



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. พรงาม 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 จากการศึกษพบว่าภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนจะมีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (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 μ M 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 เมื่อทำการศึกษาปริมาณโปรตีนไคเนสที่แสดงออกในเซลล์ K562 เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นทำการทดสอบด้วย เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 5, 10, และ 15 μ M 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

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* แล้วให้นำสารสกัดไปมะกรุต 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 ในปีี่ 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 ที่ต่อยับยั้ง *c-myc* ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 65

37. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ร่วมกับ cyclohexamide ที่ความเข้มข้น 50 μ M ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/- ในเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/- และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot 67
38. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยใช้ cyclohexamide และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot 69
39. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μ M ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ MG 132 ในเซลล์ K562 ต่อกระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway วัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธี Western blot 70
40. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ร่วมกับ actinomycin D ต่อความคงตัวของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ทำการศึกษาโดยใช้วิธี real time PCR 71
41. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดแอลฟา (protein kinase C α) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 73
42. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดซีต้า (protein kinase C ζ) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 73
43. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดเดลต้า (protein kinase C δ) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 74
44. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ชนิด non-Phosphorylated form ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot 74
45. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M 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. ผลการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในไอโซฟอร์มต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยวิธี real time PCR	51
9. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่ 10, 15 และ 20 μM ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (%) (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 ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (%) (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform	56
12. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM ในระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (mean $\pm$ SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect	58

ด้วย WT1 (+/+) isoform

13. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อระดับการ
แสดงออกของโปรตีน GFP (%) (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้าไปใน
pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 62
14. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อร้อยละ
ของระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB2 (676) (mean $\pm$ SD) ที่
insert ที่เข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
ชนิด K562 63
15. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อร้อยละ
ของระดับการแสดงออกของโปรตีน ErbB3 (mean $\pm$ SD) ที่ insert ที่เข้า
ไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 64
16. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อร้อยละ
ของระดับการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 (mean $\pm$ SD) ซึ่ง taq ด้วย c-
myc ที่แทรกเข้าไปใน pcDNA 3.1 (+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด
ขาวชนิด K562 65
17. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อความคงตัว
หรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ ในเซลล์ U937 ที่ถูก
transfect ด้วย WT1 ชนิด +/+ 66
18. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อความคงตัว
หรือค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิดในเซลล์ K562 68
19. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อ
กระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway โดยใช้ MG
132 ในเซลล์ K562 70
20. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อความคงตัว
หรือค่าครึ่งชีวิตของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอชนิด +/+ ในเซลล์
K562 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/+ 71
21. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M และ GF
109203x (PKC inhibitor) ที่ความเข้มข้น 0.0084 μ M 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 (IC₅₀ 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 ที่สำคัญและพบว่าผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทุกชนิดสูงเป็นอันดับ 2 รองมาจากโรคเอดส์เป็นเวลา 3 ปีติดต่อกันตั้งแต่ปี พ.ศ.2542 ถึง พ.ศ.2544 (3) นอกจากนี้สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขยังได้สรุปสถิติการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ และพบว่าผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (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 จากการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วยสารประกอบ 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% ของผู้ป่วยที่ไม่ได้ทำเคมีบำบัด (untreated AML) ดังนั้นทำให้ทราบว่าผู้ป่วยแต่ละคนจะมีการแสดงออกของยีน *MDR1* ที่แตกต่างกันและทำให้มีผลต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดที่น่าที่จะแตกต่างกันออกไปด้วย 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 ซึ่งการลดลงของการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันนี้ 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 และจะเกิดขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนา (รวมทั้งประเทศไทย) มากกว่า 7 ล้านคน เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง

สาเหตุและปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดโรคมะเร็งมีอยู่ด้วยกันหลายประการ คือ เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือภายนอกในร่างกาย ซึ่งปัจจุบันนี้เชื่อกันว่ามะเร็งส่วนใหญ่ เกิดจากสาเหตุได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น สารพิษจาก เชื้อราที่มีชื่อ อัลฟาทอกซิน (aflatoxin) สารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปิ้งย่าง พวกไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร ชื่อไนโตรซามีน (nitrosamine) สีส้มอาหารที่มาจากสีข้อมผ้า 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

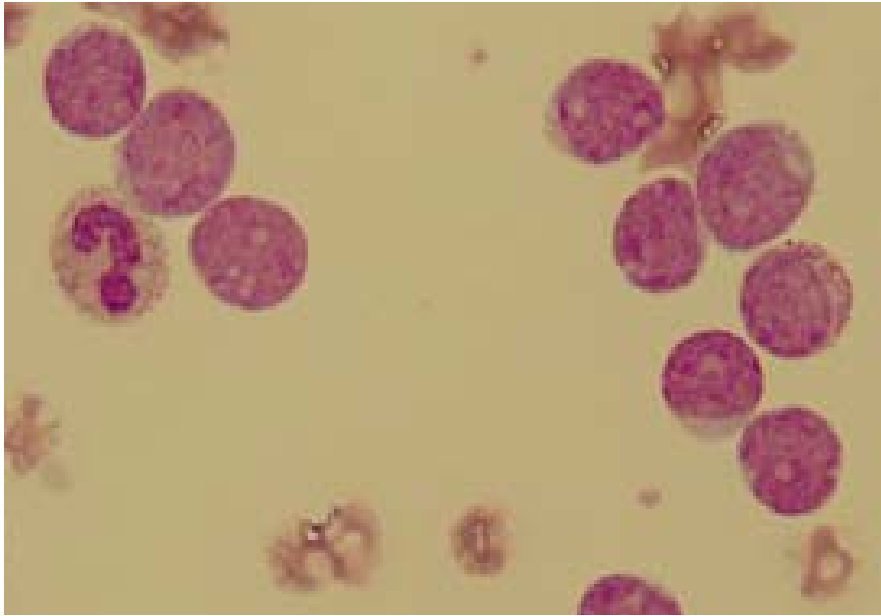
สามารถแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (50) คือ

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

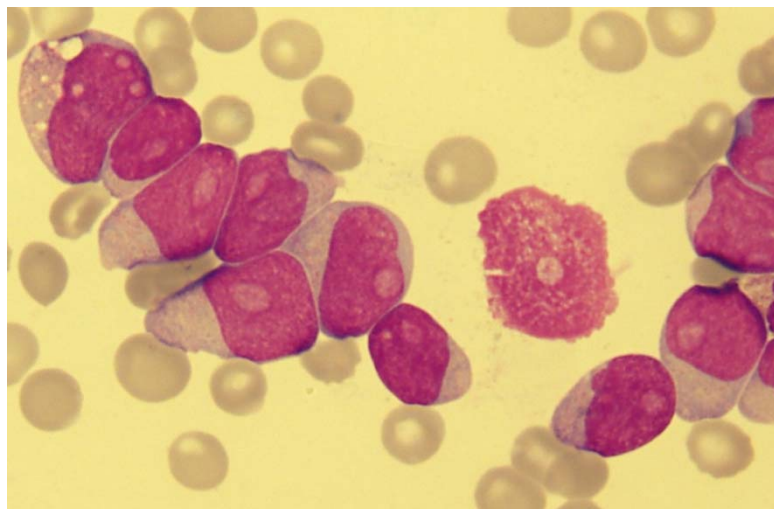
นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว จากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่เป็นมะเร็ง ได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ คือ myelogenous (non-lymphoid) leukemia กับชนิด lymphoid leukemia เมื่อรวมการแบ่งทั้ง 2 แบบเข้าด้วยกันจะได้กลุ่มใหญ่ของ leukaemia ดังนี้

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



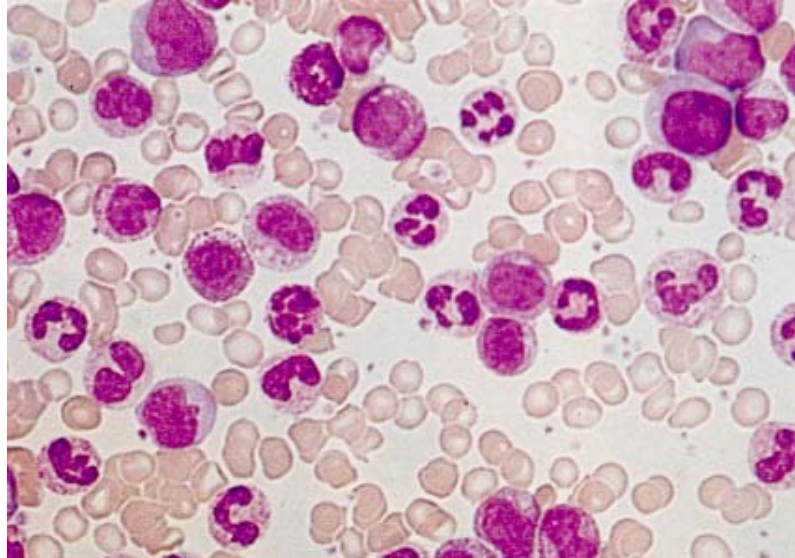
รูปที่ 1. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML

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



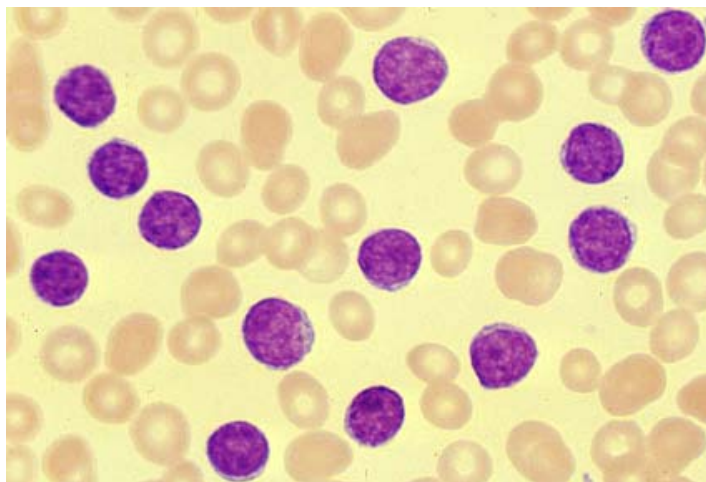
รูปที่ 2. แสดง blood picture ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL

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

จากการศึกษาระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ใหญ่มากกว่าเด็กประมาณ 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 ทั้งที่โรคนี้นี้ได้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม
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 เนื่องจากเกิดการเปรียบเทียบให้เห็นชัดเจนขึ้น 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 สีส้มเงินดำ ที่ไม่ละลายน้ำ และมองเห็นชัดเมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin การอ่านผลให้ดู PMN จำนวน 100 ตัว ดูว่าแต่ละตัวติดสีมากน้อยเพียงใด ให้คะแนนจาก 0 (ไม่ติดสี) และ 1+, 2+, 3+ ถึง 4+ ตามความเข้มของสีน้ำตาล 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) โรคเมเร็งชนิดต่างๆ (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

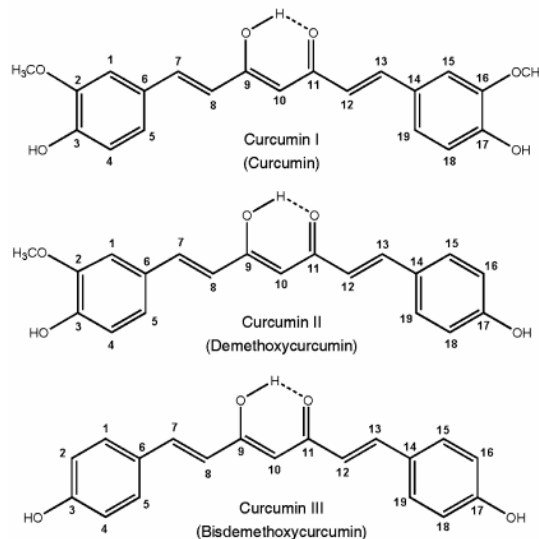
2. Feruloyl-(p-hydroxycinnamoyl)methane หรือดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน เป็นผงสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่ประมาณ 168°C พบประมาณ 28.7% ของรงควัตถุทั้งหมด และมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{18}O_5$ ดังแสดงในรูปที่ 2

