study showed an acceleration of the growth of lymphoma cells that constitutively express MMP-3 when the

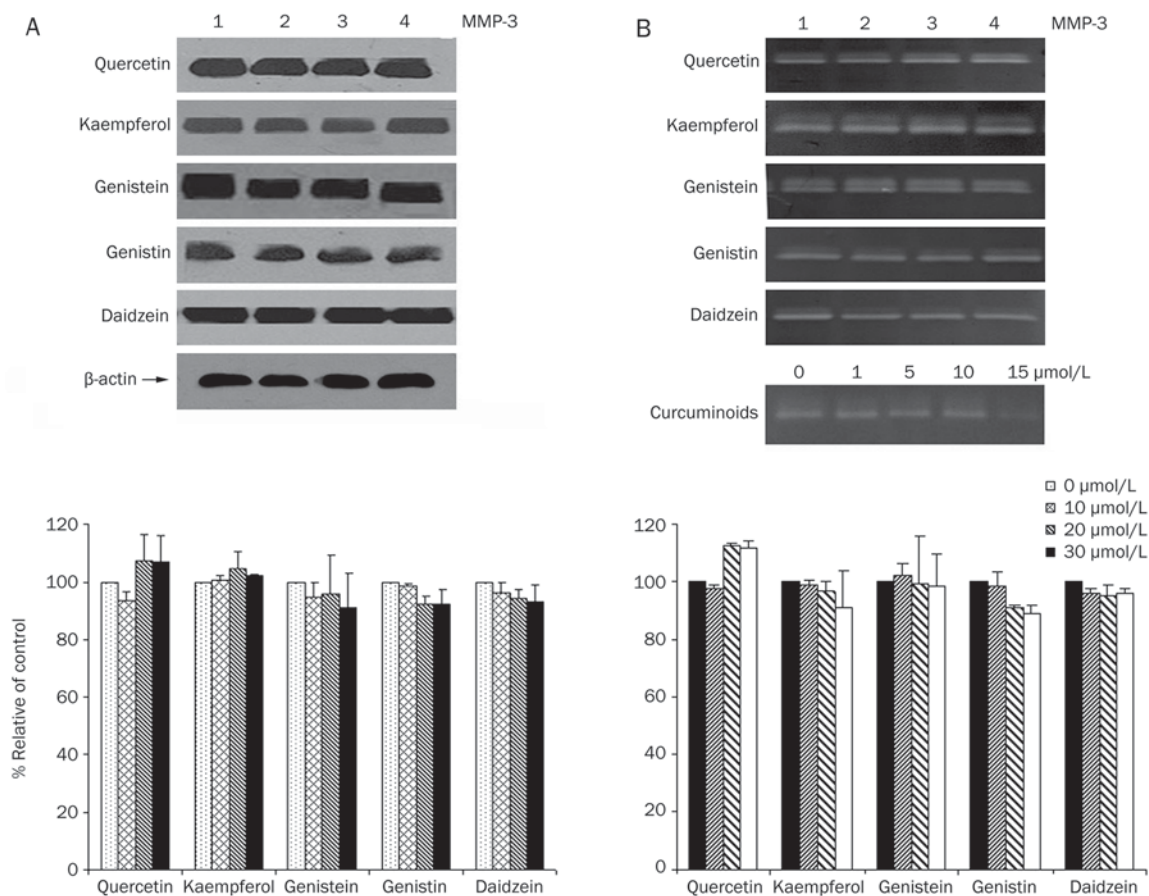


Figure 5. Effect of flavonoids on MMP-3 secretion in MDA-MB-231 cell as determined by Western blot analysis (A) MDA-MB-231 cells were treated with 0, 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein for 48 h, conditioned medium was collected and concentrated for MMP-3 determination. Equal amount of proteins was loaded (80 $\mu\text{g/lane}$). 1: Negative control; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$; 4: 30 $\mu\text{mol/L}$ and casein zymography (B) Condition media of MDA-MB-231 were collected and concentrated and subjected to electrophoresis. The gels were washed, incubated with various concentrations of flavonoids (0, 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h at 37°C, stained and destained as described in Methods. Caseinolytic activity appeared as a clear band on a blue background. 1: Negative control; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$; 4: 30 $\mu\text{mol/L}$; Curcuminoids treatment at 0–15 $\mu\text{mol/L}$ were used as a positive control. The band intensity of MMP-3 secretion by both assays was quantitated by Bio 1 D (Viber Lourmat, Marne-la-Vallée, France, where the untreated group represented 100%. The data represent the mean $\pm$ SD of three-independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA.

cells were injected intrathymically into mice^[33]. In contrast, other studies have shown that genetic ablation of MMP-3 does not significantly affect tumor growth and metastasis in the MMTV-PyMT model^[34]. The transcriptional changes of other MMPs and their specific inhibitors in the MMTV-PyMT model may complicate the metastatic outcome. Overall, these results suggest that the expression of a single metalloproteinase, stromelysin 1, is insufficient for the progression of mammary adenocarcinomas to an invasive and metastatic phenotype. However, matrix degradation by MMPs can alter the basic processes of cell proliferation and apoptosis.

