รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์จำเพาะที่ลดการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันและการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา และคณะ

30 สิงหาคม 2558

สัญญาเลขที่ **RSA5580029**

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์จำเพาะที่ลดการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันและการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.ทรงยศ อนุชปรีดา ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ศ.ดร.พรงาม ลิ้มตระกูล ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. Prof. Dr. Colleen Sweeney, **UC Davis Medical Center, Sacramento, California, USA**

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ ทำขึ้นเพื่อเป็นรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ต่อทุนอุดหนุนการวิจัย ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2555 โดยโครงการนี้เป็นโครงการที่ศึกษากลไกของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์จำเพาะที่ลดการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ ซึ่งที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อต้องการตอบคำถามและสนับสนุนผลการทดลองที่ผ่านมาว่า เคอร์คิวมินมีกลไกอย่างไรในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันรวมทั้งโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งกลุ่มวิจัยของเรามีรายงานว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการส่งสัญญาณในระดับอณูชีวโมเลกุลของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันใน pathway ที่เกี่ยวข้องกับ PKCα และโปรตีน JNK ซึ่งสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยมีโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเป็นโปรตีนที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์-วันด้วย แต่เนื่องจากโปรตีน JNK มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน AP1 โดยตรง จึงเป็นคำถามของการทดลองว่า AP1 มีความเกี่ยวข้องอย่างไรกับการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การทดลองนี้ได้ใช้เซลล์ K562 ซึ่งเป็น erythrocytic leukemia ที่ได้มาจากผู้ป่วย chronic myelocytic leukemia (CML) เป็นต้นแบบในการศึกษากลไกของเคอร์คิวมินในการยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถนำใช้ไปอ้างอิง และเป็นแนวทางสำหรับงานวิจัยชิ้นอื่นๆต่อไปในอนาคต ซึ่งผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานการวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยท่านอื่น ที่ทำงานเกี่ยวกับทางด้านสมุนไพรและมะเร็ง รวมทั้งผู้ที่สนใจทั่วไปได้เป็นอย่างดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)และมหาวิทยาลัย-เชียงใหม่ ปี 2555 ที่ได้มอบเงินสนับสนุนการศึกษานี้จนประสบความสำเร็จตามเป้าหมายที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี

.....
(รศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา)
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทั้งยังเคยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาขณะที่ข้าพเจ้าศึกษาปริญญาเอกเป็นอย่างสูงยิ่ง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนทั้งทางด้านเทคนิคการวิจัย และความรู้ ขอขอบคุณ รศ.ดร.ศิริพร โอโกโนกิ เป็นอย่างสูงที่สนับสนุนอุปกรณ์ ความสะดวกในการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลองในการศึกษานี้ ขอขอบคุณ Professor Dr. Colleen Sweeney และ Dr. Sheryl R. Krig รวมทั้งนักวิจัย ของสถาบัน Biochemistry & Molecular Medicine, UC Davis School of Medicine, UC Davis Medical Center, Sacramento, California, USA ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิเคราะห์การทดลองในบางส่วน ที่จำเป็นต่อการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งยังทำให้ข้าพเจ้ามีแรงบันดาลใจในการทำงานวิจัยนี้ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ ผศ. ปฐม ปฐมธนพงษ์ อาจารย์ประจำแขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ได้ให้การสนับสนุนในการวิจัยนี้เป็นอย่างดียิ่ง พร้อมทั้งให้กำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณ ขอขอบคุณ ดร. ฉายสุรีย์ ศุภวิไล ที่ได้อนุเคราะห์เซลล์มะเร็งชนิด K562 เพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของแขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิกทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งสถานที่และเครื่องมือเป็นอย่างดียิ่ง ขอขอบคุณ อาจารย์เมธี รุ่งโรจน์สกุล อาจารย์ สิงห์คำ ธิมา ที่ได้ช่วยเหลืองานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ. ปัญจะ และอาจารย์ ส่องสี กุลพงศ์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความรัก ความเมตตา เอาใจช่วยเป็นกำลังใจและสนับสนุนการทำวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนรวมงานทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีแก่ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้าที่เข้าใจ และเป็นแรงสนับสนุนในการทำงานวิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณทุนโครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง ปีงบประมาณ 2555 และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้มอบเงินสนับสนุนการศึกษานี้จนประสบความสำเร็จตามเป้าหมายที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี

รหัสโครงการ : RSA5580029

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์จำเพาะที่ลดการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์

คณะผู้ทำการวิจัย : รศ. ดร ทรงยศ อนุชปรีดา[1]
ศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล[2]
รศ. ดร. ศิริพร โอโกโนกิ[3]
Prof. Dr. Colleen Sweeney[4]

หน่วยงานที่สังกัด : [1]แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[4]Biochemistry & Molecular Medicine, UC Davis School of Medicine, UC Davis Medical Center, Sacramento, California, USA

E-mail Address : songyot.anuch@cmu.ac.th หรือ sanuchapreeda@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

บทคัดย่อ :

เคอร์คิวมิน (curcumin) เป็นสารประกอบออกฤทธิ์ของขมิ้นชัน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ที่สำคัญในการยับยั้งองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์มะเร็งที่ส่งผลผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งด้วย เช่นโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์ วิล์มทูเมอร์วัน (Wilms' tumor 1 หรือ WT1) โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเคอร์คิวมินมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการส่งสัญญานภายในเซลล์ที่ผ่านมาทางโปรตีนไคเนสซีอัลฟ่า (PKCα) และซีจูนเอ็นเทอมินอลไคเนส (c-Jun N-terminal kinase) ซึ่งมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์ม-ทูเมอร์วัน จากรายงานการวิจัยพบว่าโปรตีน WT1 มีคุณสมบัติเป็นทั้งอองโคยีน (oncogene) และทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ยีน (tumor suppressor gene) ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน รวมทั้งมะเร็งทางเลือดอื่นๆ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน WT1 ที่สูงขึ้น ทำให้เกิดลักษณะการดำเนินโรคที่ไม่ดี (poor prognosis) โดยโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่พบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดเหล่านี้มีรูปแบบเป็นแบบอองโคยีนมากกว่า เมอร์ซัพเพรสเซอร์ยีน ในการศึกษานี้ได้ศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาถึงกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยเคอร์คิวมิน จากการทดลองพบว่าโปรตีนซีจูน (c-Jun) ซึ่งเป็นโปรตีนซัพยูนิต (subunit) ของโปรตีนเอพีวัน (AP1) มีผลต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ซึ่งจากการทำซีจูนน็อคดาวน์ (c-Jun knock-down) หรือการยับยั้งการส่งสัญญานของผ่านโปรตีนซีจูนและจูนเอ็นเทอมินอลไคเนส (JNK/c-Jun pathway) มีผลทำให้ลดการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การศึกษาโดยใช้ทานชิโนนทูเอ (Tanshinone IIA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการจับของโปรตีนเอพีวัน (Jun/Fos) กับดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ ทดสอบพบว่าเมื่อยับยั้งการจับกันของเอพีวันกับดีเอ็นเอมีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันลดลงไปด้วย จากการทดลองนี้เคอร์คิวมิน

มีผลในการยับยั้งโปรตีน c-Jun ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนจูนเอ็นเทอมินอลไคเนส ทำให้ลดการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน

คำหลัก: เคอร์คิวมิน, วิล์มทูเมอร์วัน, เอพีวัน, ซีจูน, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, K562

Project Code : RSA5580029

Project Title : Mechanistic investigation of inhibitory of curcumin on specific transcription factor to downregulate *WT1* gene expression and cell cycle arrest in K562 cells

Authors : Assoc. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda[1]
Prof. Dr. Pornngarm Limtrakul[2]
Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi[3]
Prof. Dr. Colleen Sweeney[4]

Addresses : [1]Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
[3]Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
[4]Biochemistry & Molecular Medicine, UC Davis School of Medicine, UC Davis Medical Center, Sacramento, California, USA

E-mail Address : songyot.anuch@cmu.ac.th or sanuchapreeda@gmail.com

Project Period : 3 years

Abstract:

Curcumin, the active component of turmeric, is under intense investigation for its anti-cancer properties. Curcumin has been found to effect the expression of a number of important players in cancer, including the WT1 transcription factor. Our previous study revealed that curcumin-mediated inhibition of PKCα and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling contributes to curcumin-mediated down-regulation of WT1. WT1 has been purported to have both oncogenic and tumor suppressor functions. In acute leukemia and other hematological malignancies, WT1 expression is elevated, associated with poor prognosis and likely plays an oncogenic role. In this study we further investigated the mechanism by which curcumin leads to WT1 down-regulation. We find that the c-JUN transcription factor is required for robust WT1 expression in K562 leukemia cells and that knock-down of c-JUN or inhibition of its upstream kinase JNK (Jun N-terminal kinase) leads to WT1 down-regulation, underscoring the essential role of the JNK/c-JUN pathway in driving WT1 expression in leukemia cells. Tanshinone IIA, an inhibitor of AP-1 (JUN/FOS) binding to DNA similarly leads to inhibition of WT1 expression. In curcumin treated leukemia cells, c-JUN binding to the WT1 proximal promoter is significantly decreased, strongly suggesting that curcumin inhibits WT1 expression, at least in part, through preventing c-JUN-mediated expression.

Key words: curcumin, Wilms' tumor 1, AP1, c-Jun, leukemia, K562

เอกสารแนบหมายเลข 1

Executive Summary

ชื่อโครงการ (ไทย) การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์จำเพาะที่ลดการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์

(อังกฤษ) Mechanistic investigation of inhibitory of curcumin on specific transcription factor to downregulate *WT1* gene expression and cell cycle arrest in K562 cells

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ไทย) ชื่อ นายทรงยศ อนุชปรีดา

(อังกฤษ) Mr. Songyot Anuchapreeda

(ตำแหน่งวิชาการ) รองศาสตราจารย์

ที่ทำงาน

แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ (053) 945066
โทรสาร (053) 945066
E-mail songyot.anuch@cmu.ac.th หรือ sanuchapreeda@gmail.com

ชื่อพยาน (หัวหน้าภาควิชา) นางปรียานาถ วงศ์จันทร์

การเปิดบัญชีธนาคาร

ชื่อบัญชี	RSA55-ทรงยศ อนุชปรีดา	
เลขที่บัญชี	968-0-03710-9	
ธนาคาร	ธนาคารกรุงเทพ	สาขาคณะเทคนิคการแพทย์ ม. เชียงใหม่
ผู้มีอำนาจสั่งจ่าย	1. นายทรงยศ อนุชปรีดา	
	2. นางสาวสาวิตรี เจียมพานิชยกุล	
	3. นางสาวณัฐจีรา อินต๊ะใส	

เงื่อนไขการสั่งจ่าย คือลงนามไม่น้อยกว่าสองในสามโดยหนึ่งในสองต้องเป็นหัวหน้าโครงการ

Executive Summary

1. Introduction to the research problem and its significance

Turmeric, which is also known as curcumin (*Curcuma longa* Linn) is one of the most popular herbs used for medical treatment, due to its wide variety of medicinal properties such as anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antioxidant, anticarcinogen, antimutagen, and anticancer properties. The active constituents of turmeric are known as curcuminoids, yellow pigmented substances isolated from the rhizome of turmeric. This active extract can be subdivided into three distinct components: pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. Curcuminoids are a group of diet-derived agents that are being clinically evaluated as chemopreventive agents for major cancer targets, including breast, prostate, lung, stomach, duodenal, colon cancers, and leukemias (1, 2). Curcuminoids, especially pure curcumin, have strong anticancer agent and anti-tumor progression properties (3-5).

Wilms' tumor 1 (*WT1*) gene encodes 48–57 kDa nuclear protein. There are four zinc fingers which act as a transcriptional activator or repressor. This protein will bind to DNA target sequences, depending on the cellular or chromosomal context. The *WT1* gene is involved in growth regulation and is among a group of genes that are necessary for the induction of differentiation (6-8), such as platelet-derived growth factor A (PDGF-A) chain (9), *c-myc*, *bcl-2* (10), colony-stimulating factor-1 (CSF-1) (11), transforming growth factor-β1 (TGF-β1) (12), insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) (13), insulin-like growth factor II (14), retinoic acid receptor-α (RAR-α) and RNA metabolism (15-17). Thus, it is critical for development of the gonads, kidneys, liver, spleen, heart, and mesenchymal structure (18-20). Somatic homozygous mutation or loss of WT1 predisposes for the pediatric kidney cancer Wilms' tumor (6, 7). In normal hematopoietic cells, WT1 is expressed at high levels in a subset of progenitors and is found at low levels in mature cells (21-27). In addition, many study observations support the notion of WT1 as a potential oncogene in the development of human leukemia. The WT1 is highly expressed in most leukemias (28-31) and expression is further increased upon relapse of the disease (32).