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

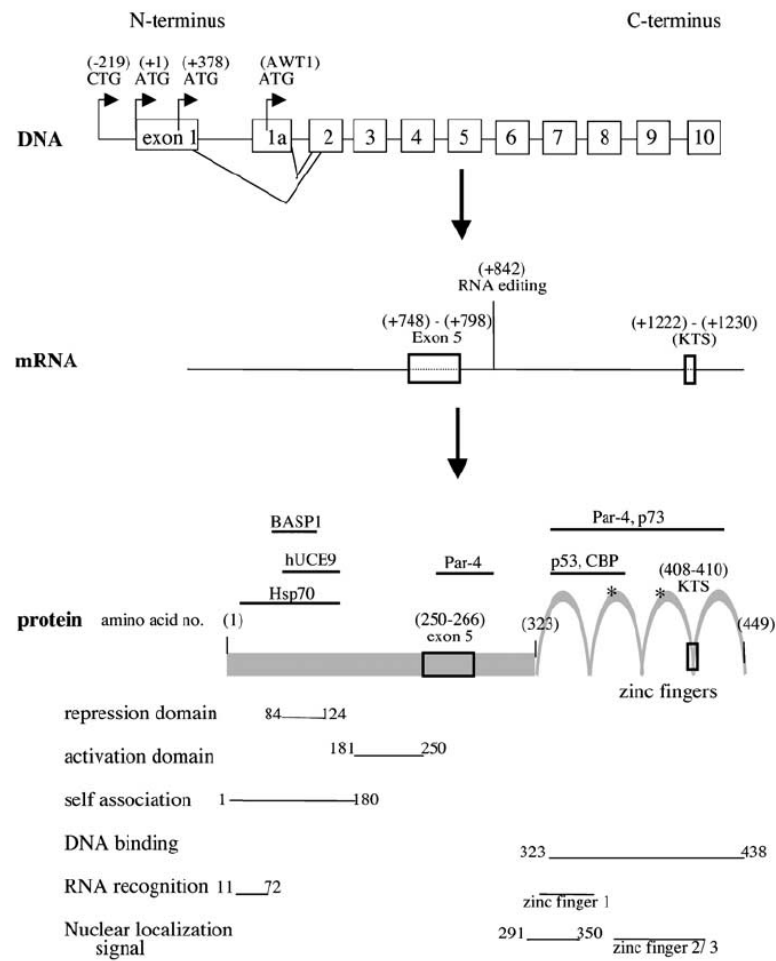


รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin

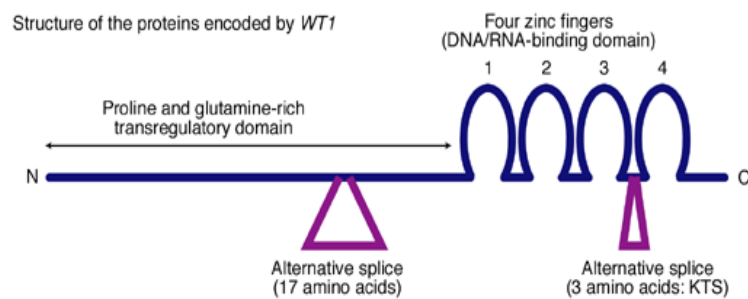
จากการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน ในผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า ยีนนี้ทำหน้าที่เป็นทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ยีน (tumor suppressor gene) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นพบว่าการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน (wild type) ที่สูงมากในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกลุ่มของ 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. เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อไวรัสเมอร์วันไอโซฟอร์มทั้ง 4 ชนิด ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพะเลี้ยงชนิด K562 โดยอาศัยเวกเตอร์ 17AA (+) WT1 และ 17AA (-) WT1
2. เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์ในการกระตุ้นการทำงานของยีนไวรัสเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพะเลี้ยงชนิด 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 ได้ นั้น ในขณะนี้ยังไม่มีทราบถึงกลไกของสารสกัดเคอร์คิวมินว่าสามารถลดการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ได้อย่างไร ดังนั้นกลไกที่สำคัญที่ต้อง ทำการศึกษา คือผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อความคงตัวของยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA โดยใช้ Actinomycin D ไปยับยั้งกระบวนการ transcription ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ ยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ใหม่ โดยในการศึกษานี้มีสมมุติฐาน คือสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกยีนวิล์มทูเมอร์วัน mRNA ได้ นั้น 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 µg/ml โดยใช้สูตร $1 \text{ OD} = 40 \text{ µg/ml}$ 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 ด้วยวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม 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:

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

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

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

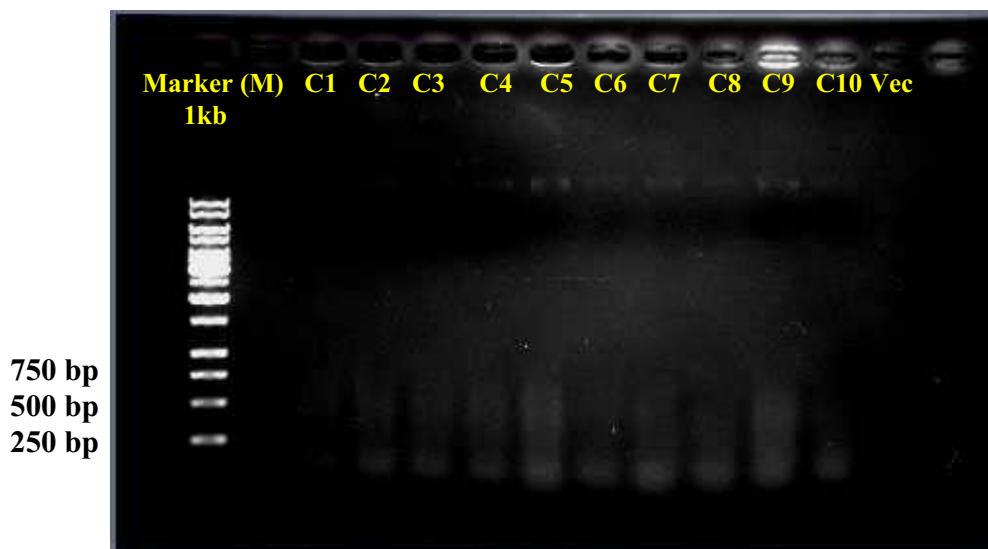
และ Proteinase อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm/ 280 nm ควรจะมีค่าประมาณ 1.6-2.0 โดยคำนวณจากวิธีการดังนี้

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)

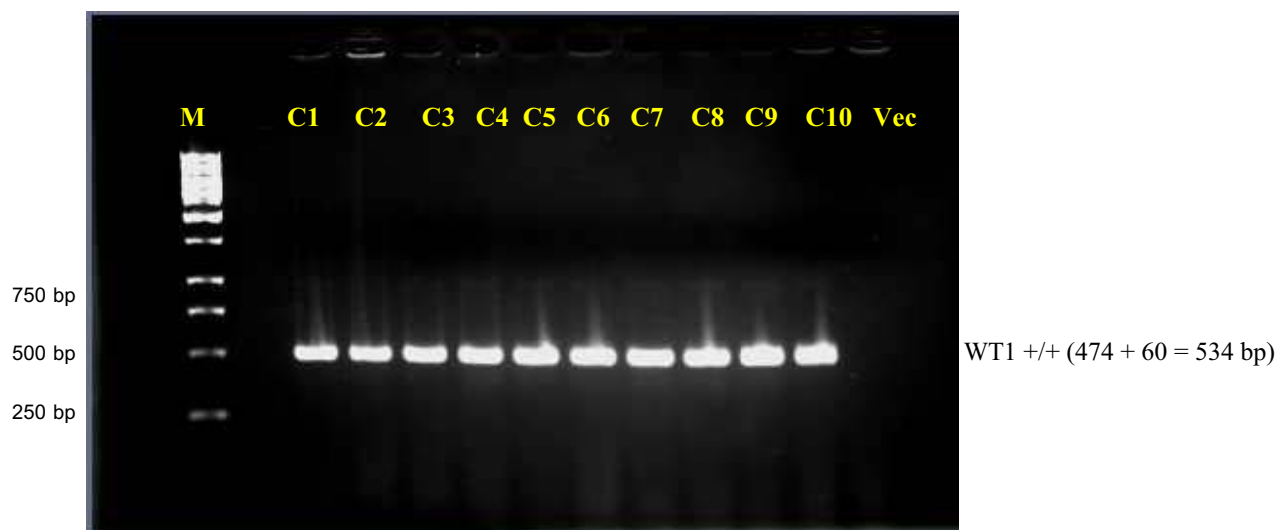
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1. ผลการโคลนยีน

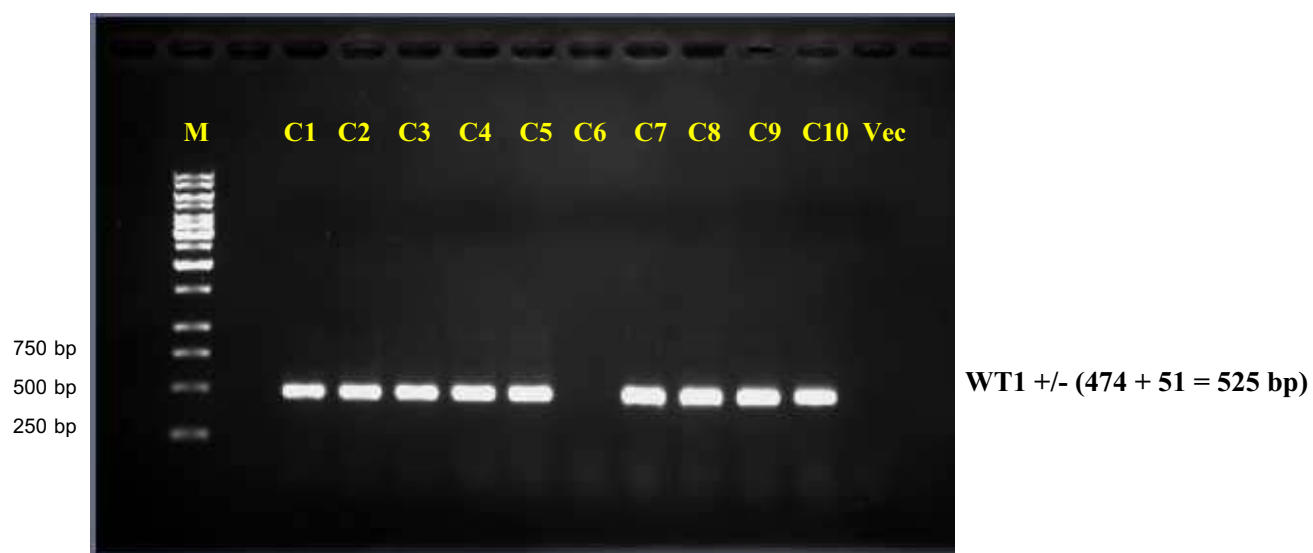
ทำการ transfect เซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันน้อย ด้วยเวกเตอร์ที่มี WT1 isoform 4 ชนิดคือ WT1 17AA (+) KTS (+), WT1 17AA (+) KTS (-), WT1 17AA (-) KTS (+), WT1 17AA (-) KTS (-) โดยใช้ Lipofectin ตั้งขึ้นตอนดังต่อไปนี้ นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ WT1 แต่ละชนิด (WT1 +/+, WT1 +/-, 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)