The chemopreventive effect of the flavonoids, flavonols (quercetin and kaempferol) and isoflavones (genistein, genistin and daidzein) has been observed through the suppression of cell proliferation^[35], inhibition of angiogenesis^[36], inhibition of invasion^[37] and stimulation of apoptosis in breast carcinoma cells^[38]. The inhibition of invasion of cancer cells is of great

significance in cancer treatment. Little is known about the interaction of MMP-3 and flavonoids in human breast carcinoma cells. Therefore, we examined the effects of flavonoids on MMP-3 secretion, MMP-3 activity and invasive activity using MDA-MB-231 cells in our experiments.

This study examined the effect of flavonoids on the invasive behavior of MDA-MB-231 using the modified Boyden chamber assay. As shown in Figure 3, quercetin and kaempferol significantly inhibited the ability of the MDA-MB-231 cells to penetrate the reconstituted basement membrane. In contrast, genistein, genistin and daidzein did not significantly affect cell invasion at high concentrations, suggesting that the flavonols (quercetin and kaempferol) have higher anti-invasion potency than the isoflavones (genistein, genistin and daidzein). As MMP-3 has been reported to play a role during the migratory and invasive processes of cancer, it is necessary to determine whether flavonoids can inhibit the invasiveness of tumor cells.

Our results help clarify whether flavonoids can inhibit MMP-3 enzyme activity in MDA-MB-231 cells. Flavonols (quercetin and kaempferol) inhibited the activity of MMP-3. In contrast, the activity of MMP-3 was unaffected by genistein, genistin and daidzein treatment (Figure 4). In addition, we found that genistein could inhibit MDA-MB-231 cell invasion, but to a lesser extent than quercetin or kaempferol (Figure 3). However, it seemed to have no effect on the activity of MMP-3 (Figure 4). Possible mechanisms of genistein-mediated inhibition of MDA-MB-231 invasion include down-regulation of the transcription of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP, and up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)^[39,40]. Furthermore, Magee and coworkers^[41] demonstrated that other phytoestrogens, including genistein, inhibit MDA-MB-231 cell invasion without affecting cell viability. Consistent with our findings, bioflavonoids used at the concentrations in the cell invasion assay (up to 30 $\mu\text{mol/L}$) had no effect on cell viability.

MMP proteolytic activity is regulated at three levels: transcription, proenzyme activation, and inhibition. We found that flavonoids (both flavonols and isoflavones) had no effect on MMP-3 secretion (Figure 5). In accordance with these results, quercetin and kaempferol markedly inhibited the caseinolytic activity of MMP-3 and inhibited breast cancer cell invasion, suggesting a relationship between the metastatic potential and MMP-3 activity. Indeed, batimastat (BB-94) and marimastat (BB-2516), two specific inhibitors of MMPs in clinical trials, have been found to reduce tumor metastasis^[42]. Inostamycin, an inhibitor of cytidine 5'-diphosphate 1,2-diacyl-sn-glycerol (CDP-DG, inositol transferase), has been found to suppress the invasion of HSC-4 tongue carcinoma cells by reducing the gelatinolytic activities of pro-MMP-9 and pro-MMP-2^[43]. Considering that the dietary flavonols like quercetin and kaempferol are very safe and exhibit anticancer activities against a wide variety of tumors, we suggest that they can also be used to suppress the progression of the metastatic process in breast carcinoma cells by reducing MMP-3 activity.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the National Research Council of Thailand (NRCT). Kanokkarn Promnoi and Supachai Yodkeeree are PhD students under the Royal Golden Jubilee PhD Program of Thailand.

Author contribution

Pornngarm LIMTRAKUL designed the research and provided financial support; Kanokkarn PHROMNOI and Supachai YODKEEREE performed experiments; Pornngarm LIMTRAKUL, Kanokkarn PHROMNOI and Songyot ANUCHAPREEDA analyzed data; Pornngarm LIMTRAKUL and Kanokkarn PHROMNOI wrote the paper.