The *WT1* gene is located on the human chromosome 11q13. In addition, four different isoforms of WT1 which resulted from the combination of two alternative splices have been reported in WT1-expressing cells (32). Alternative splice I insert 17 amino acids (+17AA) in exon 5 and alternative splice II insert 3 amino acids (+KTS) in exon 9 which exists between zinc-fingers 3 and 4, and yields four isoforms. There are WT1 17AA(+) KTS(+), 17AA(+)KTS(-), 17AA(-)KTS(+), and 17AA(-)KTS(-), each of which is considered to have different functions. All of the four isoforms were expressed in primary human solid cancers, including lung cancer (33), *Head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) (34), sarcoma (35), and human primary leukemia (36). Among the four WT1 isoforms, WT1 17AA(+)KTS(+) isoform was dominantly expressed in all of the cancers examined. The results showing that constitutive expression of WT1 17AA(+)KTS(+) isoform rescued the growth inhibitory effect of WT1 antisense oligomers on cancer cells (37) indicated the contribution of WT1 17AA(+)KTS(+) isoform to the growth of cancer cells (38). The functions of WT1

17AA(+)KTS(-) isoform involve to block differentiation of T lymphoid progenitor cells and in the tumorigenesis of lymphoid malignancy (39). Moreover, it also increased the expression levels of *Bcl-2* gene in G401 rhabdoid cells (40), indicating that the *WT1* gene might be involved in suppression of apoptosis. While, the WT1 17AA(-)KTS(+) isoform involve to induce G1 arrest in osteosarcoma cell line. Whereas the WT1 17AA(-)KTS(-) isoform induced G1 arrest in osteosarcoma cell lines (41). Moreover it inhibited G1/S progression and accelerated differentiation in 32D cl3 murine myeloid progenitor in response to G-CSF (42). These results indicate that each of the WT1 isoforms has different functions and play important roles in leukemogenesis and tumorigenesis. Cancers are characterized by abnormal control of proliferation. The *WT1* gene is involved in the promotion of cell cycle, as was indicated by findings that suppression of WT1 expression induced G2/M or G1 block in human leukemia K562 cells and HER2/neu overexpressing breast cancer cells, respectively (43, 44).

Interestingly, Anuchapreeda, *et al.* (45) showed that all three curcuminoids affected to cell viability and proliferation in three lukemiac cells, K562, U937, and HL-60 cells and also showed the inhibitory effects of curcumin on *WT1* gene expression in leukemia patient's cells and four leukemic cell lines (K562, Molt4, HL-60, and U937) (45-47). Furthermore, curcumin was also shown to induce cell death in two leukemic cells, K562 and Jurkat cells (48) and demonstrated that the dietary component of curcumin at 3.5 μg/mL, the low concentration, induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells (49).

The inhibitory mechanism of pure curcumin on *WT1* gene expression has been investigated recently. The inhibitory mechanism of pure curcumin passes through Protein Kinase C_{α} (PKC_{α}) signaling cascade via c-Jun N-terminal Kinase (JNK) (50). However, normally, JNK was reported to activate the c-Jun transcription factor that promotes cell proliferation and cell differentiation in cancer cells. The c-Jun is one of protein binding to c-fos as heterodimeric complex of AP-1 (Activated Protein-1) transcription factor. Upto date, the complete inhibitory signaling cascade of *WT1* gene expression has not been concluded. The signal cascade between c-Jun related AP1 as well as WT1 are not clear for *WT1* gene expression, it should be further explored to reveal the complete signaling pathway of WT1. Thus this study should be further investigated how JNK protein promotes *WT1* gene expression in leukemic cell lines using K562 as a leukemic model. The possible signaling molecule, especially the transcription factor binding to *WT1* gene promoter might be the WT1 or the AP-1 (c-Jun/c-fos complex) as transcription factor candidate that stimulate the *WT1* gene expression in leukemia cells.

Morover, as known that noncytotoxic dose of curcumin decreased leukemic cell proliferation and did not involve in cell apoptosis pathway. Thus, the inhibitory mechanism of curcumin on leukemic cell might be involved in cell cycle arrest induction via c-Jun also. The c-Jun of AP-1 was reported to trigger cell cycle progression via the restriction point (51). The previous report showed that the *WT1* gene is involved in the promotion of cell cycle, as was indicated by findings that suppression of WT1 expression induced G2/M or G1 block in human leukemia K562 cells (43-44). However the inhibitory mechanisms of non-cytotoxic dose of curcumin via JNK on cell cycle arrest have not been reported. All of these knowledge findings are the final

data to conclude the possible inhibitory mechanisms of curcumin on *WT1* gene expression and cell cycle arrest.

The aims in this study are to investigate the specific transcription factor binding to *WT1* gene promoter on *WT1* gene expression and cell cycle arrest involed in inhibitory effects of curcumin. These the aims are based on the notion that the decreasing of *WT1* gene expression by pure curcumin might be related with cell cycle arrest and intracellular signaling pathway.

2. Objectives

2.1 To investigate the possible transcription factor related to the JNK activation on WT1 promoter activation in K562 cell model.

2.2 To investigate inhibitory mechanism of JNK inhibitor and curcumin on cell cycle arrest in K562 cell line.

2.3 To investigate inhibitory protein molecule involved in cell cycle arrest in K562 cell line.

3. Methodology

3.1 Cells and cell culture conditions

Cell lines used in this study were K562 cell (human erythroid leukemia). It was maintained in RPMI 1640 containing 10 mM HEPES, 1 mM L-glutamine, 100 Units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and supplemented with 10% fetal bovine serum. The cell line was incubated in humidified 95% air, 5% CO_2 and atmosphere at 37°C.

3.2 Effect of JNK inhibitor on AP-1 or WT1 protein binding to *WT1* gene promoter

3.2.1 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay

The concept of Chromatin immunoprecipitation or ChIP is an experimental form of immunoprecipitation used to investigate the interaction between protein and DNA in the cell. It aims to determine whether specific proteins are associated with specific genomic regions, such as transcription factor on its promoters or other DNA binding sites, and possibly defining cistromes. Also, ChIP aims to determine the specific location in the genome that various histone modifications are associated with, indicating the target of the histone modifier. The method, briefly: protein with chromatin in a cell lysate is temporarily bonded, the DNA-protein complexes (chromatin-protein) are then sheared and DNA fragments associated with the proteins of interest are selectively immunoprecipitated, then the associated DNA fragments are purified and sequences are determined. These DNA sequences are supposed to be associated with the protein of interest *in vivo*

Cells will be treated with JNK inhibitor (40 nM of SP600125) compared to 15 µM curcumin as a positive control and followed by 37% formaldehyde (final concentration was 0.37%) for 10 min in room temperature to crosslink histone and DNA. Then, cross linking reaction will be stopped by adding 1.25 M

glycine (final concentration was 0.125 M) and washing the treated cells twice with cold PBS. Cells will be resuspended in cell lysis buffer (5 mM PIPE, 85 mM KCl, 1% NP40, and protease inhibitors) and incubated on ice for 15 min then centrifuged at 5,000 rpm at 4°C for 5 min. Nuclei pellet will be resuspended in nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS, and protease inhibitors) and incubated on ice for 10 min. Nuclei solution will be sonicated and then centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 10 min. Cell supernatant will be collected and added with 25 µl Strep A cell then incubated on rotating platform for 15 min to preclear chromatin. The precleared chromatin will be centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 4 min. Immuneprecipitation buffer including protease inhibitors will be added to the collected preclear chromatin solution and added Anti-WT1 (C-19) or -AP1 antibody. IgG and RNA polymerase II will be used as a negative and positive control, respectively. Precleared chromatin lysate will be rotated on platform at 4°C overnight. Twenty five microlitres of Strep A cell will be added to immunoprecipitated antibody/protein/DNA complex and rotated on platform for 15 min at room temperature to precipitate the immunoprecipiated complexes. The immunoprecipiated complex pellets will be centrifuged at 14,000 rpm at room temperature for 4 min. The pellets will be washed twice with dialysis buffer and four times with immuneprecipitation buffer. The immunoprecipiated complexes will be eluted with elution buffer (50 mM $NaHCO_3$, 1% SDS). The eluate will be added with 5 M NaCl and incubated at 65°C overnight to reverse formaldehyde cross linking. RNase A will be added to the reversal of cross links (final concentration was 100 µg/ml) and incubated at 37°C for 30 min. DNAs will be purified by Qiaquick PCR kit (Qiagne, CA, USA) and analysed by PCR.

3.2.2 Primer design

Sequence of human WT1 promoter region will be referred from GenBank^{TM} accession No. U77682. Primer design programs that will be used in this study are Primer3 Input (version 0.4.0), UCSC Genomic Bioinformatic and Vector NTI advance 10. The primers of WT1 promoter will be designed in each 500 bp. The WT1 promoter primer sequence No.1 consisted of forward primer (CTGAACGGACTCTCCAGTG) and reverse primer (CGCTGCCTTGAACTCCTTAC). The WT1 promoter primer sequence No.2 consisted of forward primer (GGCCCCTCTTATT TGAGCTT) reverse primer (CAAGAGGAA GTCCAGGATCG).

3.2.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

To confirm AP-1 or WT1 binding to WT1 promoter, after the corresponding treatments (40 nM of SP600125), nuclear fractions were isolated from JNK inhibitor treated K562 cells as previously experiment (9.2.1). For the EMSA, the oligonucleotides containing the consensus sequences for WT1 were end labeled with [^{32}P] ATP using T4 polynucleotide kinase, and purified using Chroma Spin-10 columns. Samples were incubated with the labeled oligonucleotide (20,000–30,000 cpm) for 20 min at room temperature in 1X binding buffer (10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 4% (v/v) glycerol, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl and 0.05 mg/ml poly(dI-dC). The products were separated by electrophoresis in a 6% (w/v) nondenaturing polyacrylamide gel using 0.5 3 TBE (45 mM Tris/borate, 1 mM EDTA, pH 8.3) as the

running buffer. The gels were dried and the radioactivity was quantified in a Phosphoimager 840 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

3.2.4 Supershift assay to confirm the type of transcription factor

To confirm whether or not the transcription factor that binds to the WT1 specific consensus sequence, the supershift experiment were performed by using 1 μl of antibody specific to that of transcription factor to nuclear extract in 10 μl reaction mixture and then the reaction was incubated for 60 min on ice. The reaction mixture was determined by EMSA as described in section 9.2.3.

3.3 Effect of JNK inhibitor WT1 promoter activity

3.3.1 Reporter gene assay

WT1 promoter construction vectors were kindly gifted by Professor Dr. Takashi Murate (Department of Medical Technology, Nagoya University Graduate School of Heath Sciences, Japan). The construct vector consisted of 1.8 kb-fragment covering the of 5' region of exon1 of the *WT1* gene promoter, including the WT1 binding site. The three construct vectors of -1807, -301, and -224 bp from TSS of exon1 of WT1 promoter were inserted into pGL3 basic vector. The pGL3 basic vector and renilla or β-galactosidase vectors were used as vector control and internal control, respectively. K562 cells were co-transfected with the construct vector and renilla or bata-galactosidase for 24 h and then treated with 40 nM of SP600125 (JNK inhibitor) compared to 15 μM curcumin as a positive control. The co-transfected cells were lysed by lysis buffer. Luciferase activity of the lysis solution was measured using a Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega, USA), β-galactosidase Assay Kit (Promega, USA) and a GloMax 96 Microplate Luminometer with dual injections (Promega, USA).

3.4 Effect of curcumin on related proteins in cell cycle arrest

3.4.1 Evaluation of cell cycle progression

Cells were washed with PBS and then serum-starved for 48 hr in RPMI medium containing 0.1% (v/v) FBS. Re-entry into G1 phase of cell cycle was initiated by replacement of the starvation medium with complete medium containing 40 nM of SP600125 (JNK inhibitor) and 15 μM pure curcumin. After 0, 12 and 24 hr, cells were collected and washed with PBS. The analysis of nuclear DNA was performed using the CycletestTM Plus DNA Reagent Kit. Propidium iodide-stained nuclei were analyzed by flow cytometry and the percentages of cells in the G0-G1, S, and G2-M phases of the cell cycle were determined by using the Mod Fit LT cell cycle analysis software (Verity Software, Topsham, ME).

3.4.2 Effect of JNK inhibitor and curcumin on cell cycle protein defects.

Cells (2×10^5 cells/ml) were treated with 40 nM of SP600125 (JNK inhibitor) and 15 μM pure curcumin for 24 h and then harvested and washed twice with ice-cold PBS. After washing, the cells were

lysed with lysis buffer, mixed to resuspend and the extract was rocked gently at 4°C for 30 min. Then the cell lysate was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min, and the supernatant was transferred into a clean test tube. Whole protein concentration was measured using Lowry's method (*DC* Protein Assay Kit; BioRad, USA). The membrane containing cell cycle related proteins was treated with blocking buffer for 1 h on a rocking platform. After 1 h, the blocking buffer was removed. Whole protein (500 µg) was added to the antibody-spotted membrane and incubated overnight at 4°C on the rocking platform. Then the membrane was washed with 1X washing buffer three times, for 10 min each. After washing, the membrane was treated with an antibody cocktail (human phospho-kinase antibody) and further incubated for 2 h at room temperature on a rocking platform. Then the membrane was washed three times with 1X washing buffer, for 10 min each. The membrane was treated with Streptavidin-HRP and incubated for 30 min at room temperature on a rocking platform. Then the membrane was washed three times with 1X washing buffer, for 10 min each. The signal was generated by adding an enhanced chemiluminescence reagent (Thermo Scientific, USA) and detected using the Alpha Innotech imaging station with AlphaEase FC Software that was used to capture and quantify images.