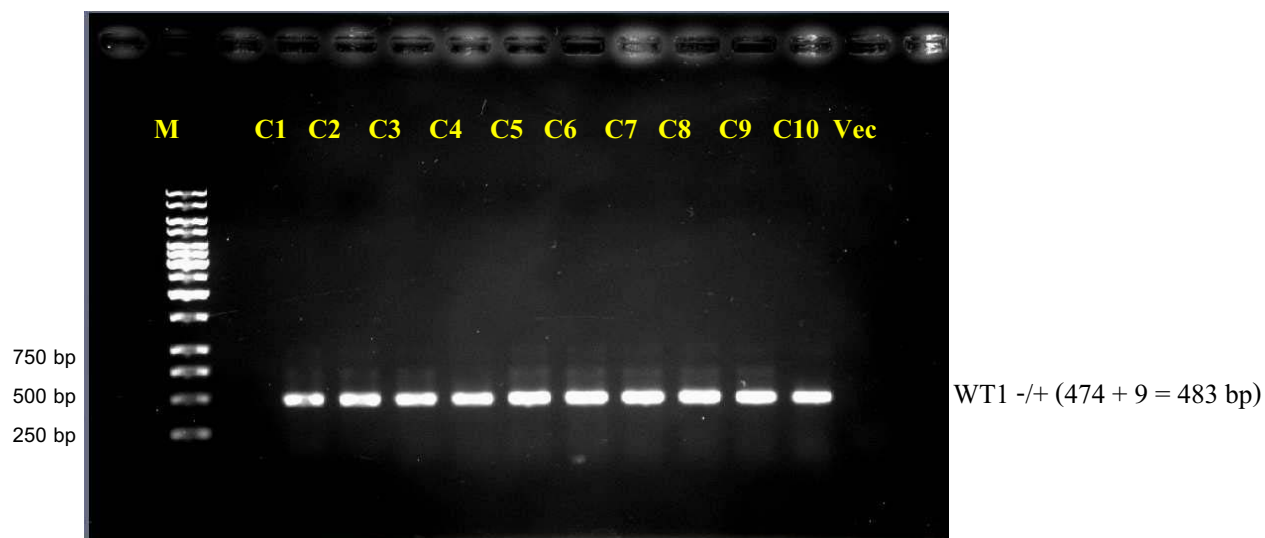
รูปที่ 8. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดเปล่า



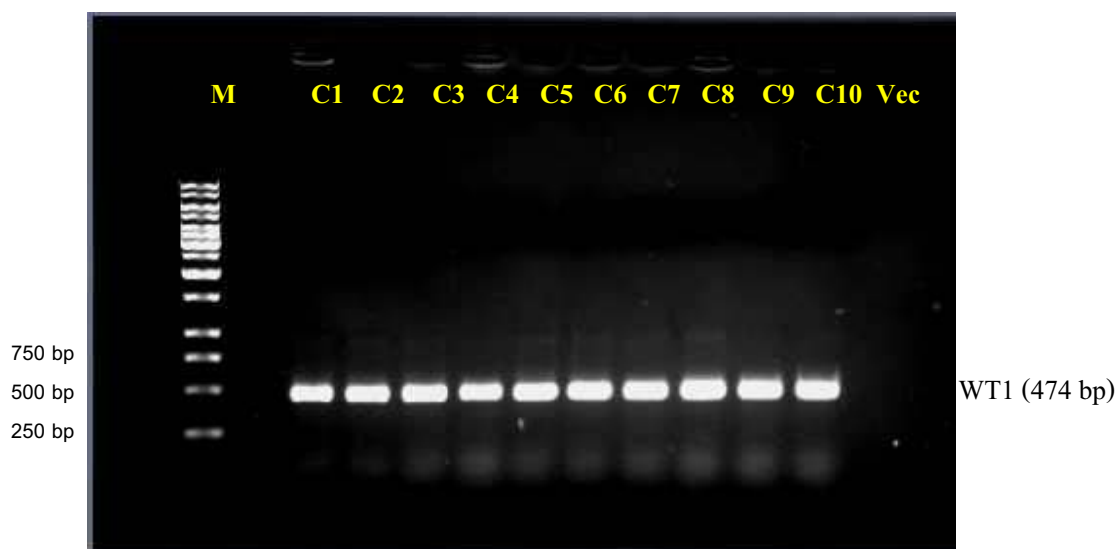
รูปที่ 9. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดจีเอ็มเอสายผสม ชนิด WT1 +/+



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



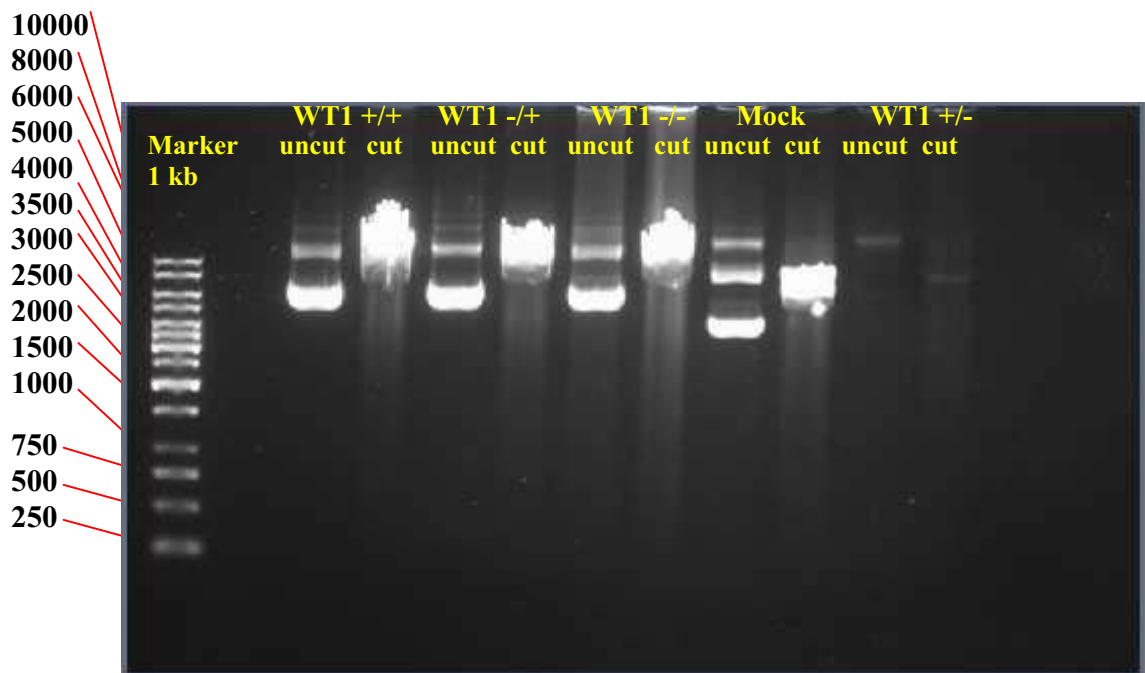
รูปที่ 11. แสดงการตรวจสอบโคลนของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α ที่รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ชนิด WT1 -/+



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)

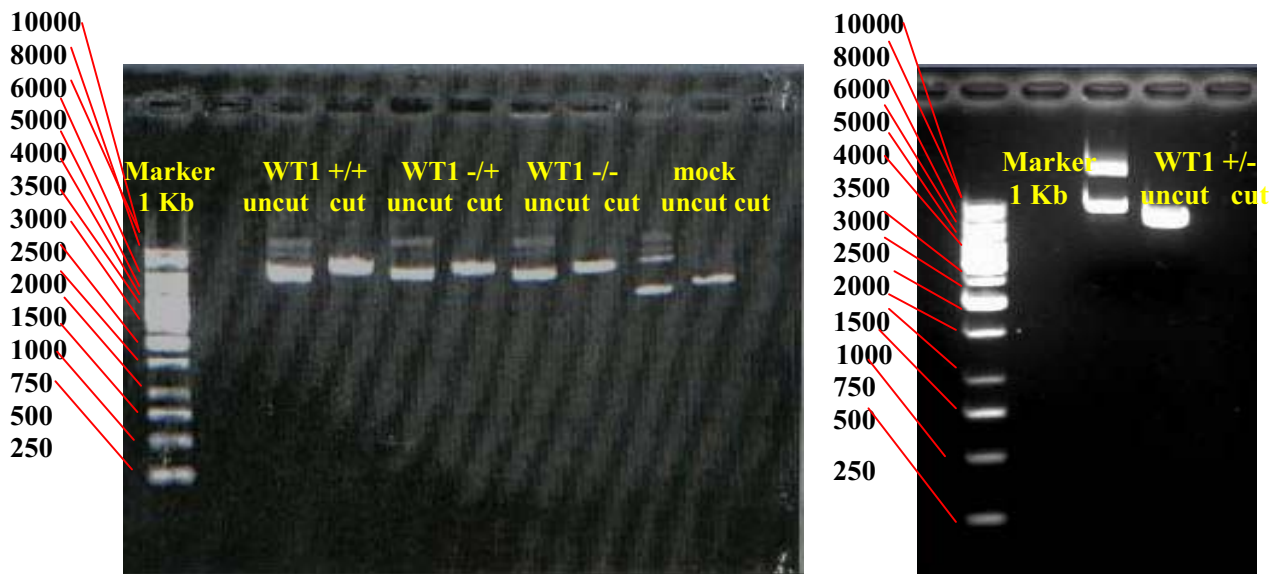


รูปที่ 13. แสดงการตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hind*III และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel

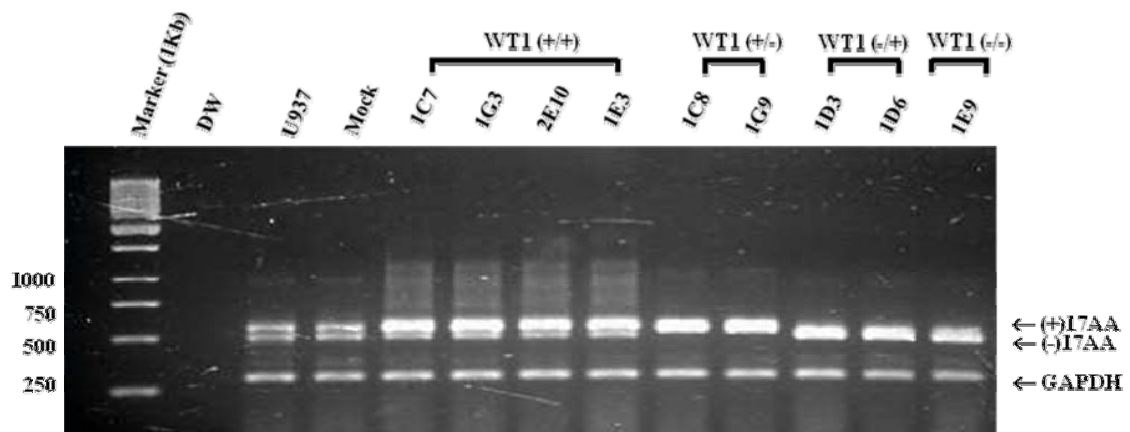
การนำยีนเข้าเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นเซลล์ชนิด mammalian cell

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

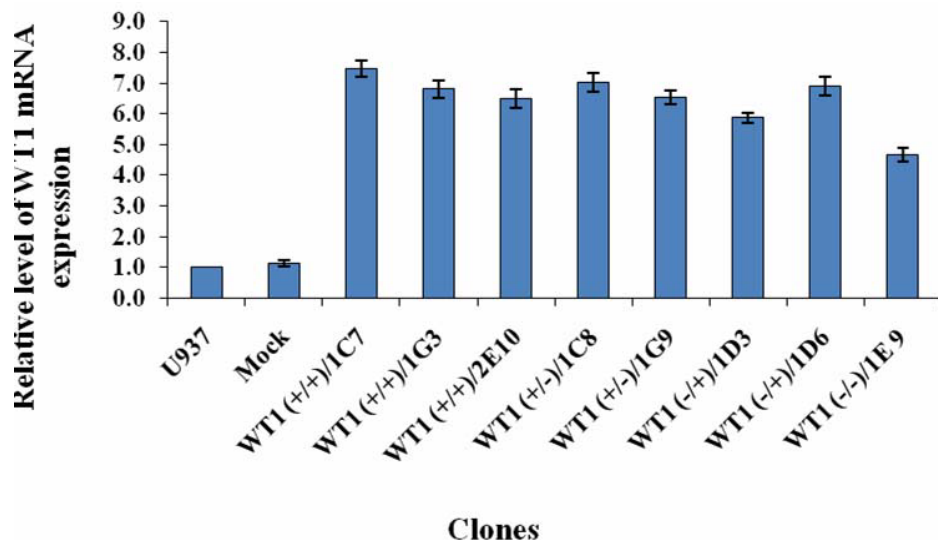
นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์และปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง แล้วปรับเซลล์ให้ได้ 1×10^4 cells/ml ด้วยอาหาร RPMI1640 ที่มี 10%FBS ยาต้านแบคทีเรีย และยา G418 หลังจากนั้นเลี้ยงในจาน 96 หลุม โดยเติมหลุมละ 100 μ l นาน 14 วัน ซึ่งเซลล์ U937 ที่ไม่ได้รับยีนพลาสมิดเข้าไปจะไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี 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