References

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
- Liu J, Zhang X, Yang F, Li T, Wei D, Ren Y. Antimetastatic effect of a

- lipophilic ascorbic acid derivative with antioxidation through inhibition of tumor invasion. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 584–90.
- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300–8.
- De CY, Szpirer C, Aly MS, Cassiman JJ, Eeckhout Y, Rousseau G. The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics* 1992; 14: 782–4.
- Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 1996; 3: 895–904.
- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781–92.
- Denys H, De WO, Nussgens B, Kong Y, Sciort R, Le AT, et al. Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br J Cancer* 2004; 90: 1443–9.
- Sriplung H, Wiangnon S, Sontipong S, Sumitsawan Y, Martin N. Cancer incidence trends in Thailand, 1989–2000. *Asian Pac J cancer Prev* 2006; 7: 239–44.
- Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, et al. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells *in vitro*. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 171–8.
- Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274: 13066–76.
- Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL, Weiss SJ. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 2006; 20: 2673–86.
- Murphy GJ, Murphy G, Reynolds JJ. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* 1991; 289: 4–7.
- Wu JJ, Lark MW, Chun LE, Eyre DR. Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. *J Biol Chem* 1991; 266: 5625–8.
- Siri A, Knauper V, Veirana N, Caocci F, Murphy G, Zardi L. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 8650–4.
- Okada Y, Takeuchi N, Tomita K, Nakanishi I, Nagase H. Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 645–53.
- Firestein GS, Paine MM and Littman BH. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1094–105.
- Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 891–7.
- Hegedus L, Cho H, Xie X, Eliceiri GL. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol* 2008; 216: 480–5.
- Heikkilä P, Teronen O, Moilanen M, Konttinen YT, Hanemaaijer R, Laitinen M, et al. Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 2002; 13: 245–54.
- Mercapide J, Lopez de CR, Castresana JS, Klein-Szanto Andres JP. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression

- accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *Int J Cancer* 2003; 106: 676–82.
- 21 Yodkeeree S, Chaiwangyen W, Garbisa S, Limtrakul P. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J Nutr Biochem* 2009; 20: 87–95.
- 22 Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 572–84.
- 23 Shun FY, Wen EY, Wu HK, Horng RC, Shu CC, Yih SH. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 287–94.
- 24 Lim H, Kim HP. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. *Planta Med* 2007; 73: 1267–74.
- 25 Lin CW, Hou WC, Shen SC, Juan SH, Ko CH, Wang LM, et al. Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1807–15.
- 26 Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem* 2006; 287: 109–16.
- 27 Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595–600.
- 28 Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 226: 178–91.
- 29 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.
- 30 Dona M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della BM, et al. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2004; 64: 6225–32.
- 31 Airola K, Reunala T, Salo S, Saarialho-Kere UK. Urokinase plasminogen activator is expressed by basal keratinocytes before interstitial collagenase, stromelysin-1, and laminin-5 in experimentally induced dermatitis herpetiformis lesions. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 7–11.
- 32 Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 717–24.
- 33 Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 884–91.
- 34 Juncker-Jensen A, Romer J, Pennington CJ, Lund LR, Almholt K. Spontaneous metastasis in matrix metalloproteinase 3-deficient mice. *Mol Carcinog* 2008.
- 35 Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2006; 9: 68–76.
- 36 Farina HG, Pomies M, Alonso DF, Gomez DE. Antitumor and anti-angiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncol Rep* 2006; 16: 885–91.
- 37 Zhang XM, Huang SP, Xu Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 82–8.
- 38 Rowell C, Carpenter DM, Lamartiniere CA. Chemoprevention of breast cancer, proteomic discovery of genistein action in the rat mammary gland. *J Nutr* 2005; 135: 2953S–2959S.
- 39 Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett* 2004; 208: 35–41.
- 40 Kousidou OC, Mitropoulou TN, Roussidis AE, Kletsas D, Theocharis AD, Karamanos NK. Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol* 2005; 26: 1101–9.
- 41 Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett* 2004; 208: 35–41.
- 42 Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 1997; 75: 69–75.
- 43 Baba Y, Tsukuda M, Mochimatsu I, Furukawa S, Kagata H, Nagashima Y, et al. Inostamycin, an inhibitor of cytidine 5'-diphosphate 1,2-diacyl-sn-glycerol (CDP-DG): inositol transferase, suppresses invasion ability by reducing productions of matrix metalloproteinase-2 and -9 and cell motility in HSC-4 tongue carcinoma cell line. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 273–9.