3.4.3 Effect of JNK inhibitor and curcumin on protein markers in cell cycle arrest

3.4.3.1 Whole protein lysate (crude protein)

K562 cells were treated with 40 nM of SP600125 (JNK inhibitor) and 15 µM curcumin for 24 h. Treated cells will be washed twice with cold PBS and lysed with cold RIPA buffer (50 mM Tris, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) containing protease inhibitor and incubated on ice for 30 min. Then cell lysate will be centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant will be collected into a new tube and kept at -20°C until use. Whole protein lysate contains membrane, cytosolic and nuclear proteins.

3.4.4 Western blot analysis

Samples will be loaded into 12% sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel for electrophoresis. Cyclin E, D1, and B protein detection will be performed using primary rabbit polyclonal anti-cyclin E, anti-cyclin D1, and anti-cyclin B (Santa Cruz, CA, USA), respectively. GAPDH or β-actin will be detected using mouse monoclonal anti β-actin (AC15) (Sigma-Aldrich, MO, USA) at 1:1,000, followed by staining with HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Investrogen, CA, USA) at 1:10,000 dilution for anti-cyclin E, anti-cyclin D1, anti-cyclin B and GAPDH protein detection and HRP conjugated rabbit anti-mouse antibody (Investrogen, CA, USA) at 1:10,000 for β-actin detection. Proteins will be visualized by the SuperSignal® protein detection kit (Thermo Scientific, Miami, USA) and an Alpha Innoted gel imaging system (Cell Biosciences, Inc., CA, USA). Densitomet ry will be quantitated using Alpha Innotech software.

3.5 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with SPSS software (version 10.0). All experiments were performed in duplicate and repeated at least three times. The data were expressed as the mean ± standard error of sample mean (s.e.m.). Statistical differences between the means were tested by one-way ANOVA. Probability values $P<0.05$ were considered significant.

4. Schedule for the entire project and expected outputs

Year	Research plan	Output
1-2	Investigate the possible transcription factor related to the JNK activation on WT1 promoter activation for *WT1* gene expression in K562 cell model. - Examine the effect of curcumin and JNK inhibitor on AP-1 binding to *WT1* gene promoter by ChIP assay. - Examine the effect of curcumin and JNK inhibitor on WT1 binding to *WT1* gene promoter by ChIP assay. - Investigate the effect of curcumin or AP-1 or WT1 inhibitors on WT1 promoter function by reporter gene.	To get the new knowledge about the specific transcription factor to bind to the WT1 promoter and regulate *WT1* gene expression. This knowledge will be published in the journal.
2-3	To confirm the possible transcription factor related to the JNK activation on WT1 promoter activation for *WT1* gene expression in K562 cell model. - To confirm the effect of curcumin and JNK inhibitor on AP-1 or WT1 binding to *WT1* gene promoter by EMSA. - To confirm the specific transcription factor by Supershift assay.	To get the new knowledge about the specific transcription factor to bind to the WT1 promoter and regulate *WT1* gene expression. This knowledge will be published in the journal.
2-3	Investigate inhibitory mechanism of non toxic dose of curcumin on cell cycle arrest in K562 cell line by Protein microarray.	To get the new knowledge of noncytotoxic dose of curcumin on leukemic cell cycle arrest. This knowledge will be published in

		the journal.
3	Investigate the non toxic dose of curcumin on regulatory protein control in cell cycle in K562 cell line by regulatory control inhibitors.	To get the new knowledge of noncytotoxic dose of curcumin on leukemic cell cycle arrest. This knowledge will be published in the journal.

5. Expected paper publications

1. Curcumin inhibits *Wilms' tumor 1* (*WT1*) gene expression through the JNK and AP1 or WT1 transcription factor in leukemic K562 cells, *FEBS Letters* (Impact factor 3.601).
2. Noncytotoxic dose of curcumin suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest in K562 cells, Acta Pharmacol Sin (Impact factor 1.909).

6. Names and addresses of co-investigators, assistant researcher, and student

Co-investigators

1. Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Limtrakul (Dejkriengkraikul), Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai

2. Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai

3. Assoc. Prof. Dr. Colleen A. Sweeney, UC Davis Cancer Center, 4645 2nd Avenue, Sacramento, CA 95817, USA

4. Mr. Methee Rungrojskul, Alternative Medical College, Chandrakasem, Rajabhat, 39/1, Rachadaphisek Rd, Khweang Tharakasem, Chatuchak distract, Bangkok 10900.

Student

1. Mr.Singkome Tima, Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

2. Mr.Methee Rungrojsakul, Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University

รศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา
หัวหน้าโครงการวิจัย
วันที่ 1 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2555

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	III
Abstract	V
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	VI
สารบัญอักษรย่อ	XIV
สารบัญภาพประกอบ	XVIII
สารบัญตาราง	XXI
สรุปย่อ	2
วัตถุประสงค์	3
ความสำคัญและที่มา	3
ทบทวนเอกสาร	4
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลอง	24
วิจารณ์ผลการทดลอง	53
สรุปผลการทดลอง	56
บรรณานุกรม	57
Output ที่ได้จากโครงการ	60
ภาคผนวก	62

สารบัญอักษรย่อ

%	Percent
°C	Degree celsius
cm^3	Square centrimetre
µl	Microliter
ml	Milliliter
nm	Nanometer
M	Molar
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AML	Acute myeloblastic leukemia
AP1	Activated protein 1
CDK	Cyclin dependent kinase
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CML	Chronic myelocytic leukemia
CO_2	Carbon dioxide
ddH_2O	Deionized distilled water
DNA	Deoxynucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
HCl	Hydrochloric
HEPES	N-2-Hydroxythylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid
IC_{20}	Inhibitory concentration at 20% growth
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Potassium chloride
KH_2PO_4	Potassium dihydrogen phosphate
NaCl	Sodium chloride
$NaHCO_3$	Sodium hydrogen carbonate
NaH_2PO_4	Sodium dihydrogen phosphate
NaOH	Sodium hydroxide
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffer saline
K562	Human Chronic myelogenous leukemic cell line
Molt4	Human acute lymphoblastic leukemia

MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-y)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
PKC_{α}	Protein kinase C
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute
shRNA	Small hairpin ribonucleic acid
VC	Vehicle control
WT1	Wilms' tumor 1

สารบัญภาพประกอบ

รูปภาพที่		หน้า
1.	ตำแหน่งของยีน *WT1* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 แขนข้างสั้น บริเวณ region ที่ 1 band ที่ 3 (11p13)	6
2.	ตำแหน่งของยีน *WT1* และโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีน WT1	7
3.	โครงสร้างและส่วนประกอบของ AP1	8
4.	ลักษณะลำต้นและรากของ *Salvia miltiorrhiza* หรือโสม	9
5.	ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสาร SP600125	10
6.	วัฏจักรเซลล์และการควบคุมวัฏจักรเซลล์โดยโปรตีนในกลุ่ม cyclin, CDK และ tumor suppressor	13
7.	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขมิ้นชัน	13
8.	โครงสร้างทางเคมีของสารเคอร์คิวมินอยด์	14
9.	กราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน	18
10.	ตัวอย่าง normal cell cycle distribution	21
11.	ผล cytotoxicity ของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี MTT ที่ระยะเวลา 24 (a) และ 48 (b) ชั่วโมง	25
12.	แสดงผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของโปรตีน Phospho-kinase จากการศึกษาด้วยวิธี Protein microarray	26
13.	ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อระดับโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เวลา 24 ชั่วโมง	27
14.	กราฟแสดงผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), SP600125 (JNK inhibitor) และ Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) ต่อระดับโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เวลา 24 ชั่วโมง	29
15.	ผลของเคอร์คิวมิน SP600125 และ Tanshinone IIA ต่อจำนวนเซลล์ K562 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดย (A) คือเคอร์คิวมิน (B) SP600125 และ (C) Tanshinone IIA ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์โดยใช้วิธี trypan blue exclusion	31
16.	ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot	32
17.	ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 วิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบด้วยโปรแกรม Quantity one (BIO-RAD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)	33
18.	ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-	33

Jun ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot
19. ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีนc-Jun ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 วิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบด้วยโปรแกรม Quantity one (BIO-RAD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment) 34
20. ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot 35
21. ผลของสาร Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยแสดงผลการทดลองด้วยวิธี Western blot และวิเคราะห์ความเข้มของแถบด้วยโปรแกรม Quantity one (BIO-RAD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time independent study) 36
22. แสดงจำนวนเซลล์หลังจากทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM โดยวิธี Trypan blue exclusion 36
23. บริเวณ WT1 binding site และ AP1 binding site ที่ proximal *WT1* gene promoter 37
24. ผลของเคอร์คิวมินต่อการเกิด WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของ WT1 ด้วยวิธี ChIP assay 39
25. ผลของ Tanshinone IIA ต่อการเกิด WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของ WT1 ด้วยวิธี ChIP assay 40
26. ผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการทำงานของ WT1 promoter reporter ที่ 24 ชั่วโมง โดยวิธี Luciferase activity 42
27. แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 โดย (a) Flow cytometry หลังจากการทดสอบด้วย (b) เคอร์คิวมิน (curcumin) และ (c) SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment) 45
28. แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 โดย (a) Flow cytometry หลังจากการทดสอบด้วย (b) เคอร์คิวมิน (curcumin) และ (c) SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment) 46
29. แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 โดย (a) Flow cytometry หลังจากการทดสอบด้วย (b) เคอร์-คิวมิน (curcumin) และ (c) SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment) 47
30. ผลของสาร Tanshinone IIA ในเซลล์ K562 ต่อการชะลอตัวในวัฏจักรเซลล์โดยวิธีโฟลไซโตเมตทรี (Flow cytometry) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน 49
31. การทำงานของโปรตีน cyclin A และ cyclin B ในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) 49
32. ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK 50

inhibitor) ต่อการแสดงออกของโปรตีน cyclin A, cyclin B และ cdc2 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

33. ผลของ c-Jun knockdown ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Jun และ WT1 52

34. แสดงโปรตีน AP1 ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน c-Jun และ c-Fos เมื่อถูกเติมฟอสเฟตแล้วสามารถจับบริเวณ AP1 binding site ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1* เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1* 56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ปริมาณสารในการเตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	19
2.	ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อระดับโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot	28
3.	ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562	30
4.	แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน WT1 ที่เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM	32
5.	ผลการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ที่เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM	34
6.	แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ที่เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM	35
7.	ผลของเคอร์คิวมินและ Tanshinone IIA ต่อ WT1- และ c-Jun/AP1-DNA binding ที่ WT1 promoter (-301 bp) โดยวิธี ChIP	38
8.	ผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการทำงานของ WT1 promoter โดยวิธี luciferase activity	41
9.	แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 หลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (curcumin) และ SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)	44
10.	แสดงผลของ Tanshinone IIA ต่อร้อยละจำนวนเซลล์ที่อยู่ในแต่ละระยะ (phase) ของวัฏจักรเซลล์ในเซลล์ K562 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	48
11.	ผลการแสดงออกของโปรตีน c-Jun และ WT1 เมื่อทำการ knockdown การแสดงออกของโปรตีน c-Jun โดยใช้ระบบ c-Jun shRNA (short hairpin RNA) lentiviral particle โดยใช้ Lrig1 shRNA เป็น shRNA control	51
12.	ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 15 μM ในระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ต่อร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (mean ± SD) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือขาว U937 ที่ถูก transfect ด้วย WT1 (+/+) isoform	58

สัญญาเลขที่ RSA5580029

รายงานฉบับสมบูรณ์ ของหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ชื่อโครงการ (ไทย) การศึกษากลไกของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์จำเพาะที่ลดการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์

(อังกฤษ) Mechanistic investigation of inhibitory of curcumin on specific transcription factor to downregulate *WT1* gene expression and cell cycle arrest in K562 cells

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ไทย) ชื่อ นายทรงยศ อนุชปรีดา

(อังกฤษ) Mr. Songyot Anuchapreeda

(ตำแหน่งวิชาการ) รองศาสตราจารย์

ที่ทำงาน

แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ (053) 945066
โทรสาร (053) 945066
E-mail: songyot.anuch@cmu.ac.th หรือ sanuchapreeda@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 24 สิงหาคม 2555 **ถึง** 24 กรกฎาคม 2558