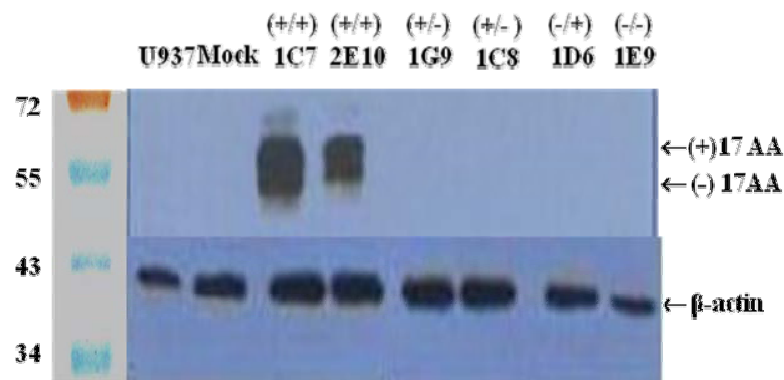
รูปที่ 14. แสดงการตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *PvI* และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel



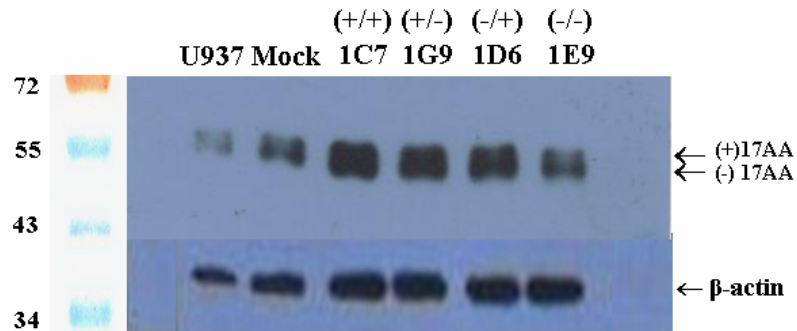
รูปที่ 15. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์ไข่มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock โดยวิธี RT-PCR และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% agarose gel



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



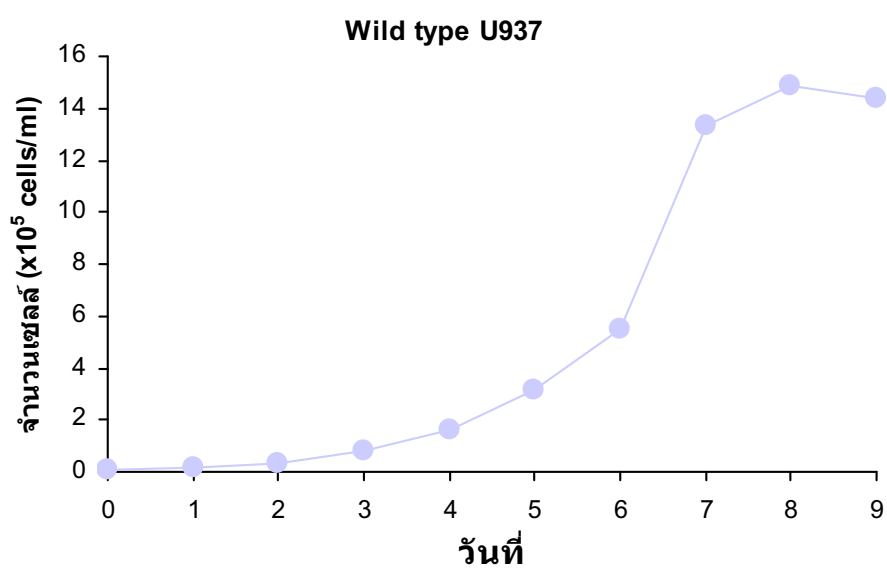
รูปที่ 18. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1 แต่ละชนิด ที่นำเข้าไปในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด U937 เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type U937 และ mock control โดยวิธี Immunoprecipitation และ Western blot

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

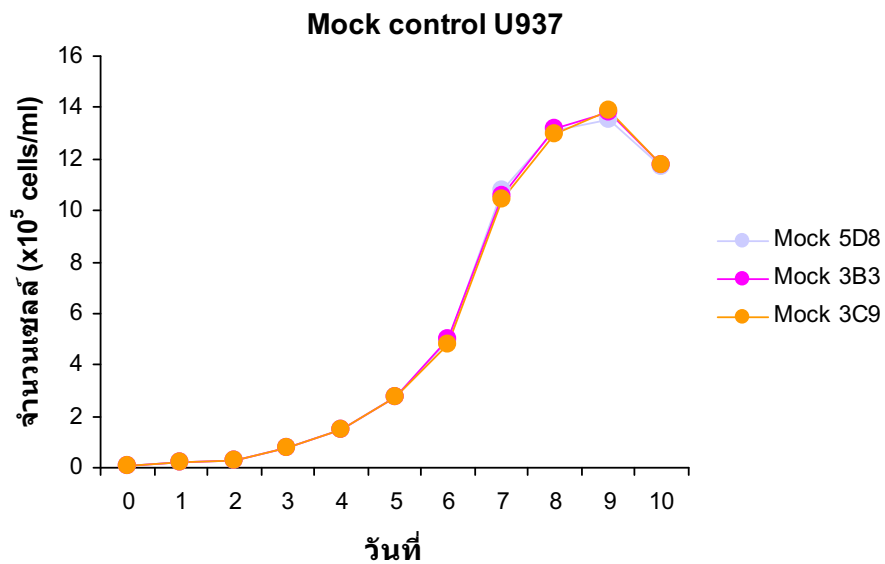
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.2
2	0.34
3	0.8
4	1.62
5	3.16
6	5.5
7	13.3
8	14.9
9	14.4
10	9.06



รูปที่ 19. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว wild type U937

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

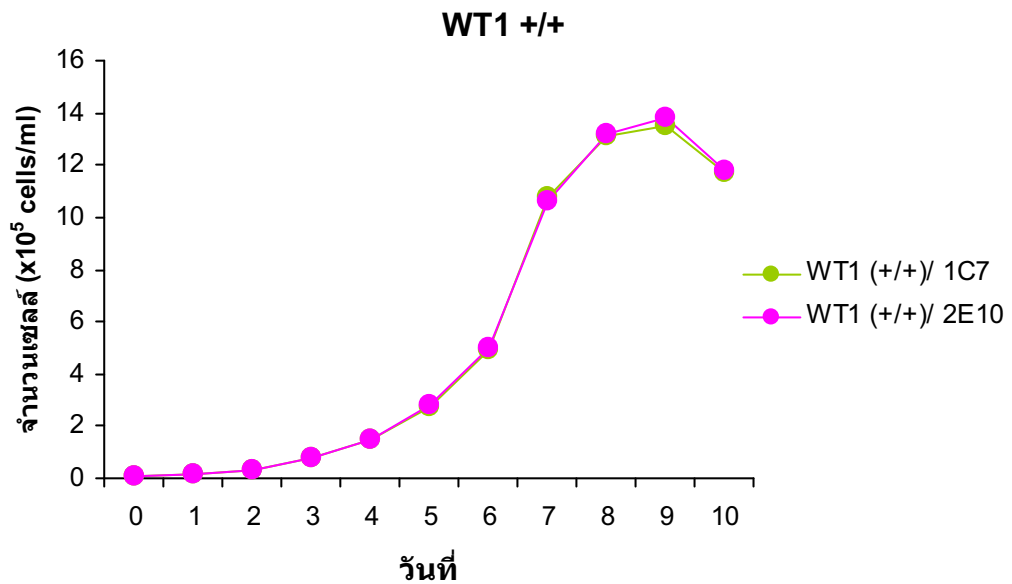
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)		
	Mock 5D8	Mock 3B3	Mock 3C9
0	0.1	0.1	0.1
1	0.18	0.18	0.19
2	0.31	0.3	0.31
3	0.77	0.78	0.78
4	1.47	1.46	1.48
5	2.73	2.78	2.75
6	4.92	5	4.82
7	10.8	10.6	10.4
8	13.1	13.2	13
9	13.5	13.8	13.9
10	11.7	11.8	11.8



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

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

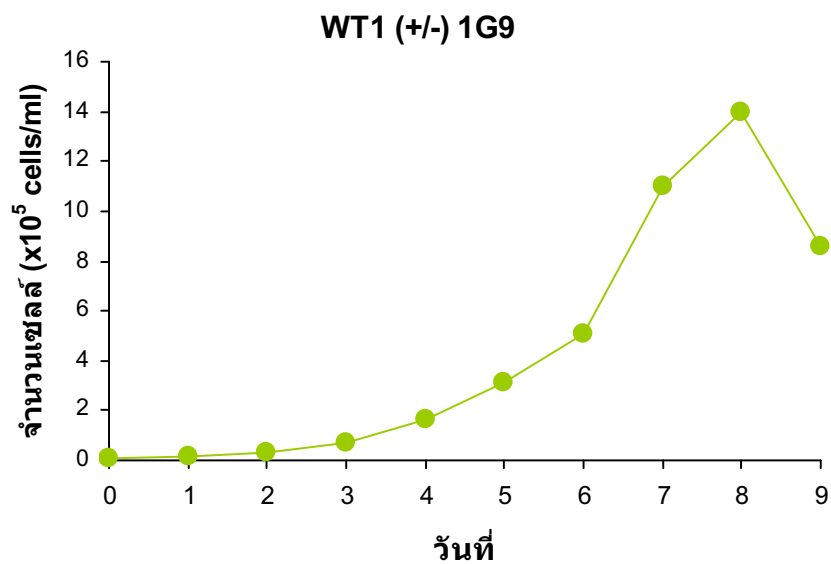
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cell/ml)	
	WT1 (++)/1C7	WT1 (++)/2E10
0	0.1	0.1
1	0.187	0.2
2	0.35	0.355
3	0.8	0.78
4	1.49	1.5
5	2.97	2.91
6	5.1	5.2
7	11.6	11.3
8	13.7	13.4
9	13.9	13.8
10	11.7	11.8



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

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

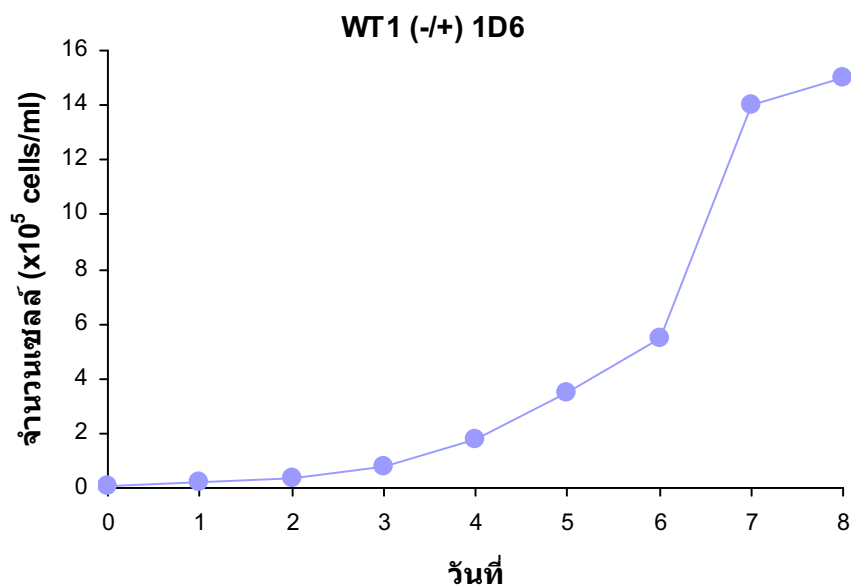
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.19
2	0.32
3	0.74
4	1.65
5	3.15
6	5.06
7	11
8	14
9	8.6
10	5.3



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

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

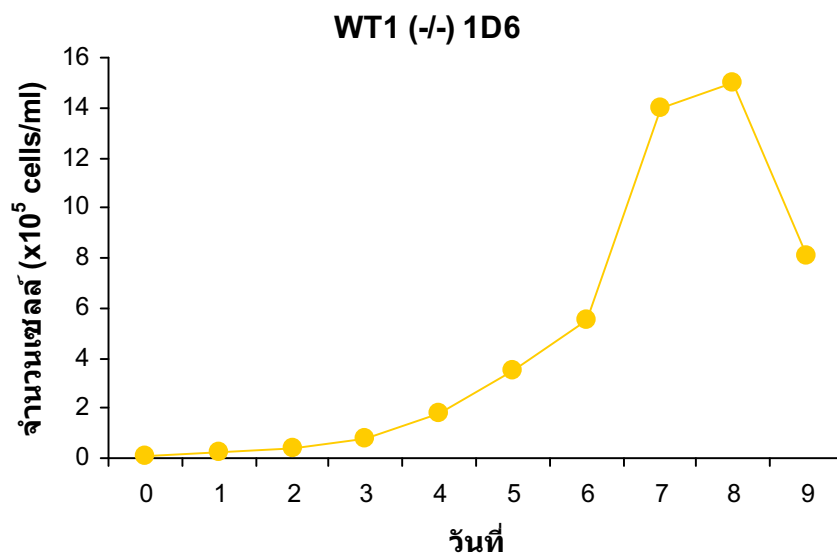
วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^5$ cells/ml)
0	0.1
1	0.2
2	0.36
3	0.81
4	1.75
5	3.5
6	5.5
7	14
8	15
9	8.1
10	5.4



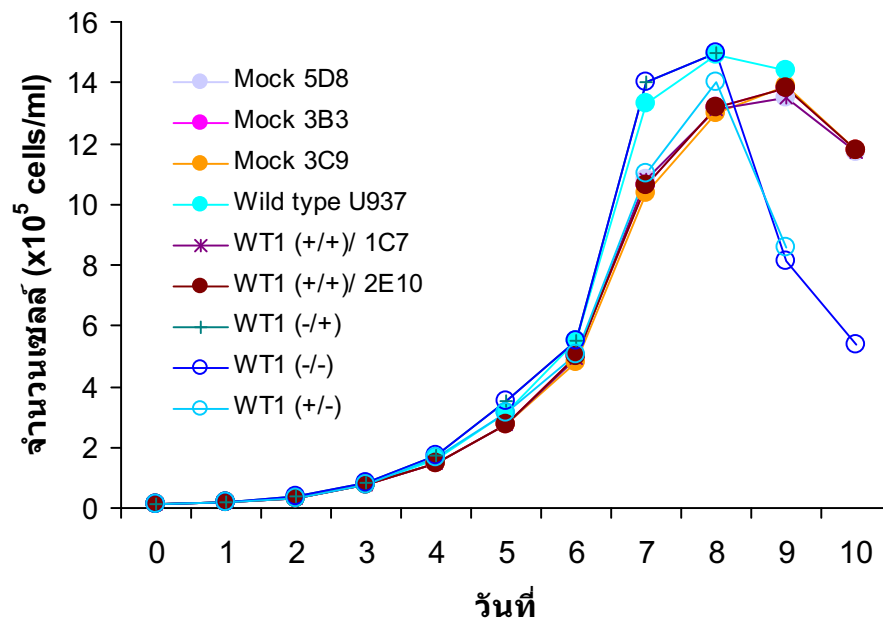
รูปที่ 23. กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (-/+)

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 (-/-)



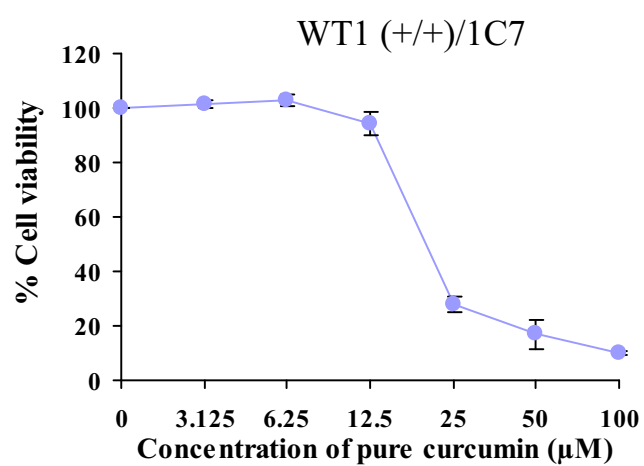
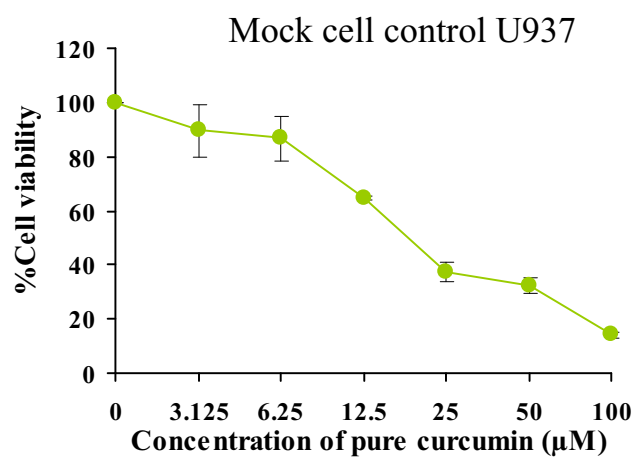
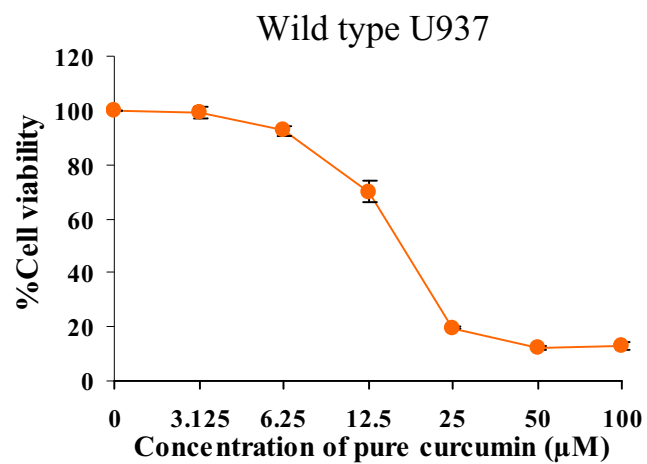
รูปที่ 25. กราฟสรุปรวมผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม รวมทั้ง mock control และ wild type U937

ผลการทดลองที่ 3. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการทำลายเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม

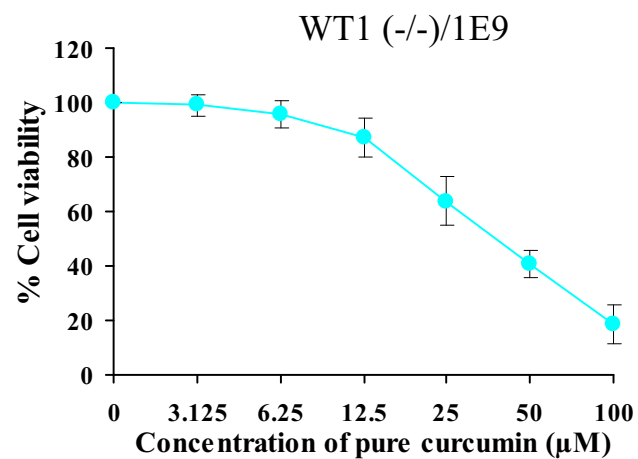
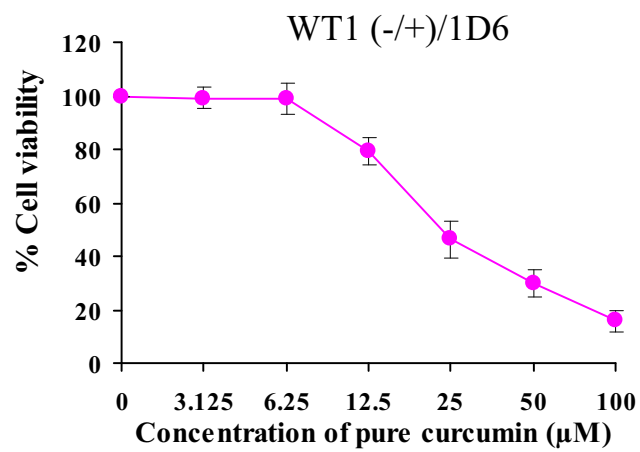
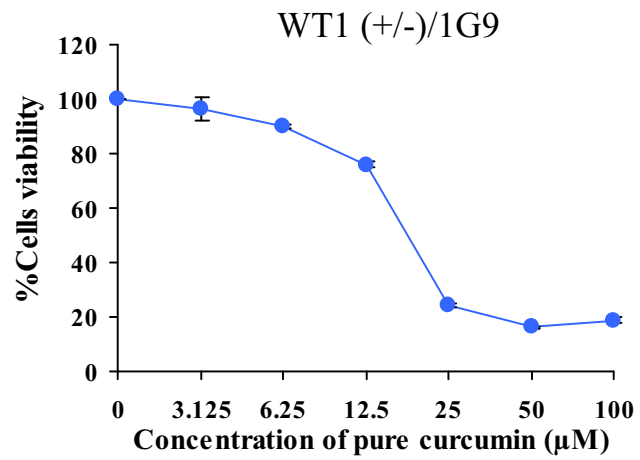
การศึกษากฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการทำลายเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย 4 ไอโซฟอร์มซึ่งประกอบด้วย WT1 (+/+), (+/-), (-/+) และ (-/-) ของ WT1, mock control และ wild U937 จากผลการทดลองพบว่า เคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ให้ผลในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลัมทูเมอร์วันทั้ง 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

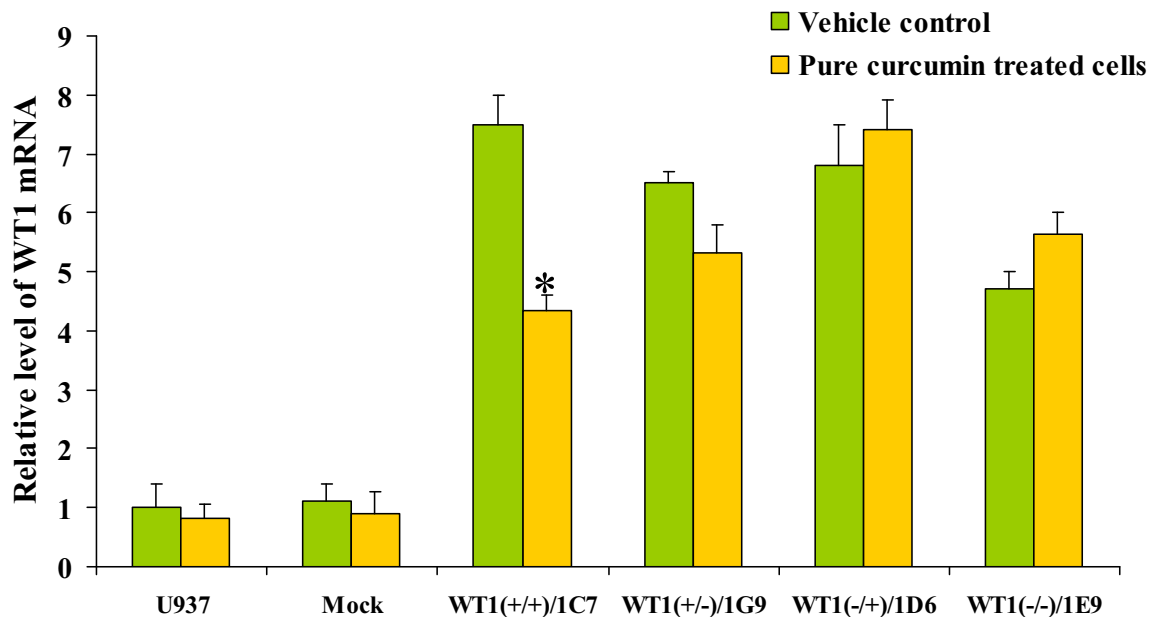
ผลการทดลองที่ 4. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor1; WT1*) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลมทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม ด้วยวิธี real time PCR

จากการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วยวิลมทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม, mock control และ wild type U937 จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนวิลมทูเมอร์วัน (WT1 mRNA) โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นระยะเวลา 2 วัน มาทำการทดลอง 3 ครั้ง (3 time independent study) ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่ค่า IC_{20} ดังแสดงในตารางที่ 8 มาใช้ในการทดสอบ เพื่อต้องการดูฤทธิ์ของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์โดยตรงต่อการลดการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน และเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงไม่ให้ผลการทดลองไปเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์ทั้ง อะพอพโตซิส (apoptosis) และเนโครซิส (necrosis) โดยใช้วิธี Real time PCR จากผลการทดลองพบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน 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 (-/-) พบว่าไม่สามารถลดระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันได้ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 8 และรูปที่ 27