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

1. สรุปย่อ (Summary)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการวิจัยกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (Wilms' tumor1 หรือ WT1) โดยปัญหาของการวิจัยเกิดจากความไม่แน่ใจของกลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์ K562 (chronic myelocytic leukemia) โดยโปรตีน c-Jun N terminal kinase (JNK) ซึ่งนำมาสู่ปัญหาของการวิจัยหลักในครั้งนี้ เนื่องจากโดยทั่วไปแล้ว JNK เป็นโปรตีนที่มีบทบาทหน้าที่เติม phosphate ให้กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องโดยเฉพาะ AP1 (Activated Protein 1) ซึ่งเป็นโปรตีนซึ่งมีองค์ประกอบแบบ heterodimer ของโปรตีนย่อย c-Jun และ c-Fos อีกทั้งยังไม่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน WT มาก่อน จึงทำให้เกิดความสงสัยว่า การทำงานของยีนโปรโมเตอร์ของ WT1 ที่มีผลต่อการเกิดการแสดงออกของยีน *WT1* ให้เป็น WT1 mRNA และโปรตีน WT1 ตามลำดับนั้นโปรตีน WT1 หรือ AP1 เป็นตัวทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1* กันแน่ เนื่องจากที่บริเวณยีนโปรโมเตอร์ของ *WT1* มีทั้ง consensus sequence ของ WT1 (GGCTCCCACAC) และ AP1 อยู่ด้วยกัน (TGAGTGA) เพื่อทำให้ความกระจ่างของกลไกในส่วนนี้ จึงได้ทำการศึกษาและทดลอง โดยเริ่มต้นจากการศึกษาความเข้มข้นของสารที่จะนำมาใช้เพื่อการทดสอบ ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารทั้ง 3 ชนิดคือ เคอร์คิวมิน (curcumin) Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดโดยใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory concentration at 50%) หรือ IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.5, >100 และ 62.5 µM ตามลำดับ มีค่า IC_{20} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *WT1* ในการทดลองถัดไป พบว่าให้ค่า IC_{20} ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 17.7, 2.1 และ 6.2 µM ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสารทั้ง 3 ชนิดต่อการแสดงออกของยีน *WT1* พบว่าเคอร์คิวมิน มีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 เป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (5, 10 และ 15 µM) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งเท่ากับ 13.3, 22.3 และ 53.8% ส่วน Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) มีผลยับยั้ง เท่ากับ 17.4, 43.2 และ 40.1% และได้ทำการศึกษา SP600125 (JNK inhibitor) เปรียบเทียบผลการทดลองด้วย ซึ่งให้ผลในการยับยั้ง เท่ากับ 7.9, 18.9 และ 23.6% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการ confirm ผลการทดลองของ Tanshinone IIA ที่ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า Tanshinone IIA สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ลง 9.9 ± 3.6%, 33.3 ± 9.4% และ 57.0 ± 12.2% เมื่อใช้ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 µM ตามลำดับ ดังนั้นจะพบว่าสารทั้ง 3 ชนิดสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ได้เช่นเดียวกัน ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการเกิด WT1-DNA และ c-Jun-DNA complex พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเกิด WT1-DNA complex ได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 31% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) และสามารถยับยั้ง c-Jun-DNA complex ได้เท่ากับ 56% แต่อย่างไรก็ตามการจับกันระหว่าง c-Jun และ DNA นั้นพบว่าเกิดน้อยกว่า WT1-DNA complex โดย c-Jun-DNA complex เกิดขึ้นเพียง 51.6% เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับ WT1-DNA complex (ให้เป็น 100%) และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้ Tanshinone IIA ผลการทดลองพบว่า Tanshinone IIA สามารถยับยั้ง WT1-DNA และ c-Jun-DNA complex ลง 94% และ 54% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า โปรตีน AP1

น่าจะมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน WT1 อย่างไรก็ตามการยับยั้ง Protein-DNA binding จำเป็นต้องมีการศึกษาผลของ เคอร์คิวมิน c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) และ JNK inhibitor (SP600125) ต่อการทำงานของยีน *WT1* โดยวิธี Reporter gene (Luciferase activity) จากผลการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมิน c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) และ JNK inhibitor (SP600125) ที่ความเข้มข้น 15 μM สามารถยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ลง 39.28, 30.59 และ 79.09% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p<0.05) ผลการทดลองได้ทำการ confirm ผลการทดลองอีกครั้งด้วยการทำ c-Jun knockdown พบว่าเมื่อทำการ knockdown การแสดงออกของยีน *c-Jun* มีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน WT1 ลดลง 33% ซึ่งทำให้ทราบว่าการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ส่งผลต่อการสดงออกของโปรตีน WT1 ด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าทั้ง c-Jun/AP1 และ WT1 มีการทำงานร่วมกัน ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* จากการศึกษาผลของเคอร์คิว-มิน ต่อการชะลอตัวของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) โดยวิธี flow cytometry พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 15 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงมีผลทำให้เซลล์ชะลอการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะ G2/M และจากการศึกษาผลของ SP600125 ซึ่งเป็น JNK inhibitor พบว่าให้ผลของการชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์ K562 ที่ในระยะ G2/M เช่นเดียวกัน เมื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องการการเกิด cell cycle arrest โดยการศึกษาโปรตีน cdc2 (CDK1), cyclin A และ cyclin B พบว่าหลังจากทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน และ SP00125 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง cyclin B และ cdc2 ลดระดับของการแสดงออกลงได้อย่างชัดเจน ส่วน Tashinone IIA พบว่าทั้ง cyclin A, cyclin B และ cdc2 ลดการแสดงออกลงทั้งหมด

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ (Objectives)

1. เพื่อศึกษาโปรตีน transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของโปรตีน JNK ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรโมเตอร์ของ WT1 (WT1 promoter activation) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562
2. เพื่อศึกษากลไกของ JNK inhibitor และ curcumin ต่อการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562
3. เพื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

3. ความสำคัญและที่มา (Introduction to the research problem and its significance)

เนื่องจากปัจจุบันมีผู้ป่วยเป็นมะเร็งและเสียชีวิตจากโรคมะเร็งจำนวนมาก ซึ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดจากที่เซลล์เม็ดเลือดในไขกระดูกเจริญเติบโตผิดปกติ ทำให้มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดที่ผิดปกติออกมามากในกระแสเลือด โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน (blast cell) ส่งผลให้มีระบบการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดเสียไป จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Sugiyama และคณะ (1) พบว่ายีนวิล์มทูเมอร์วัน (*Wilm's tumor 1*;*WT1*) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทำหน้าที่เป็นออโคยีน (oncogene) นอกจากนี้การศึกษาของ Yamagami และคณะ (2) พบว่าการใช้ WT1 anti-sense เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน พบว่าสามารถลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ ดังนั้น WT1

จึงน่าที่จะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และจากการศึกษากลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อกระตุ้นการทำงานของโปรตีน WT1 ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1* โดย Semsri และคณะ (3) พบว่าการทำงานของโปรตีน WT1 มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signal transduction) โดยผ่านโปรตีนที่สำคัญคือ protein kinase C alpha (PKC_{α}) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรก ปกติแล้วโปรตีน JNK จะมีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน activating protein 1 (AP1) ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีน c-Jun และ c-Fos (c-Jun/c-Fos heterodimer)โดย JNK จะทำหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน c-Jun เพื่อทำให้เกิดการรวมตัวกับโปรตีน c-Fos และจากการศึกษาของ Roman และคณะ (4) พบว่าโปรตีน c-Jun สามารถจับกับ DNA ที่บริเวณ consensus sequence ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญที่เป็นที่จับของโปรตีน AP1 หรือที่เรียกว่า AP1 binding site โดยการจับกันของโปรตีน AP1 กับ DNA มักเกี่ยวข้องหรือส่งผลทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีนต่างๆ ที่โปรตีน AP1 เข้าไปจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ โดยเฉพาะหากมีการเหนี่ยวนำของ 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (5) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้านปลาย 5' ของยีน ซึ่งเป็นส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *WT1* พบว่ามีลำดับเบสสั้นๆ คือ TGACTCA ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สำคัญต่อการจับของโปรตีน AP1 ที่อยู่ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1* จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสของยีน *WT1* จึงทำให้เป็นที่น่าสนใจว่าการแสดงออกของยีน *WT1* น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน AP1 หรือโปรตีน AP1 ร่วมกับ WT1 ก็เป็นได้ ซึ่งนำไปสู่การทดลอง โดยการใช้ Tanshinone IIA (AP1-DNA binding inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) มาเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาผลของ AP1 ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1 โดย Tanshinone IIA เป็นสารที่สกัดได้จากโสม มีคุณสมบัติในการยับยั้งการจับของ AP1 กับ DNA หรือที่เรียกว่า AP1-DNA binding inhibitor ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีสมมุติฐานว่า ถ้า AP1 มีบทบาทในการแสดงออกของยีน *WT1* จริง เมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ AP1 โดยใช้ AP1-DNA binding inhibitor (Tanshinone IIA) แล้ว การแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับโปรตีน ก็น่าจะมีระดับลดลง ซึ่งการลดลงของกรแสดงออกของยีน WT1 นั้นน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ด้วย

4. ทบทวนเอกสาร (Review Literature)

มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) คือ กลุ่มอาการที่มีการสร้างหรือเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน (blast cells) หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวแก่ (mature leukocyte) มากผิดปกติ โดยสามารถเกิดได้ทั้งในไขกระดูก (bone marrow) และในกระแสโลหิต (blood circulation) สำหรับลักษณะอาการโดยรวมของมะเร็งเม็ดเลือดขาว คือ พบเซลล์มะเร็งเข้าไปเจริญเติบโตแทนที่ไขกระดูกและรบกวนการทำงานของไขกระดูก จากนั้นจึงมีการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นๆ และในรายที่ไม่ได้รับการรักษาผู้ป่วยจะเสียชีวิตในที่สุด

ความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดที่เป็นมะเร็งนี้ สามารถเกิดขึ้นได้กับการเจริญในทุกระยะทั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) การพัฒนาการของเซลล์ (differentiation) รวมไปถึงการแก่ตัวของเซลล์ (maturation) และสามารถจัดจำแนกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามการเจริญ (cell maturity) ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) ซึ่งการดำเนินโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้พบเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะเป็น

เซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนเป็นจำนวนมาก และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) ซึ่งการดำเนินโรคจะช้ากว่าทำให้พบเซลล์มะเร็งทั้งในรูปเซลล์ตัวอ่อนและเซลล์ตัวแก่ นอกจากอาศัยหลักเกณฑ์การเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ยังสามารถจัดแบ่งได้โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของสายการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell lineage) ซึ่งจะทำให้แบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม lymphoid และกลุ่ม myeloid โดยกลุ่ม myeloid จะรวมเอา granulocytic, monocytic, megakaryocytic และ erythrocytic leukemia เข้าไว้ด้วยกัน นอกจากนี้หากอาศัยทั้งหลักเกณฑ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell maturity) ควบคู่กับสายการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell lineage) มาจัดจำแนกประเภทของมะเร็งเม็ดเลือดขาว จะทำให้สามารถจัดแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloblastic leukemia (AML), chronic lymphocytic leukemia (CLL) และ chronic myelocytic leukemia (CML)

สาเหตุของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว

1. การติดเชื้อไวรัส (viral infection) เช่น Human-T-lymphocyte leukemia virus (HTLV) สำหรับสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่ยีนของไวรัส HTLV ได้สอดแทรกเข้าไประหว่างยีนต่างๆ ของเซลล์เม็ดเลือด ดังนั้นจึงทำให้ข้อมูลทางพันธุกรรมผิดไปจากปกติ และการแปลรหัสผ่านยีนผิดเพี้ยนไปจากเดิม จนเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เสียกลไกในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (cell differentiation) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell maturation) ตามวัฏจักรที่ควรจะเป็น

2. สารเคมีบางชนิดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนและข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ เช่น สารในกลุ่ม benzene

3. สารรังสีที่มีบทบาททำให้สารพันธุกรรม (DNA) เกิดการแตกหักซึ่งอาจส่งผลให้เกิดข้อมูลผิดพลาดในระหว่างการซ่อมแซมสาย DNA

4. ความผิดปกติในการสร้างและการทำงานของโครโมโซม เช่น Philadelphia chromosome (Ph') ใน hematopoietic cells คือ มีการ translocation ของแขนข้างยาว (long arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 22 ไปต่อกับแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 9 (22q-,9q+) ทำให้ c-Abl proto-ongcogene ซึ่งปกติอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 9 (translocate) เกิดการย้ายตำแหน่งไปอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 22 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใกล้กับ breakpoint cluster region (Bcr) จนเกิดเป็น Bcr-Abl hybrid oncogene ซึ่งมีผลให้ gene amplification และ transcription ที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจากปกติ และเป็นโปรตีนที่มีการทำงานของ tyrosine kinase เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ และไม่สามารถควบคุมได้ จึงสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาในขณะที่การเจริญไปเป็นเซลล์ตัวแก่ (mature cells) ที่ลดลง

5. พันธุกรรม กล่าวคือ หากในประวัติครอบครัวมีสมาชิกป่วยเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ามีโอกาสที่ลูกหลานจะเป็นโรคนี้มีค่อนข้างสูง

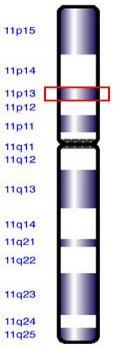
6. เชื้อชาติ พบว่าอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงมากกว่าปกติในคนบางเชื้อชาติ เช่น ในประชากรอเมริกามีอุบัติการณ์สูงกว่าประชากรญี่ปุ่นทั่วๆไป ยกเว้นในเมืองฮิโรชิมาและนางาซากิ ซึ่งเป็นเมืองที่เคยมีประวัติได้รับสารกัมมันตรังสีจากระเบิดปรมณู

ยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1* (*WT1*) gene and WT1 protein)

ในปี ค.ศ. 1899 Max Wilms ได้ค้นพบยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1* gene หรือ *WT1* gene) เป็นครั้งแรก โดยได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งไตในเด็กที่เรียกว่า nephroblastoma หรือวิล์มทูเมอร์ (Wilms' tumor) ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยในเด็ก อุบัติการณ์ของโรคในเด็กเกิดใหม่มีชีวิตรอดประมาณ 1 รายต่อ 10,000 – 20,000 ราย (6) เด็กที่เป็นโรคนี้จะมีการทำหน้าที่ของไตที่ผิดปกติ จากการศึกษาในระดับอณูชีวโมเลกุลสามารถพิสูจน์ได้ว่ายีน *WT1* เป็นยีนหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดวิล์มทูเมอร์ (7)

โครงสร้างและหน้าที่ของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน

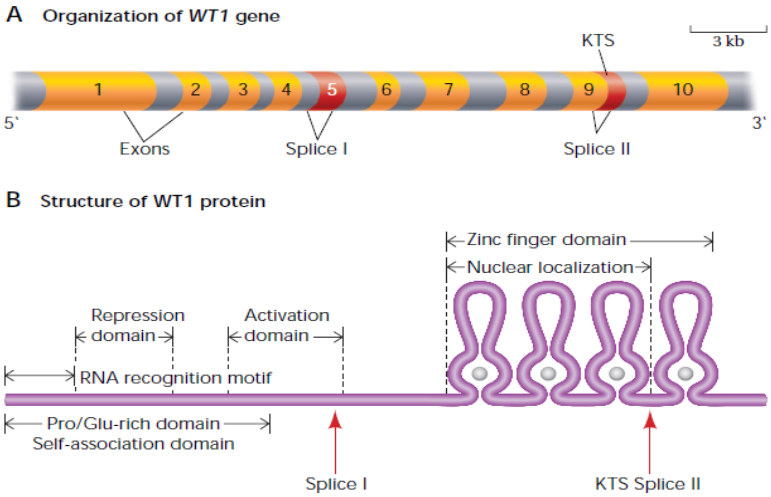
ในปี ค.ศ. 1990 Call และคณะ (8) ได้ค้นพบว่ายีน *WT1* มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 บริเวณ region ที่ 1 band ที่ 3 (11q13) มีขนาด 50 kb (รูปที่ 1) ยีน *WT1* ประกอบด้วย 10 เอกซอน เมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) จะได้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่มีขนาด 3 kb และเมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัสจะได้โปรตีนที่เรียกว่า โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (WT1 protein) ซึ่งโปรตีน WT1 มีลักษณะเป็นซิงก์ฟิงเกอร์-โมทีฟ (zinc finger motif) โครงสร้างหลักประกอบด้วยส่วนซิงก์ฟิงเกอร์ ทั้งหมด 4 อันทางปลายด้านคาร์บอกซิลทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (DNA-binding domain) และส่วนปลายด้านกรดอะมิโนจะมีกรดอะมิโนชนิดโพรลีนและกลูตามีนจำนวนมาก ดังแสดงในรูป 2 ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน ทำให้โปรตีน WT1 มีหน้าที่เป็นทรานสคริปชั่นแฟกเตอร์ (transcription factor) มีหน้าที่ส่วนใหญ่อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์



รูปที่ 1 ตำแหน่งของยีน *WT1* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 แขนข้างสั้น บริเวณ region ที่ 1 band ที่ 3 (11p13)

ยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันกับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว

ในปี ค.ศ. 1995 Sugiyama และคณะ (1) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน*WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และพบว่ามีการแสดงออกของยีน *WT1* ชนิดดั้งเดิมที่สูงมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกลุ่มของสายมัยอิลอยด์ (myeloid) และลิมพ์ฟอยด์ (lymphoid) และยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *WT1* แปรผกผันกับการทำนายโรคในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและพบการแสดงออกของยีน *WT1* ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นโรคซ้ำอีกครั้ง (relapse) จากผลการศึกษาจึงสรุปได้ว่ายีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทำหน้าที่เป็นอองโคยีน (oncogene) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Yamagami และคณะ (2) พบว่าการใช้ WT1 anti-sense สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ และจากการศึกษาของ Mens-



รูปที่ 2 ตำแหน่งของยีน *WT1* และโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีน WT1 ซึ่งมีลักษณะเป็นซิงก์ฟิงเกอร์ (Zinc finger) 4 อัน และที่ปลาย C-terminal และพบว่ามีโพรลีนและกลูตามีนจำนวนมากที่ translegulatory domain ที่ปลาย N-terminal มีส่วนที่เรียกว่า alternative splices อยู่ 2 บริเวณ บริเวณแรกสามารถสอดแทรกกรดอะมิโนได้ 17 ตัว ส่วนที่ 2 สามารถแทรกกรดอะมิโนได้ 3 ตัวระหว่าง Zinc finger ตัวที่ 3 และ 4

sen และคณะ (9) ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีนและโปรตีน WT1ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้-ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มต่างๆ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน WT1 ดังนี้ acute myeloblastic leukemia (AML) 93%, pre B-cell acute lymphoblastic leukemia 86%, acute lymphoblastic leukemia (ALL) 80% และ T-cell acute lymphoblastic leukemia 74% จากการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ายีน *WT1* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นทำหน้าที่เป็นออองโคยีนมากกว่ายีนทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ และพบว่ามีการแสดงออกของยีน *WT1* เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ดังนั้นทำให้สามารถใช้การแสดงออกของยีนและโปรตีน WT1 เป็นดัชนีบ่งชี้ (marker) สำหรับตรวจหาความรุนแรง (severity) และการพยากรณ์โรค (prognosis) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้

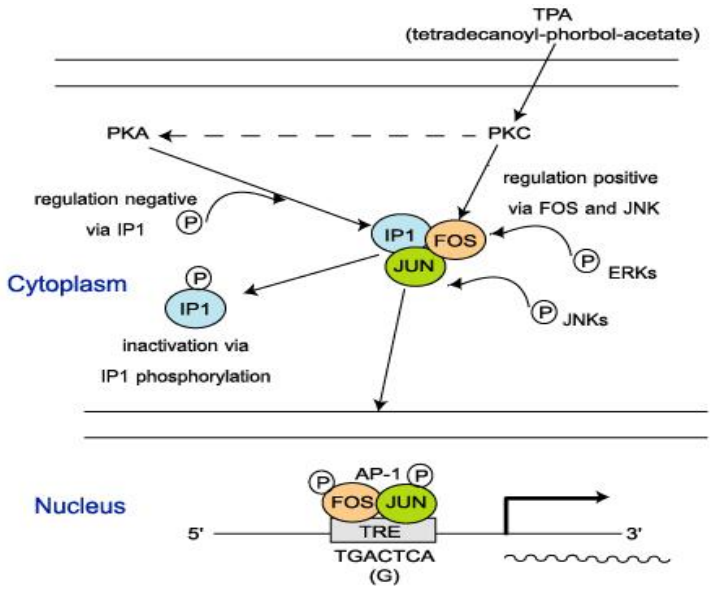
Transcription factor activator protein 1 (AP1)

AP1 เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโปรตีน c-Jun และ c-Fos ที่รวมตัวกันแบบ heterodimer ถูกควบคุมการแสดงออกโดย mitogen-activated protein kinase (MAPK) โดยเอนไซม์ MAPK (10-12) ซึ่งเป็นกลุ่มของ serine-threonine kinase จะทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของโปรตีน AP1 ในขั้นตอนก่อนกระบวนการถอดรหัส (transcription) ในหลายๆยีนพบว่า TPA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ซึ่ง TPA เป็นสารที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ PKC และส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AP1 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในด้านปลาย 5’ ของยีนโปรโมเตอร์ พบว่ามีลำดับเบสสั้นๆคือ TGACTCA ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดย TPA จากการศึกษาของ Lee และคณะ (13) พบว่า AP1 มีผลต่อการกระตุ้นกระบวนในการถอดรหัสโดย การจับที่บริเวณ TPA responsive element (TRE) sequence ที่ยีนโปรโมเตอร์ และสามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการถอดรหัสได้ในหลอดทดลอง การศึกษานี้ใช้ยีน *human metallothionein IIa* เป็นต้นแบบในการศึกษา โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า AP1 มีบทบาทเป็น

oncogene (v-jun) และพบว่ามีบริเวณที่จับของ AP1 ที่คล้ายกันมากกับโปรตีน GCN4 ซึ่งเป็น transcription factor ในกระบวนการถอดรหัสของยีสต์ จากการศึกษาโปรโตอองโคยีน (protooncogene) c-Jun พบว่าสามารถ encode โปรตีนที่สามารถจับกับ DNA ได้ พบว่ามีโครงสร้างและบทบาทที่เหมือนกับโปรตีน AP1 ซึ่งมาทราบภายหลังว่า c-Jun เป็นองค์ประกอบหนึ่งของโปรตีน AP1 และจากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าโปรตีน c-Jun และ c-Fos มีการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า AP1 ซึ่งมีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่มี sequence แบบจำเพาะสำหรับโปรตีน AP1

โปรตีน c-Jun และ c-Fos (14)

โปรตีน c-Jun สามารถจับกับสาย DNA ได้ซึ่งจะจับที่ตำแหน่งของ AP1 binding site โดยที่อาจจะมีการจับกับโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่เป็นแบบ homodimer เช่น จับกับโปรตีน c-Jun อีกตัวหนึ่ง (c-Jun/c-Jun homodimer) แล้วไปจับที่ DNA แต่พบว่าการจับนั้นไม่ดีเท่ากับการฟอร์ม heterodimer ระหว่าง c-Jun และ c-Fos ถึงแม้ว่าโปรตีน c-Fos จะไม่สามารถกับ DNA ด้วยตัวเอง แต่จะสามารถจับจำเพาะกับ DNA เมื่อจับกับโปรตีน c-Jun โดย heterodimer จะจับกับ AP1 ได้จะต้องมีการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ที่ตำแหน่ง 63 และ 73 ทางด้าน N-terminal transactivation domain (TAD) ของ โปรตีน c-Jun โดยอาศัยเอนไซม์ c-Jun N-terminal kinase (JNK) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตนี้ เป็นการกระตุ้นให้มีการทำงานของโปรตีน c-Jun และการทำงานของโปรตีน c-Fos จะมีการกระตุ้นโดยโปรตีน extracellular signal-regulated kinase (ERKs) ซึ่งจะทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน c-Fos ดังแสดงในรูปที่ 3



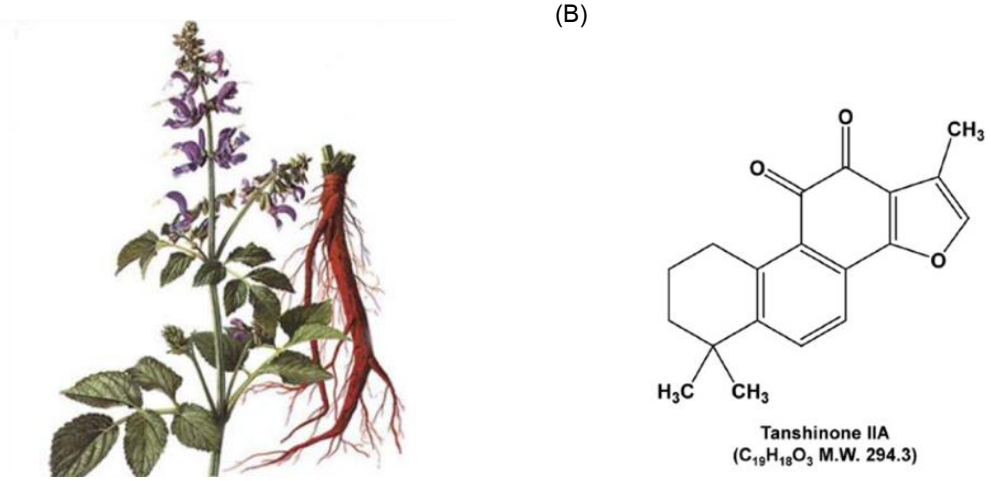
รูปที่ 3 โครงสร้างและส่วนประกอบของ AP1

(ดัดแปลงจาก http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/Cancer/_FR/Oncogene/fosju.html)

Tanshinone IIA

Tanshinone IIA (15) เป็นสารประกอบหลักที่ได้จากการสกัดรากของโสม (*Salvia miltiorrhiza*) (รูปที่ 4A) โสมเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจและโรคมะเร็งต่างๆ ซึ่ง Tanshinone IIA (รูปที่ 4B) นี้มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยลดการสังเคราะห์ TNF-α และ IL-1β สาร Tanshinone IIA ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถลดระดับของสารอนุมูลอิสระ เช่น iNOS และ reactive oxygen species (ROS) และใช้ในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาท นอกจากนี้ Tanshinone IIA ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่างๆ ได้ เช่น มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยมีผลต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น โปรตีน p53, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) และ phosphoinositide 3-kinase/AKT เป็นต้น (16, 17) พบว่า Tanshinone IIA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) ได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL60 และ K562 โดยกระตุ้นการทำงานของโปรตีน caspase 3 แต่ก็ยังไม่มีการรายงานกลไกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังที่ชัดเจน