ตารางที่ 8. ผลการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การแสดงออกยีนวิลมทูเมอร์วันในไอโซฟอร์มต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยวิธี real time PCR

การทดลอง	ระดับการแสดงออกของวิลมทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ (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. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มเมอร์วันไอโซฟอร์ม ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time independent study)

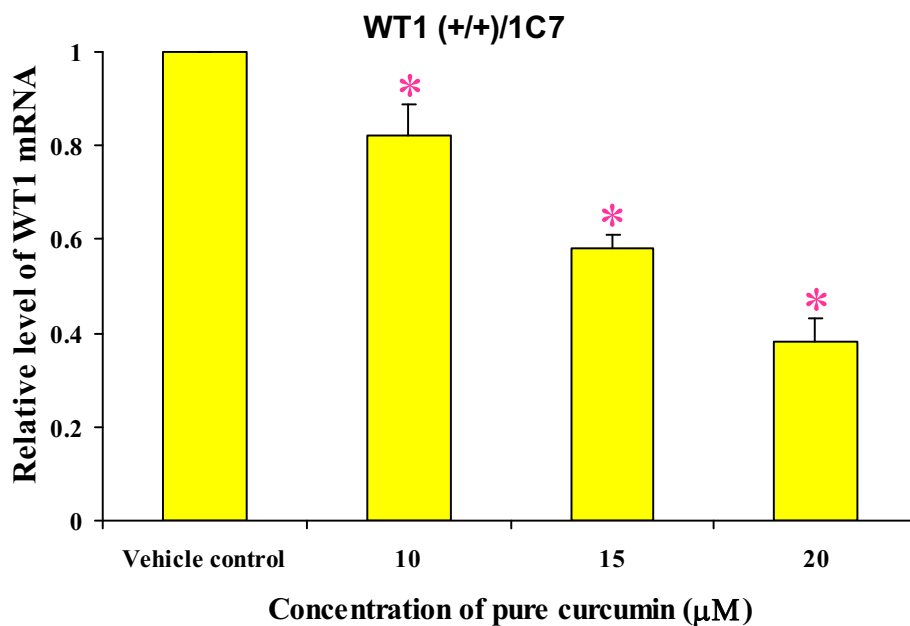
หมายเหตุ: เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

ผลการทดลองที่ 5. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มเมอร์วัน ชนิด +/- ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

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

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

ชุดการทดลอง	ระดับการแสดงออกของวิลมทูเมอร์วัน 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 ต่อระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยวิธี real time PCR โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

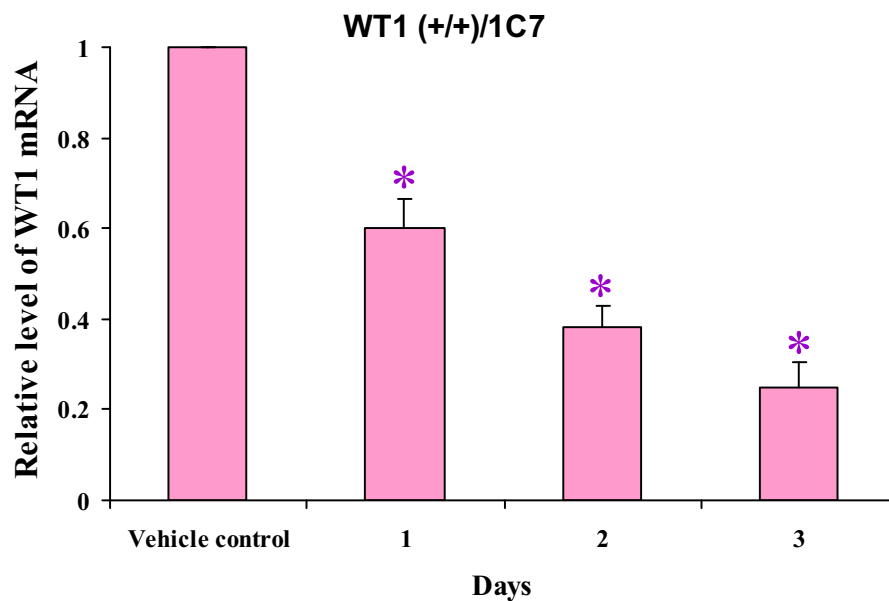
หมายเหตุ: Vehicle control = ชุดควบคุม เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

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 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

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

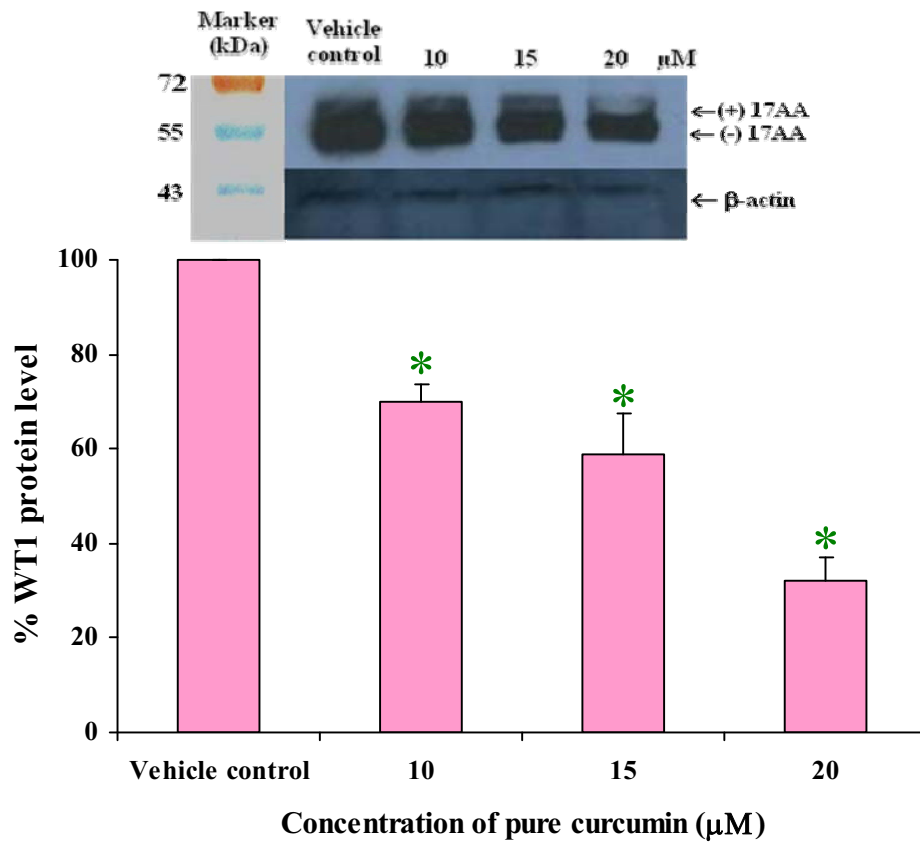
ผลการทดลองที่ 7. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน (Wilms' tumor1 protein; WT1 protein) ชนิด +/+ ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937

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)

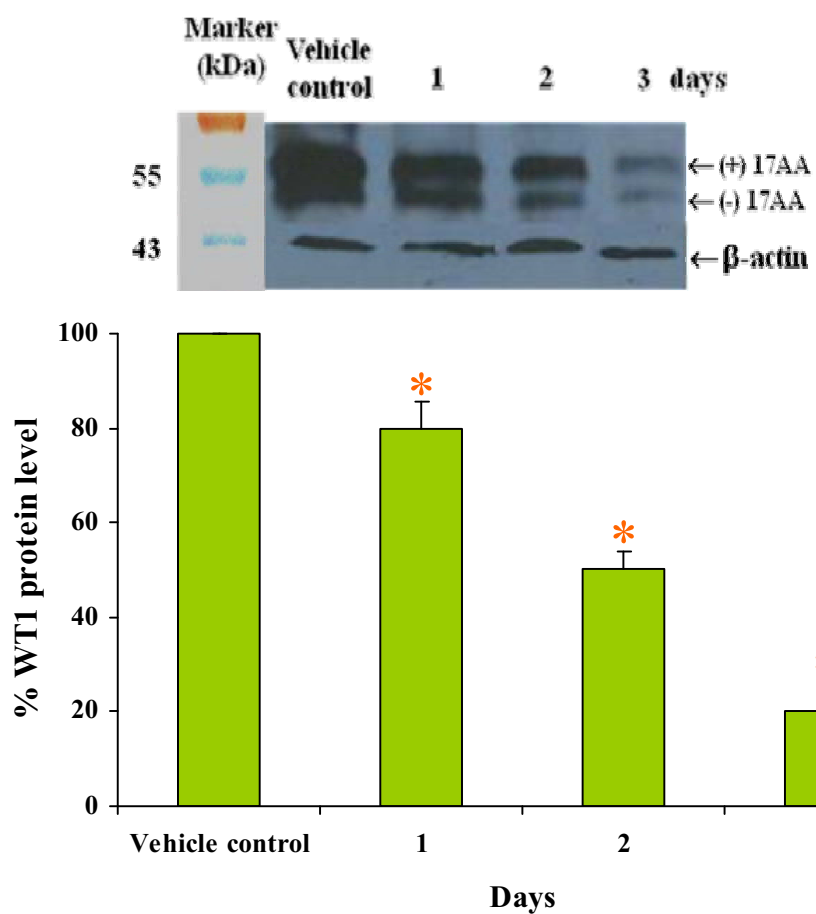
หมายเหตุ: Vehicle control = ชุดควบคุม เครื่องหมาย * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$

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 ± 0
วันที่ 1	74	83	84	$61^* \pm 5.5$
วันที่ 2	47	56	54	$36^* \pm 4.8$
วันที่ 3	15	24	26	$22^* \pm 5.8$

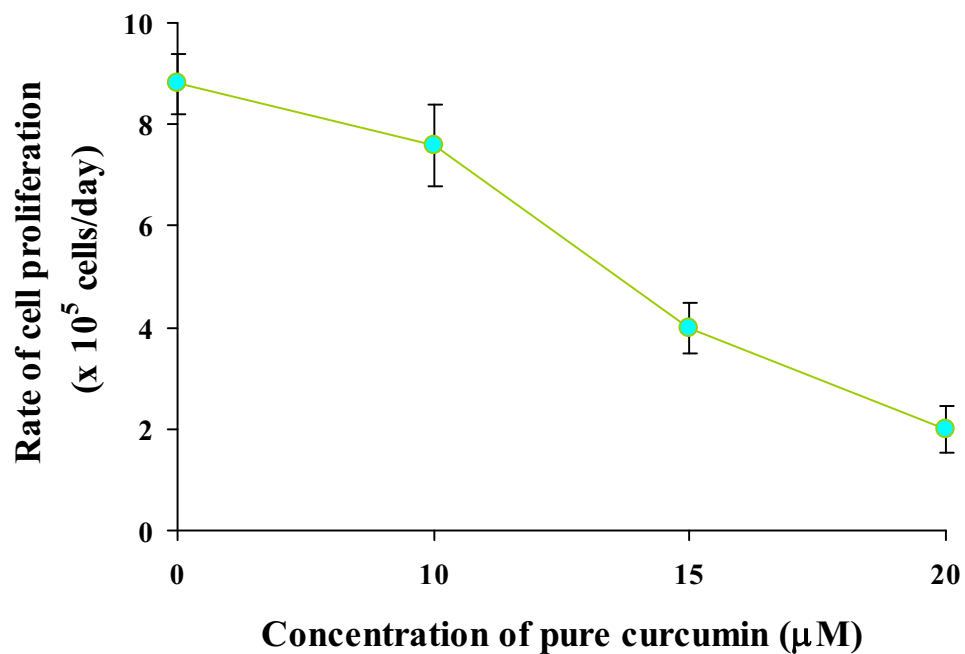


รูปที่ 31. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)

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



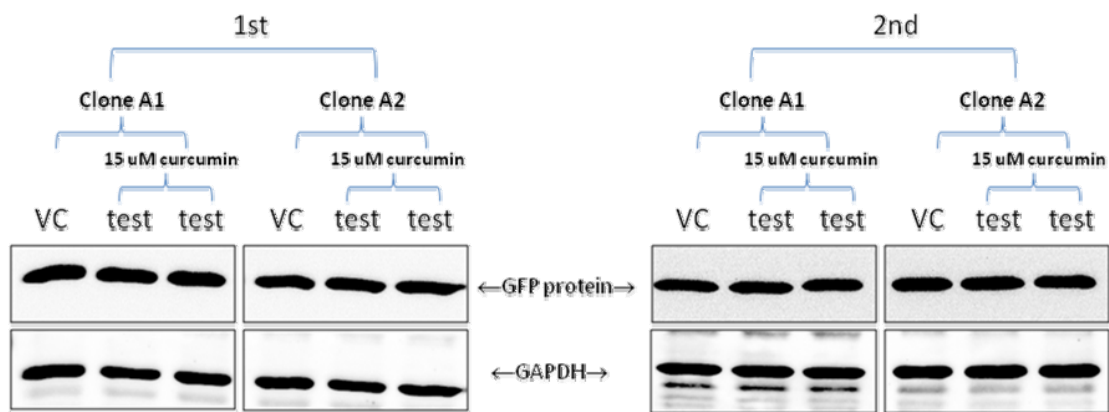
รูปที่ 32. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเหมาะสมและสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform

**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

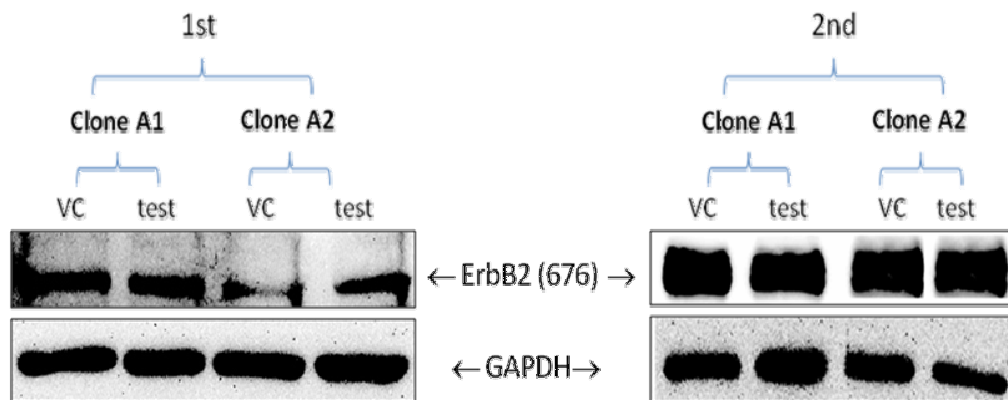
การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
ชุดควบคุม	100	100	100	100	100	100
15 μM curcumin (ซ้ำที่ 1)	99	101	104 $\pm$ 5	101	100	100 $\pm$ 0.5
15 μM curcumin (ซ้ำที่ 2)	102	100	101 $\pm$ 1	103	100	101.5 $\pm$ 1.5



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

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

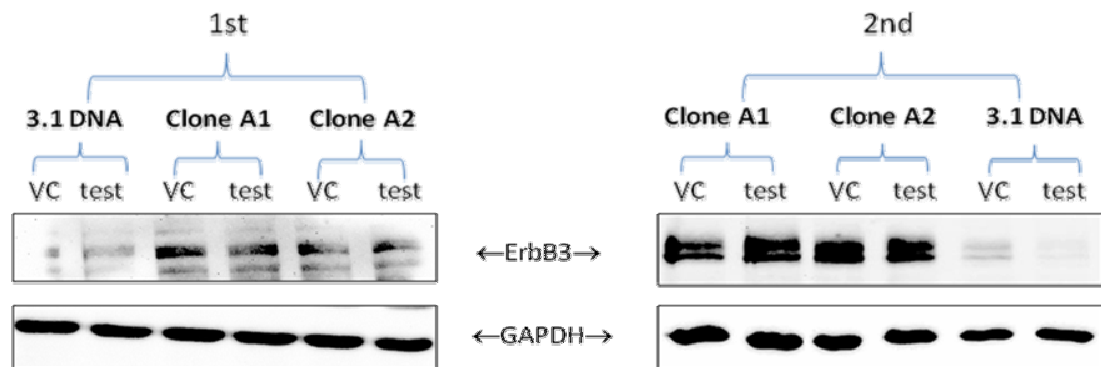
การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
Vehicle control	100	100	100	100	100	100
15 μ M curcumin	99	109	104 $\pm$ 5	95	98	96.5 $\pm$ 1.5



รูปที่ 34. ผลของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M 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

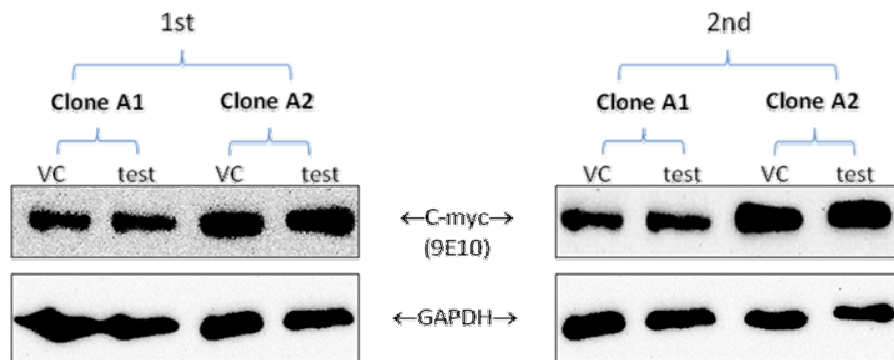
การทดลอง	Clone A1			Clone A2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Mean $\pm$ SD
Vehicle control	100	100	100	100	100	100
15 μM curcumin	99	107	103 $\pm$ 4	99	104	101.5 $\pm$ 0.5



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



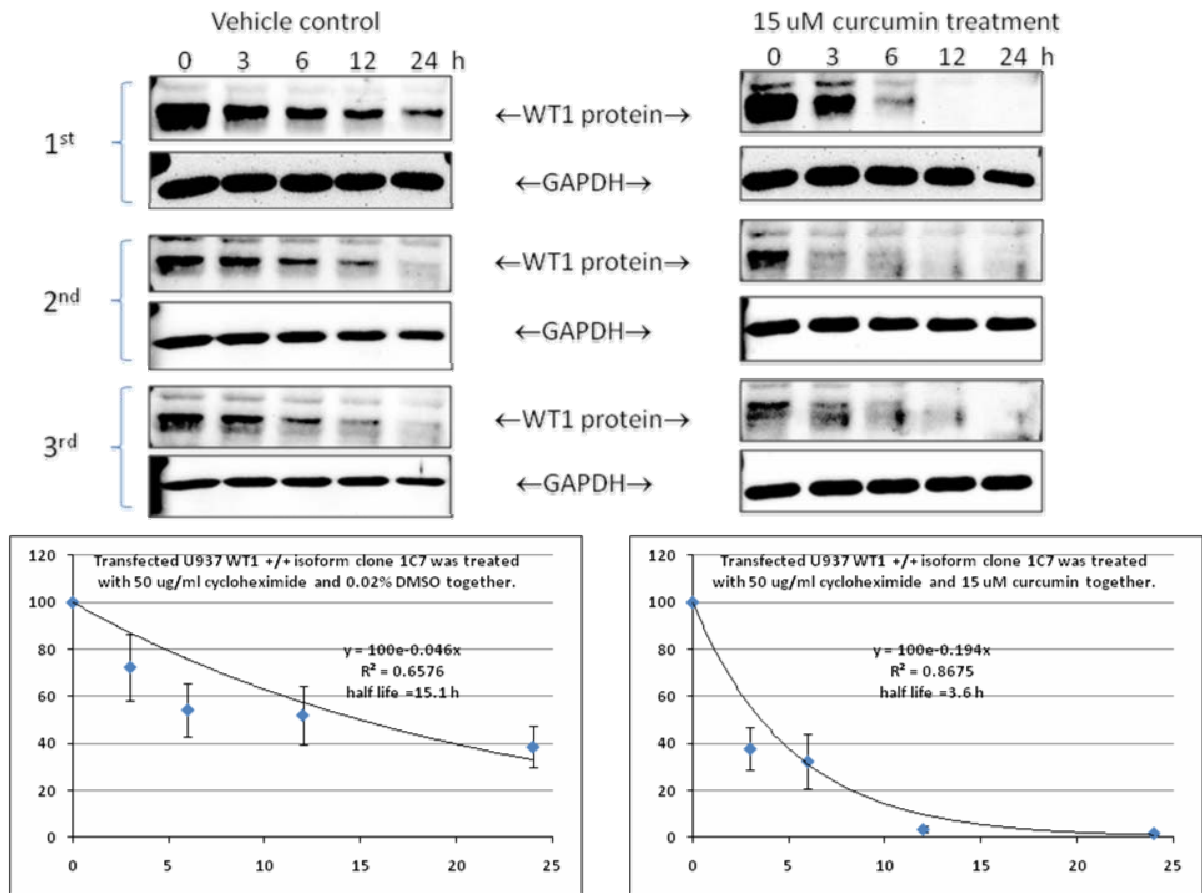
รูปที่ 36. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Lrig1 ที่ต่อกับยีน c-myc ที่ถูกสร้างโดย pCMV promoter ที่นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

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			



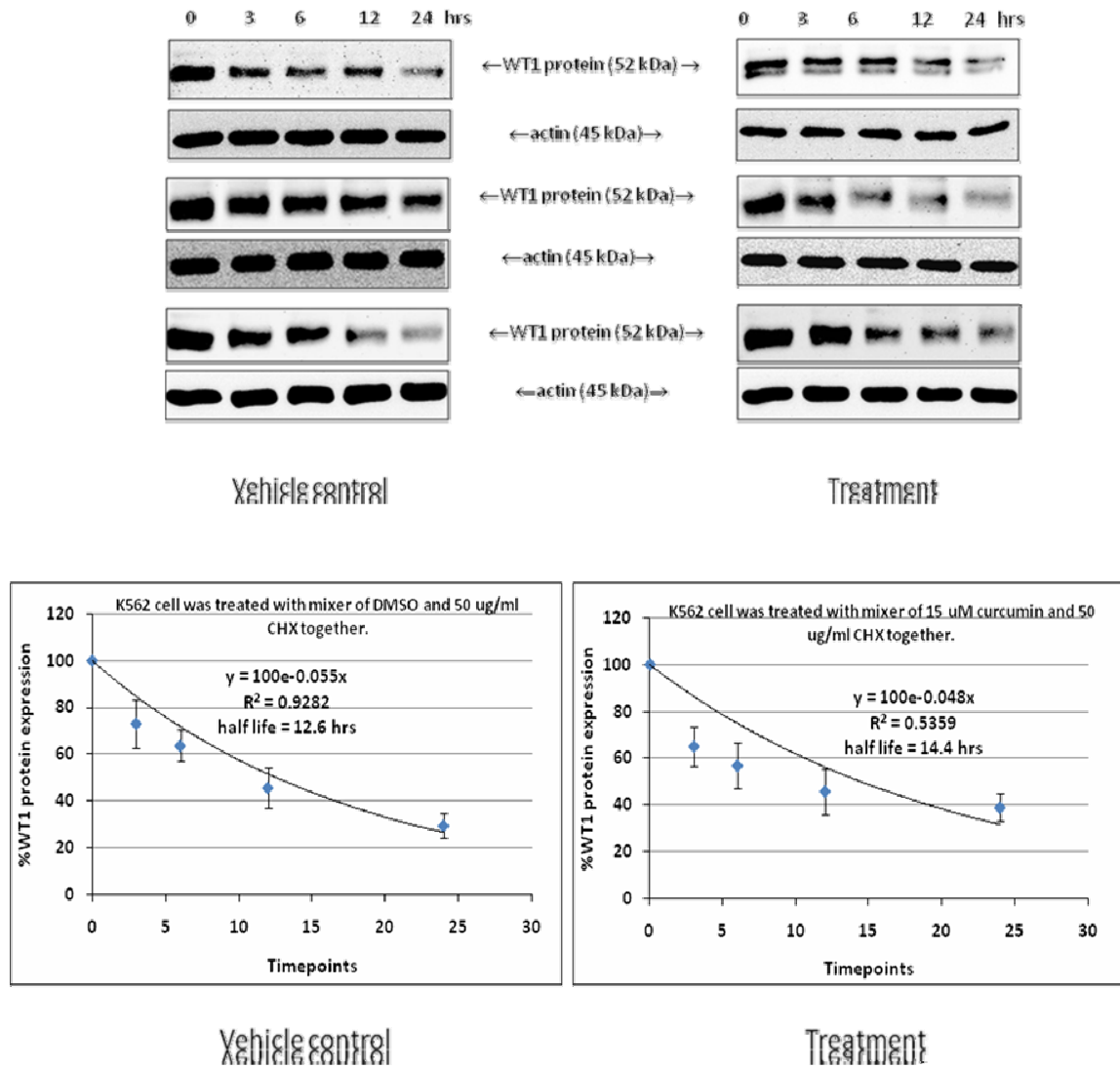
รูปที่ 37. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μ M ร่วมกับ cyclohexamide ที่ความเข้มข้น 50 μ M ต่อความคงตัวของโปรตีนวิล์มูเมอร์วันชนิด +/+ ในเซลล์ U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 ชนิด +/+ และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มูเมอร์วันโดยวิธี Western blot