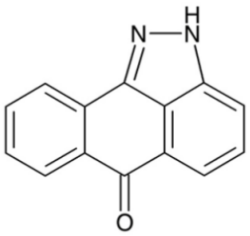
(A) (B)



รูปที่ 4 (A) ลักษณะลำต้นและรากของ *Salvia miltiorrhiza* หรือโสม
(ที่มา: http://kaleidoscope.cultural-china.com) (B) แสดงลักษณะโครงสร้างของ Tanshinone IIA

SP600125

SP600125 เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{14}H_8N_2O$ ดังแสดงในรูปที่ 5 มีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและเซลล์เอนโดทีเรียล (endothelial cells) ในระยะ G_2 ของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และยังพบว่ามีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีน JNK (JNK inhibitor) โดยทำหน้าที่ยับยั้งไม่ให้ JNK เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน c-Jun ที่เป็น heterodimer ของโปรตีน AP1 complex ซึ่งสาร SP600125 นี้มักนำมาใช้เพื่อเป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้ในการศึกษาผลของ JNK ต่อโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ เช่นในการศึกษาในครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของโปรตีน JNK ต่อการทำงานของโปรตีน WT1 เป็นต้น



รูปที่ 5 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสาร SP600125

วัฏจักรเซลล์ (Cell cycle)

ในการแบ่งตัวของเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์นั้นจะต้องผ่านวัฏจักรเซลล์ การควบคุมวัฏจักรเซลล์เพื่อให้ภายในเซลล์อยู่ในภาวะสมดุล เป็นสิ่งจำเป็นในการควบคุมปริมาณเซลล์ และความถูกต้องของข้อมูลพันธุกรรมภายในเซลล์ หากมีความผิดปกติเกิดขึ้นในกระบวนการดังกล่าว ทำให้เซลล์ไม่มีการแบ่งตัวและจะมีกระบวนการซ่อมแซมตัวเอง เพื่อให้เซลล์มีความผิดปกติและสมบูรณ์ดังเดิมก่อนเข้าสู่รอบการแบ่งตัวต่อไปหากไม่สามารถซ่อมแซมได้ในที่สุด เซลล์จะถูกกำหนดให้เข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ในที่สุด หากเซลล์มีความผิดปกติของดีเอ็นเอ ความผิดปกติในส่วนของกลไกการควบคุมการซ่อมแซมดีเอ็นเอรวมไปถึงกลไกการควบคุมวัฏจักรเซลล์ จะส่งผลทำให้เซลล์เกิดความผิดปกติ ซึ่งจะทำให้นำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ในที่สุด (18) เนื่องจากเซลล์ภายในร่างกายแต่ละเซลล์นั้นมีอายุที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีอัตราของการสร้างเซลล์ใหม่มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ บางเซลล์ไม่มีการสร้างใหม่เลย เช่นเซลล์ประสาท (neuron cell) เซลล์กล้ามเนื้อ (skeletal muscle cell) เป็นต้น เซลล์เหล่านี้ตลอดชีวิตของเซลล์จะอยู่ที่ระยะ G_1 เสมอ วัฏจักรเซลล์แบ่งออกเป็น 4 ระยะคือ G_1, S, G_2 และ M โดยระยะ G_1, S และ G_2 จะเป็นช่วงของอินเตอร์เฟส (interphase) ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่มีการแบ่งตัวของเซลล์ แต่จะเป็นช่วงที่มีการเตรียมความพร้อมเพื่อเข้าสู่ระยะของการแบ่งตัวของเซลล์คือ ระยะ M (M phase) จุดควบคุมการเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ นั้นเราเรียกว่า restriction point เป็นการตรวจสอบเซลล์ให้พร้อมก่อนการแบ่งตัวของเซลล์ และระยะย่อย G_1, S, G_2 และ M ของวัฏจักรเซลล์ ก็จะมีการตรวจสอบเช่นกันเราเรียกนี้ว่าว่าบริเวณเหล่า cell cycle checkpoints โดยมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมอยู่ โดยในระยะ G_1 checkpoint นั้นถูกควบคุมด้วยโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีน tumor suppressor ทำหน้าที่ในการยับยั้งเซลล์ที่ผิดปกติเข้าสู่ระยะ S แล้วทำให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ (cell apoptosis) (19)

ระยะอินเตอร์เฟสเป็นระยะที่ไม่มีการแบ่งตัวของเซลล์ แบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย (G_1, S และ G_2) ในระยะ G_1 (Gap1) เป็นระยะที่เซลล์เตรียมตัวก่อนที่จะมีการสร้างดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนหรือสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ และจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ให้พร้อม หลังจากที่การแบ่งเซลล์เสร็จเรียบร้อยแล้วและยังไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นจุดที่สำคัญที่สุดของวัฏจักรเซลล์ เนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นของการเตรียมพร้อมเพื่อการแบ่งเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่ต้องการที่จะแบ่งตัวนั้น เซลล์จะต้องมีความพร้อมที่จะแบ่งตัว ไม่มีความผิดปกติภายในเซลล์ โดยเซลล์จะมีการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่ควบคุมการทำงานที่สำคัญ เช่น มีการสร้าง cyclin D มากขึ้น โปรตีน cyclin D นี้จะรวมกับเอนไซม์ cyclin-dependent kinase (CDK4 และ 6) เป็น cyclin D/CDK4-CDK6 แล้วถูกกระตุ้นให้ทำงานด้วยเอนไซม์ CDK activating enzyme (CDK= cyclin H/CDK7) โดยการเติมฟอสเฟตแก่ cyclin D/CDK4/CDK6 แล้ว cyclin D/CDK4/CDK6 ทำงานเติมโดยเติมหมู่ฟอสเฟตแก่โปรตีน retinoblastoma (Rb) ซึ่งปกติจะมีหมู่ฟอสเฟตจำนวนน้อย (hypophosphorylation) และอยู่รวมกับโปรตีน E2F ทำให้โปรตีน E2F

ไม่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนได้ แต่เมื่อโปรตีน Rb ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจำนวน มากขึ้น (hyper-phosphorylatation) (18) โปรตีน Rb ก็จะหลุดออกจากโปรตีน E2F ทำให้โปรตีน E2F เป็นอิสระและสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนอื่นๆที่จำเป็นในวัฏจักรเซลล์ จากนั้นโปรตีน cyclin E ซึ่งถูกสังเคราะห์มากขึ้น จะเข้าไปรวมกับเอนไซม์ CDK2 เป็น cyclin E/CDK2 ซึ่งสามารถย้อนกลับไปเพิ่มการทำงาน (positive feedback) ของกระบวนการโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่โปรตีน Rb ขณะเดียวกันก็จะมีการสร้างโปรตีน cyclin A ขึ้นมาซึ่งจะมารวมกับเอนไซม์ CDK2 เป็น cyclin A/CDK2 ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน E2F ทำให้วัฏจักรเซลล์ผ่านช่วง restriction point (R) ในช่วงท้ายของระยะ G_1 โดยที่จุด restriction point เมื่อผ่านแล้วก็จะดำเนินต่อไปเข้าสู่ระยะ S โดยไม่หยุดหรือย้อนกลับ แม้จะไม่มีการกระตุ้นจากสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ หรือไมโตเจน (mitogen) ในเซลล์บางชนิดที่ไม่มีการแบ่งตัวต่อไป เช่นเซลล์ประสาทจะเข้าสู่ระยะพักที่เรียกว่า ระยะ G_0 ซึ่งไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การควบคุมวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_1 นอกจากเซลล์จะสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้มีการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์แล้ว เซลล์ยังควบคุมการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์โดยการสร้างโปรตีนที่สามารถยับยั้งวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G_1 ได้แก่โปรตีนในกลุ่มของโปรตีน inhibitor of CDK4/alternative reading frame family หรือ (INK4a/ARF family) ได้แก่โปรตีน P15, P16, P18 และ P19 ซึ่งสามารถที่จะยับยั้งการทำงานของ cyclin D/CDK4/CDK6 และโปรตีนอีกกลุ่มที่เรียกว่า cip/kip family ที่จะยับยั้งการทำงานของทั้ง cyclin D/CDK4/CDK6, cyclin E/CDK4/CDK6 และ cyclin A/CDK2 ได้แก่โปรตีน p21, p27 และ p57 โปรตีนเหล่านี้จะควบคุมให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินไปอย่างปกติ หากโปรตีนเหล่านี้ทำงานไม่สมบูรณ์จะทำให้มีการแบ่งเซลล์ที่ควบคุมไม่ได้ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดเซลล์มะเร็ง

ระยะ S (synthesis) เมื่อเซลล์มีการส่งสัญญาณที่จะแบ่งตัว จะเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มจำนวนขึ้นและมีการเตรียมสารชีวโมเลกุลที่จำเป็นต่างๆ ไว้ ระยะนี้ปริมาณของดีเอ็นเอ จะเพิ่มเป็น 2 เท่าจากปกติ ซึ่งมี cyclin A/CDK2 เป็นตัวควบคุมที่สำคัญ การดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์จะเข้าสู่ระยะต่อไป เมื่อมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ถูกต้อง หากมีความผิดพลาดในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอถูกทำลาย จะกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน p53 ซึ่งจะไปกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีน p21 ทำให้กระบวนการในวัฏจักรเซลล์หยุดชั่วคราว เพื่อให้เซลล์มีเวลาซ่อมแซมดีเอ็นเอ แต่หากดีเอ็นเอมีความผิดพลาดมากหรือถูกทำลายจนซ่อมแซมไม่ได้ โปรตีน p53 ก็จะชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโตซีส (apoptosis) โดย p53 จะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) แล้วไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน p21 ในเซลล์ที่เกิดเป็นมะเร็งมักจะพบว่า p53 เกิดการกลายพันธุ์แล้วไม่สามารถที่จะควบคุมวัฏจักรเซลล์ จึงทำให้เซลล์ที่ผิดปกติเกิดการเจริญเติบโตอย่างไม่สามารถควบคุมได้และเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากโปรตีน p53 แล้วเราจะพบว่าโปรตีน Rb เป็นโปรตีนอีกหนึ่งชนิดที่ทำหน้าที่ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ การพัฒนาการของเซลล์ (cell differentiation) และ การตายของเซลล์แบบอะพอพโตซีส โดยโปรตีน Rb เป็น phosphoprotein ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 928 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ E2F (transcription factor) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นในระยะ S ทำหน้าที่กระตุ้นและควบคุมวัฏจักรเซลล์ ดังนั้น Rb จึงช่วยควบคุมวัฏจักรเซลล์ ทำหน้าที่เป็นโปรตีนยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor) คือเมื่อเซลล์เกิดความผิดปกตินั้น E2F ที่จับอยู่โดยปกติกับ Rb ที่ไม่ได้ phosphorylate จะไม่สามารถทำงานได้ โดยไม่สามารถจับได้กับยีนโปรโมเตอร์ (promoter gene) และกระตุ้นการเกิดถอดรหัส (transcription) เมื่อเซลล์ที่ต้องการเข้าสู่ระยะ S จะพบว่า Rb จะถูกเติมฟอสเฟต แล้ว E2F ก็หลุดออกจาก Rb แล้วเข้าไปจับได้กับโปรโมเตอร์ของยีน และกระตุ้นการเกิดการถอดรหัส

ของยีน กรณีใดก็ตามที่ Rb เกิดการกลายพันธุ์จะทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดทำให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML เราจะพบว่าเซลล์ตัวอ่อน (blast cell) ที่พบใน CML มักเกี่ยวข้องกับการเกิดกลายพันธุ์ของ p53 tumor suppressor นอกจากโปรตีน p53 และ Rb ที่เกี่ยวข้องกับการเป็น tumor suppressor (20) ยังพบว่ามีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor คือ โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (Wilms' tumor 1 หรือ WT1) ซึ่งถูกกำหนดการสร้างมาจากยีน *WT1* โดยลักษณะของโปรตีนจะเป็นแบบ zinc finger motif ในส่วนของโปรตีน WT1 พบว่ามีความสำคัญมากในการควบคุมการเกิดมะเร็ง เมื่อมีความผิดปกติของเซลล์เนื่องจากยีนที่ผิดปกติไป พบว่าโปรตีน WT1 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมไม่ให้เซลล์ที่มีความผิดปกติแสดงออกซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ tumor suppressor และยีน *WT1* มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค Wilms' tumor ในเด็ก มีชื่อเรียกว่า childhood kidney tumor การแสดงออกของยีน *WT1* พบว่ามีลักษณะของการแสดงออกที่เฉพาะที่มากกว่าโปรตีน p53 และ Rb ซึ่งโปรตีน WT1 มีการแสดงออกเฉพาะบางที่ เช่น พบใน gonads, uterus, kidney และ mesothelium เป็นต้น นอกจากโปรตีน WT1 จะทำหน้าที่เป็น tumor suppressor แล้วในระยะหลังยังพบว่าโปรตีน WT1 มีบทบาทเป็นออโคยีน (oncogene) และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว และเป็น tumor marker ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว อีกด้วย ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ามีการแสดงออกของ *WT1* ประมาณ 1,000-10,000 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวในไขกระดูก และในกระแสเลือดปกติ