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

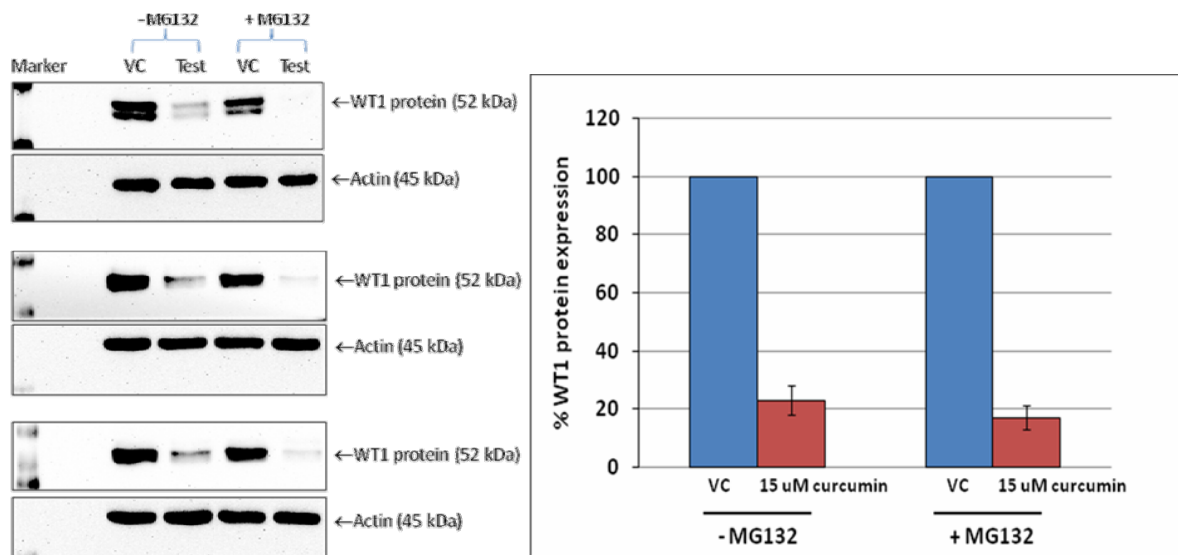
ระยะเวลา	ชุดควบคุม (vehicle control)				ชุดการทดลอง (treatment)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
0	100	100	100	100 $\pm$ 0	100	100	100	100 $\pm$ 0
3	70	62	88	73 $\pm$ 10	60	55	80	65 $\pm$ 8
6	72	46	74	64 $\pm$ 7	67	53	50	57 $\pm$ 9
12	44	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 uM curcumin		32	22	15	23 $\pm$ 5
ชุดควบคุม	มี MG 132	100	100	100	100 $\pm$ 0
15 uM curcumin		24	16	10	17 $\pm$ 4



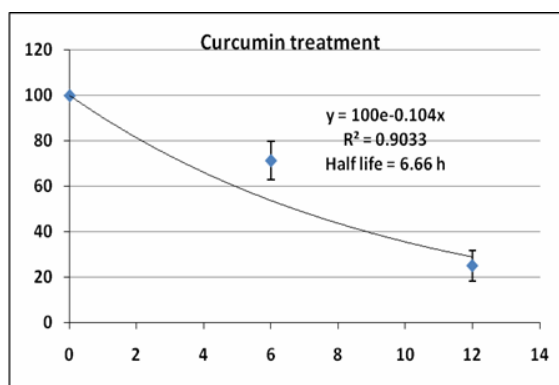
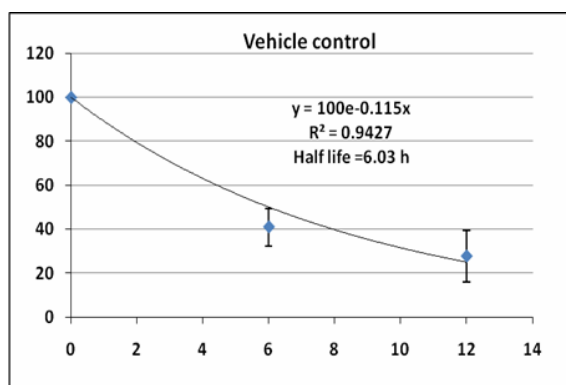
รูปที่ 39. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μ M ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ MG 132 ในเซลล์ K562 ต่อกระบวนการทำลายโปรตีนโดยผ่าน proteasome pathway วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน วิตามินเมอร์วัน โดยวิธี Western blot

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 +/-

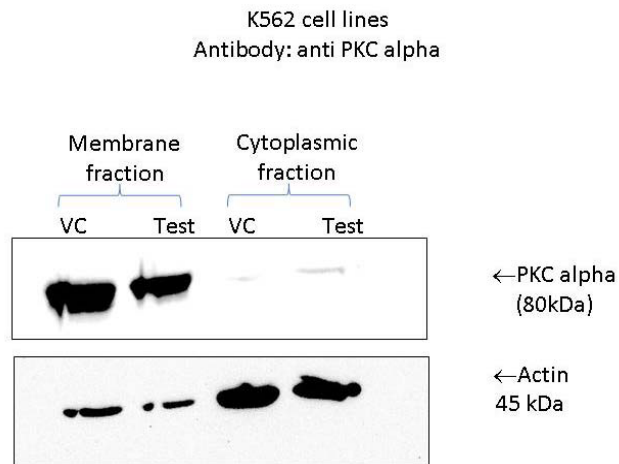
ระยะเวลา	ชุดควบคุม vehicle control				ชุดการทดลอง (treatment)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
0	100	100	100	100 $\pm$ 0	100	100	100	100
6	24	48	51	41 $\pm$ 9	55	76	83	71 $\pm$ 8
12	11	22	50	28 $\pm$ 12	12	28	35	25 $\pm$ 7
ค่าครึ่งชีวิต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



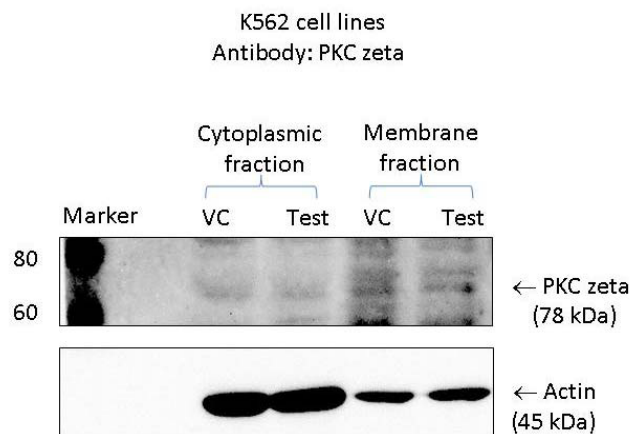
รูปที่ 40. ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบนประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 15 μM ร่วมกับ actinomycin D ต่อความคงตัวของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ทำการศึกษาโดยใช้วิธี real time PCR

ผลการทดลองที่ 14 การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนไคเนส

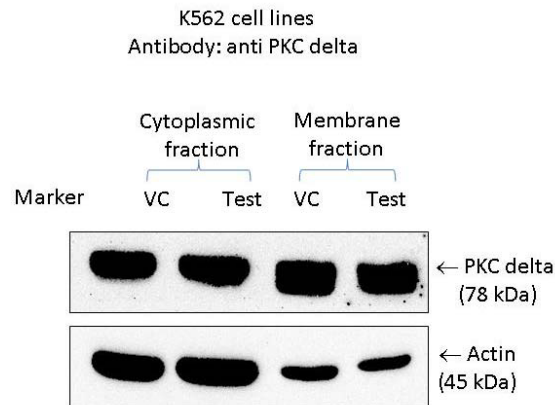
จากการศึกษาข้างต้นแสดงผลการทดลองอย่างชัดเจนว่าการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจากการทดสอบด้วยสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการทำลาย mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ดังนั้นกลไกของการลดลงของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันน่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานเนื่องจาก 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 μM 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) และเมื่อทำการศึกษาค้นคว้าผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (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



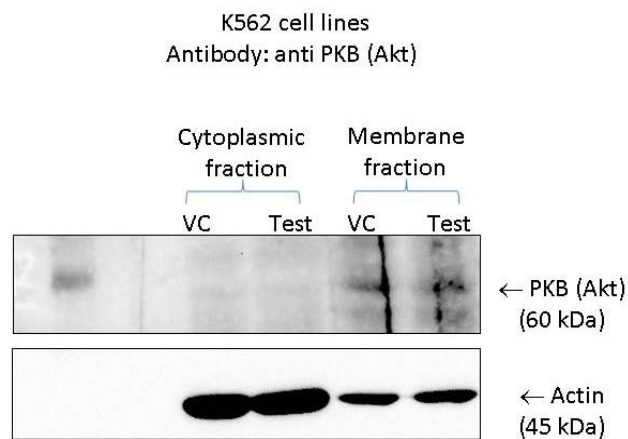
รูปที่ 41 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดแอลฟา (protein kinase C_{α}) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot



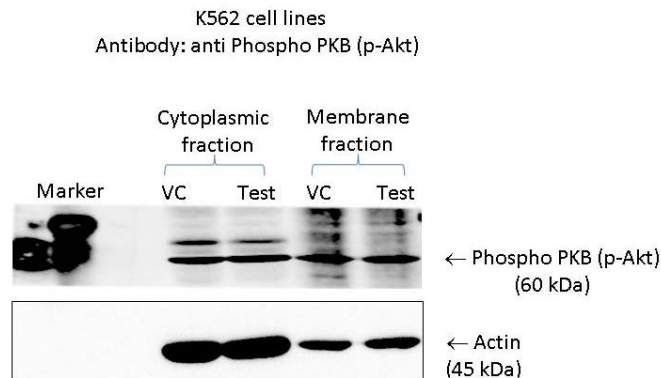
รูปที่ 42 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสซี ชนิดซีต้า (protein kinase C_{ζ}) ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot



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

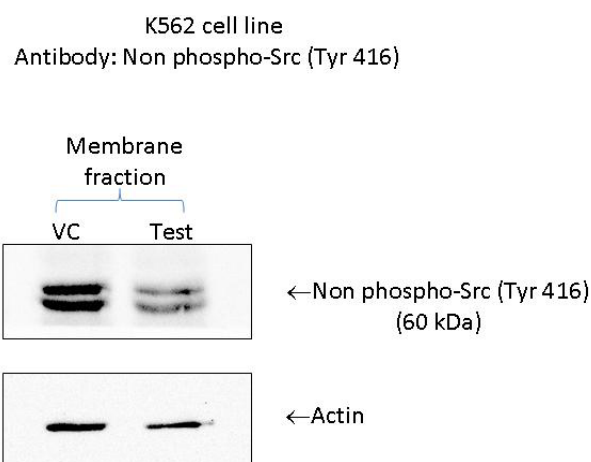


รูปที่ 44 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนไคเนสบี (protein kinase B) ชนิด non-Phosphorylated form ในเซลล์ K562 โดยวิธี Western blot



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