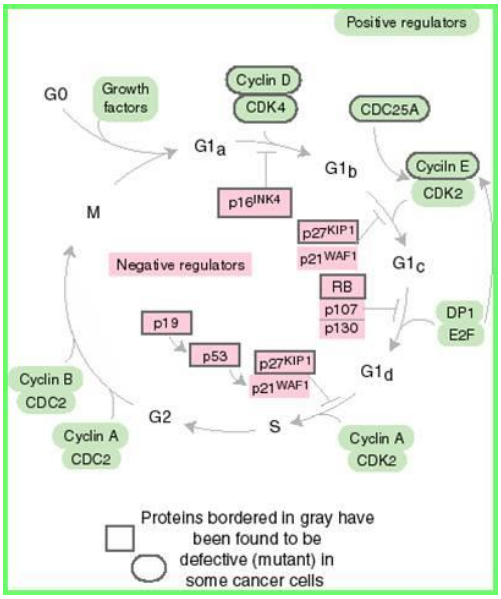
ระยะ G_2 เป็นระยะภายหลังจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) มีการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวของเซลล์ รวมทั้งโปรตีนที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ในระยะถัดไปเพื่อให้เซลล์พร้อมในการแบ่งตัวของเซลล์ โดยมีการทำงานของโปรตีน cyclin A/CDK4/CDK6 ในระยะนี้เป็นระยะที่นานที่สุด สำหรับวัฏจักรเซลล์ โครมาตินจะมีลักษณะติดสีจาง (heterochromatin)

ในระยะ M เป็นช่วงระยะเวลาสั้นๆ ที่เซลล์มีการแบ่งตัว (mitosis) ระยะนี้โครโมโซมจะcondense มากและไม่มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (เนื่องจากโครมาติน condense มากทำให้ RNA polymerase เข้าทำงานไม่ได้) ระยะเวลาในแต่ละระยะ จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง (cell line) พบว่า ระยะ G_1, S, G_2 และ M ใช้เวลา 5, 7, 3 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6

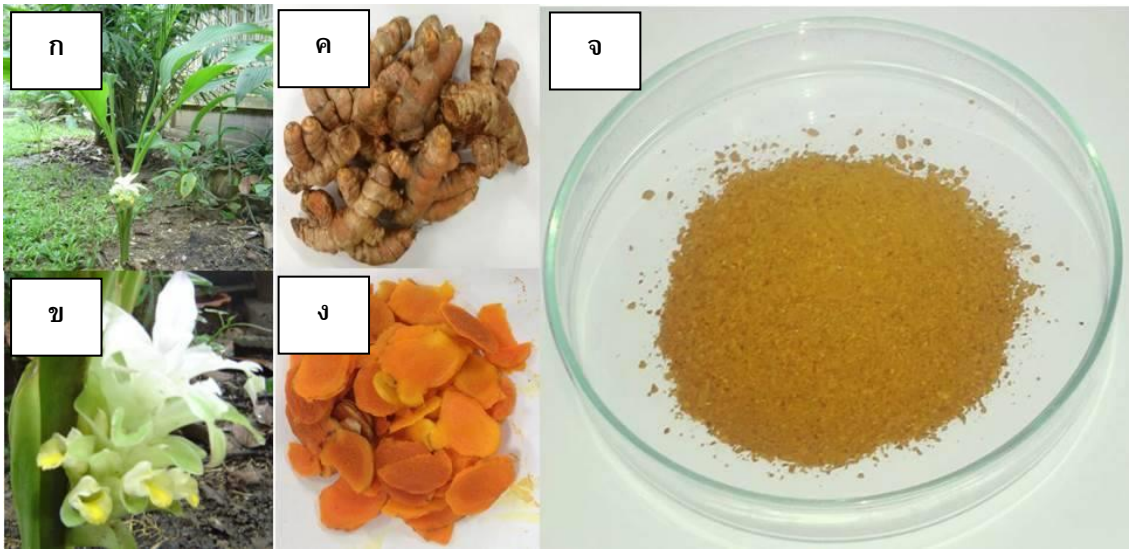
เคอร์คิวมิน (Curcumin)

เคอร์คิวมินเป็นสารประกอบหลักที่พบในเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งเป็นพืชที่ในตระกูล Zingiberacae เป็นพืชท้องถิ่น ปลูกง่าย สามารถพบได้ทั่วไปในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (21) ดังแสดงในรูปที่ 7

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าขมิ้นชันมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งประกอบไปด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์หลักคือ เคอร์คิวมิน (curcumin I) (รูปที่ 8ก) รอง ลงมาคือดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน (demethoxycurcumin หรือ curcumin II) (รูปที่ 8ข) และบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน (bisdemethoxycurcumin หรือ curcumin III) (รูปที่ 8ค) ตามลำดับ (22) โดยเคอร์คิวมินจะมีปริมาณมากที่สุดในเคอร์คิวมินอยด์รวมและพบว่าผงขมิ้นที่ได้จากการบดเหง้าของขมิ้นชันจะมีเคอร์คิวมินอยด์อยู่ประมาณร้อยละ 2-5 เป็นสารสีเหลือง เคอร์คิวมินมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (23, 24) ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย(25) แก้ปวด ยับยั้งการอักเสบ (26, 27) ช่วยสมานแผล (28) และยังสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (29, 30) จากการศึกษาทางด้าน



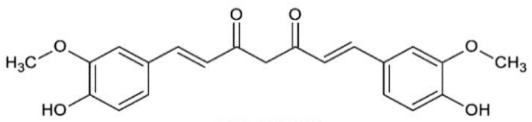
รูปที่ 6 วัฏจักรเซลล์และการควบคุมวัฏจักรเซลล์โดยโปรตีนในกลุ่ม cyclin, CDK และ tumor suppressor[31]



รูปที่ 7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขมิ้นชัน (ก) เป็นไม้ล้มลุก สูงประมาณ 30-90 เซนติเมตร ใบเดี่ยว มีสีเขียว แทงออกมาจากเหง้าเรียงเป็นวงซ้อนทับกันรูปใบหอก กว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร (ข) ดอกเป็นช่อ แทงออกมาจากเหง้า แทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบ รูปทรงกระบอก กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีนวล บานครั้งละ 3-4 ดอก (ค) ส่วนของเหง้าของขมิ้นชันจะอยู่ใต้ดิน รูปทรงไข่และมีแขนงรูปทรงกระบอกแตกออกด้านข้าง 2 ด้าน (ง) ซึ่งเนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ และ (จ) แสดงภาพของผงของขมิ้นชันภายหลังการอบแห้งและนำไปบด (ภาพถ่ายโดย ทรงยศ อนุชปรีดาและสิงห์คำ ธิมา)

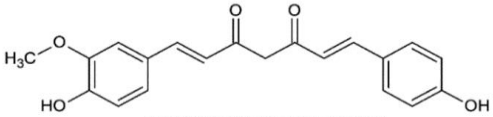
เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ในหนูทดลองพบว่าเคอร์คิวมินที่ให้โดยผ่านทางการรับประทานนั้น มีการดูดซึมผ่านลำไส้ได้น้อย โดยมีประมาณ ร้อยละ 75 ของเคอร์คิวมินที่รับประทานจะถูกขับออกมาทางอุจจาระและทางปัสสาวะอีกเล็กน้อย (32) เมื่อฉีดเคอร์คิวมินเข้าทางช่องท้องของหนูก็ยังคงให้ผลเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีเคอร์คิวมินอยู่ในน้ำดีประมาณร้อยละ 11 (33) แสดงให้เห็นว่าร่างกายมีการดูดซึมเคอร์คิวมินเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเมแทบอไลต์ เช่น ไดไฮโดรเคอร์คิวมิน (dihydrocurcumin) และเตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน (tetrahydrocurcumin) (รูปที่ 8ง) โดยผลิตภัณฑ์เมแทบอไลต์ที่ได้จะเข้าจับกับโมโนกลูเคอโรไนด์ (monoglucuronide) (33, 34)

ก



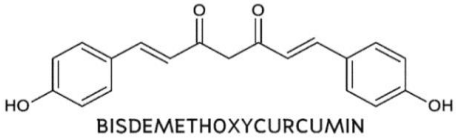
CURCUMIN

ข



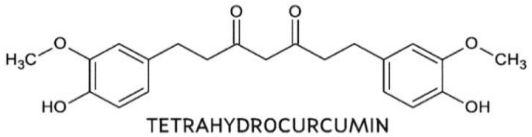
DEMETHOXYCURCUMIN

ค



BISDEMETHOXYCURCUMIN

ง



TETRAHYDROCURCUMIN

รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของสารเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งประกอบไปด้วย (ก) เคอร์คิวมิน (ข) ดีเมททอกซี่เคอร์-คิวมิน (ค) บิสดีเมททอกซี่เคอร์คิวมิน และ (ง) เมแทบอไลต์ของเคอร์คิวมินชนิดเตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน (ภาพโดย ปวเรศ ปัญญาใจ)

จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) พบว่าสารเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งกลไกการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ได้ 3 ระยะด้วยกัน ได้แก่ กระบวนการส่งเสริมเกิดมะเร็ง (tumor promotion) กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (tumor growth) โดยเคอร์คิวมินจะเข้าไปยับยั้งการเจริญ เติบโตที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไมโตเจนของโมโนนิวเคลียเซลล์ (mitogen-induced proliferation of mononuclear cells) ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่เกิดจากการกระตุ้นของ platelet derived growth factor (PDGF) ในกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) อีกด้วย (35) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส (protein kinases) (36, 37) และที่สำคัญมีการใช้ขมิ้นชันหรือเคอร์คิวมินในชีวิตประจำวัน เช่น การรับประทาน หรือใช้เป็นสมุนไพรรักษามาเป็นเวลาช้านาน โดยอยู่ในส่วนผสมของตำรับยาแผนโบราณเป็นส่วนใหญ่ และยังไม่พบผลข้างเคียงหรือความเป็นพิษใดๆ ต่อผู้ที่ได้รับ (38)

จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อโปรตีนเป้าหมายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งโปรตีน WT1 และ FLT3 โดยเฉพาะโปรตีน WT1 นั้น Anuchapreeda และคณะ พบว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการแสดงออกของ WT1 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (39) รวมถึงในเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoid leukemia (ALL) และ chronic myeloid leukemia (CML) ได้อีกด้วย (40) และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ ได้แก่ U937, Molt4 และ HL-60 พบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของยีน *WT1* ได้เช่นกัน (41) เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คิวมินในเซลล์มะเร็งสายพันธุ์เม็ดเลือดขาวชนิด K562 พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 โดยผ่านโปรตีนไคเนส ซี แอลฟา (protein kinase C alpha หรือ PKCα) (42) และเมื่อทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อโปรตีน FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน FLT3 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด EoL-1 ได้เช่นเดียวกัน และส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเหนี่ยวนำให้วัฏจักรของเซลล์ชะลอตัว (cell cycle arrest) อยู่ที่ระยะ G_0/G_1 (43)

วิธีการทดลอง (Methods)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (chronic myelocytic leukemia) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (GIBCO-BRL) ที่ประกอบด้วย penicillin ความเข้มข้น 100 units/ ml streptomycin ความเข้มข้น 100 µg/ml L-glutamine ความเข้มข้น 1 mM และ fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ pH 7.2-7.4 ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37°C และมีความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 80

2. การเตรียมเซลล์

เก็บเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS ที่ความเร็ว 200 × g เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาณเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 1.0×10^6 cells/ ml/ plate ปริมาตร 10 ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ในจานเลี้ยงเซลล์ และนำไปบ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยวิธี MTT

นำเซลล์ K562 มาปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาณเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 1.0×10^4 cells/ 100 µl / well ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ complete RPMI-1640 ใน 96-well tissue culture plate และนำไปบ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารสกัดเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นละ 3 หลุม (3 ซ้ำ) ปริมาตรหลุมละ 100 µl เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ลงไปเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (vehicle control) หลุมละ 100 µl แล้วบ่มเซลล์และสารสกัดในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงต่อ เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดแล้ว นำเซลล์ที่บ่มไว้มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกปริมาตรหลุมละ 100 µl และเติมสารละลาย MTT หลุมละ 15 µl แล้วนำไปบ่มต่อในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงคว่ำ plate เพื่อกำจัดของเหลวออกให้หมด เหลือแต่เฉพาะผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่ก้นหลุม แล้วจึงเติม DMSO หลุมละ 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน สุดท้ายนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 578 nm โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm เป็นตัวอ้างอิง คำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับหลุมที่เป็นชุดควบคุมที่มีการเติม DMSO โดยกำหนดให้หลุมที่เป็นชุดควบคุมมีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) เท่ากับ 100 ดังสมการที่แสดงด้าน ล่าง

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{(ค่าเฉลี่ยของ OD จากหลุมทดสอบ)} \times 100}{\text{(ค่าเฉลี่ยของ OD จากหลุมควบคุม)}}$$

ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยวิธี MTT ทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากนั้นจึงนำค่าที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง มาเขียนเป็นกราฟเฉลี่ยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับร้อยละการมีชีวิตรอดของ

เซลล์ และหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (Inhibitory concentration at 50% growth หรือ IC_{50}) เปรียบ เทียบฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งของสารสกัดบริสุทธิ์เคอร์คิวมินอยด์และเตตระไฮโดร-เคอร์คิวมิน ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด และค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด (Inhibitory concentration at 20% growth หรือ IC_{20}) เพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ต่อไป

4. การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยวิธี Western blot

4.1 การเตรียมเซลล์

นำเซลล์ K562 มาปรับปริมาณเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1.0 x 10^5 cells/ ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete RPMI-1640 ที่มีสารสกัดบริสุทธิ์เคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดและเตตระไฮโดรเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{20} บ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4.2 การเตรียมโปรตีน

เก็บเซลล์แล้วปั่นล้างด้วย PBS ที่เย็น 3 ครั้ง นำเซลล์ไปสกัดโปรตีนรวมโดยใช้น้ำยา RIPA buffer ผสมให้เข้ากันกับเซลล์และบ่มไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยปั่นผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทุก 10 นาที เมื่อครบเวลา นำตัวอย่างไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 × g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นโปรตีนรวม นำเอาส่วนใสไปวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Folin-Lowry เทียบกับโปรตีน BSA มาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างที่สกัดได้

4.3 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Folin-Lowry

ทำการวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Folin-Lowry เพื่อคำนวณหาปริมาณของโปรตีนที่จะนำไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ cyclin B และ cdc2 ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

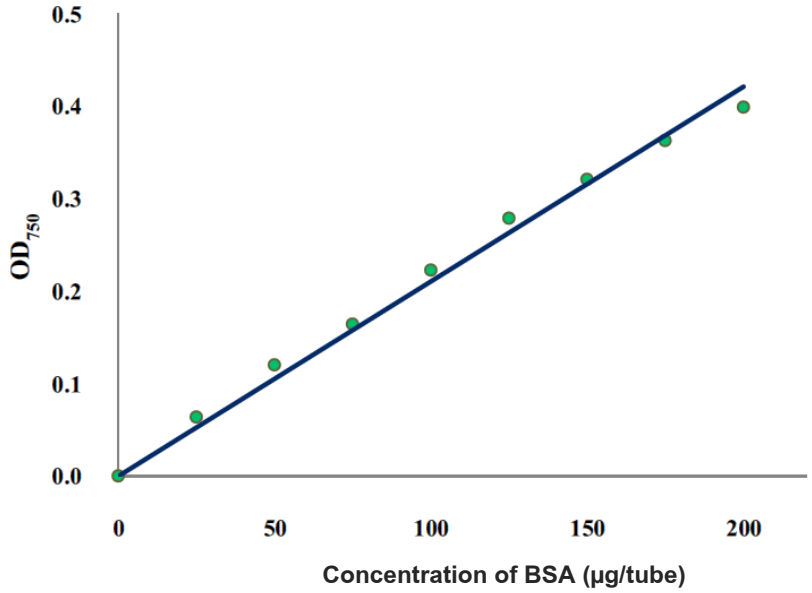
วิธีการทดลอง

เตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA (1 mg/ml) เพื่อใช้เป็น stock solution จากนั้นเตรียมสารละลายโปรตีนจาก stock solution ให้มีความเข้มข้นเริ่มตั้งแต่ 25 µg/ml จนถึงความเข้มข้น 200 µg/ml ดังตารางที่ 1

เตรียมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 µl ลงในน้ำปลอดอิออน ปริมาตร 480 µl ในหลอด 13 mm × 100 mm จากนั้นเติม alkaline copper solution (Reagent C) ปริมาณ 2.5 ml ลงในทุกหลอด ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ครบเวลาเติม Folinciocalteu phenol reagent ปริมาณ 250 µl ลงในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน โดยความเข้มสีของสารละลายจะแปรผันตรงกับปริมาณโปรตีน ครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการหาปริมาณโปรตีนโดยคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 9

ตารางที่ 1 ปริมาณสารในการเตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/ml)	ปริมาณสารละลายโปรตีน จาก stock solution (ml)	ปริมาณ ddH_2O (ml)
0	-	0.500
25	0.025	0.475
50	0.050	0.450
75	0.075	0.425
100	0.100	0.400
125	0.125	0.375
150	0.150	0.350
175	0.175	0.325
200	0.200	0.300



รูปที่ 9 กราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน

4.4 การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยเทคนิค Sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blot

แยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ที่มี polyacrylamide gel ความเข้มข้นร้อยละ 12 แยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ แล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงมาสู่แผ่น PVDF ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 30 โวลท์ ข้ามคืน

นำแผ่น PVDF มาตรวจหาโปรตีน WT1 โดยเทียบกับโปรตีน GAPDH ซึ่งทำหน้าที่เป็น internal control เติม skim milk (blocking buffer) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงบนแผ่น PVDF เพื่อกำจัด non-specific binding site เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติมแอนติบอดีต่อโปรตีน WT1 และ GAPDH เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วล้างด้วย PBS ที่มี tween ร้อยละ 0.1 (washing buffer) 6 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมแอนติบอดีชนิดที่สองที่เชื่อมต่อกับเอ็นไซม์ Horse radish peroxidase (HRP) ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีชนิดแรก เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่น PVDF ด้วย washing buffer 6 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น PVDF มาทำการตรวจสอบโดยวิธี enhanced chemiluminescense (ECL) โดยใช้ Luminata™ Forte Western HRP substrate (Merk Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) การเปล่งแสงของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นโดยใช้ฟิล์ม X-ray และนำผลที่ได้ไปหาความเข้มข้นของแถบโปรตีนได้ด้วยโปรแกรม Quantity One

ศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่า arbitrary unit ที่สามารถวัดได้จากโปรแกรม Quantity One และและทำการวิเคราะห์สถิติจากผลการทดลองโดยวิธี One-way ANOVA

5. การศึกษาผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA ต่อการยับยั้ง WT1 protein-DNA binding และ AP1-DNA binding โดยวิธี ChIP assay

Chromatin immunoprecipitation หรือ ChIP เป็นการศึกษาโดยใช้หลักการ immunoprecipitation เพื่อวิเคราะห์การจับกันของโปรตีน (transcription factor) ที่สนใจ กับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่เราสนใจที่จะศึกษา การทดลองทำโดยเตรียมเซลล์ที่ทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน และ Tanshinone IIA ความเข้มข้น 15 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการ fix ด้วย 37% formaldehyde (final concentration เท่ากับ 0.37%) เป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เกิด crosslink ระหว่าง histone กับ DNA เมื่อเกิด crosslink เรียบร้อยแล้วให้หยุดปฏิกิริยาโดย 1.25 M glycine (final concentration เท่ากับ 0.125 M) แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS ที่เย็น นำเซลล์มา resuspend ใน cell lysis buffer (5 mM PIPE, 85 mM KCl, 1% NP40, and protease inhibitors) แล้วทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จะได้ nuclei pellet ออกมา หลังจากนั้น resuspend ใน nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS และ protease inhibitors) แล้วบ่มไว้ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที นำ nuclei solution ไป sonicate แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเก็บ cell supernatant แล้วเติม 25 μl Strep A cells แล้วบ่มไว้บน rotating platform เป็นเวลา 15 นาที เพื่อ preclear chromatin เมื่อครบเวลาแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นทำ immuneprecipitation โดยเติม immunoprecipitation buffer ที่มี protease inhibitors ใน preclear chromatin solution และเติม anti-WT1 (C-19) (Santa Cruz, CA, USA) หรือ anti-c-Jun (ACTIVE MOTIF®, USA) antibody เติม IgG และ RNA polymerase II สำหรับเป็น negative และ positive control ตามลำดับ นำ precleared chromatin lysate ไป rotate บน platform ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน (overnight) เติม Strep A cells (25 μl) ที่เตรียมไว้เติมลงไปใน immunoprecipitated antibody/protein/ DNA complex แล้ว rotate บน platform เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อ precipitate ให้เกิด immunoprecipiated complexes ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา

4 นาที เพื่อเก็บ immunoprecipiated complex pellets หลังจากนั้นล้าง pellets 2 ครั้ง ด้วย dialysis buffer และ 4 ครั้งด้วย immuneprecipitation buffer นำ immunoprecipiated complexes ไป elute ด้วย elution buffer (50 mM $NaHCO_3$, 1% SDS) หลังจากนั้นเติม 5 M NaCl และบ่มไว้ที่ 65°C เป็นระยะเวลาข้ามคืน เพื่อ reverse formaldehyde cross linking และเติม RNase A (final concentration เท่ากับ 100 µg/ml) แล้วบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที นำ DNAs ที่ purified โดยใช้ Qiaquick PCR kit (Qiagen, CA, USA) แล้วทำการวิเคราะห์โดย PCR

Primer design สำหรับ PCR

Sequence ของ human WT1 promoter region ถูกอ้างอิงมาจาก GenBank™ (accession No. U77682) โดยใช้ Primer design programs ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ Primer3 Input (version 0.4.0), UCSC Genomic Bioinformatic and Vector NTI advance 10 โดย primers ของ WT1 promoter จะถูกออกแบบสำหรับวิเคราะห์ในจำนวน 500 bp ลำดับของ WT1 promoter primer No.1 ประกอบด้วยส่วนของ forward primer (CTGAACGGACTCTCCAGTG) และ reverse primer (CGCTGCCTTGAACTCCTTAC) ส่วน WT1 promoter primer sequence No.2 ประกอบด้วย forward primer (GGCCCCTCTTATTTGAGCTT) reverse primer (CAAGAGGAA GTCCAGGATCG)

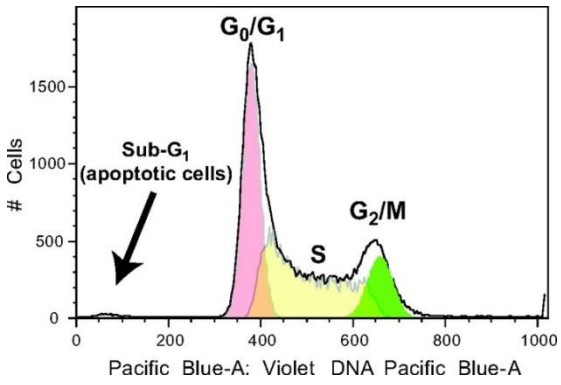
6. การศึกษาผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อการทำงานของ WT1 promoter

WT1 promoter construction vectors สำหรับ Luciferase ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Takashi Murate (Department of Medical Technology, Nagoya University Graduate School of Heath Sciences, Japan) โดย construct vector ประกอบด้วย 1.8 kb-fragment ของ 5' region ของ exon 1 ของยีน *WT1* promoter ซึ่งมี WT1 binding site อยู่ด้วย การทดลองนี้ใช้ construct vectors ที่เป็น -301 bp จาก TSS ของ exon 1 ของ WT1 promoter ที่แทรกใน pGL3 basic vector และใช้ pGL3 basic vector และ β-galactosidase vectors เป็น vector control และ internal control ตามลำดับ นำเซลล์ K562 มา co-transfected ด้วย construct vector และ β-galactosidase เป็นระเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว treat ด้วย เคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และSP600125 ที่ความเข้มข้น 15 µM หลังจากนั้นทำการแตกเซลล์ด้วย lysis buffer แล้วศึกษา Luciferase activity โดยใช้ Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega, USA) ด้วยเครื่อง GloMax 96 Microplate Luminometer with dual injections (Promega, USA)และวิเคราะห์ปริมาณของ β-galactosidase โดยใช้ β-galactosidase Assay Kit (Promega, USA)

7. การศึกษาผลของสารเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผ่านวัฏจักรเซลล์ด้วยวิธีโฟลไซโตเมตทรี (Flow cytometry) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

การศึกษาวัฏจักรของเซลล์จะเป็นการวิเคราะห์ปริมาณ DNA content ด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry) โดยทำการย้อม DNA ด้วย Propidium Iodide (PI) ซึ่งลักษณะปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) ของ DNA จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อจำนวน DNA content ในแต่ละเซลล์ สามารถแบ่งลักษณะ

ปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซน เป็น 3 ลักษณะ แสดงผลออกมาในรูปของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ DNA content และจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ตัวอย่าง normal cell cycle distribution
(ที่มา: http://ajpcell.physiology.org/content/304/10/C927)

7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ในอาหารที่มีสารเคอร์คิวมิน หรือ SP600125 หรือ Tanshinone IIA

เพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับร้อยละ 80 (80% cell confluence) จากนั้นเพิ่มปริมาณ (expand) เซลล์เพื่อเตรียมเซลล์ให้หยุดอยู่ที่ระยะ G_0 โดยปั่นล้างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 หรือ Molt4 ด้วย PBS ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง ปรับปริมาณเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 3.2×10^6 cells/ 8 ml ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี FBS ร้อยละ 0.5 ทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม CO_2 ที่มี CO_2 ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาทำการปั่นล้างเซลล์เช่นเดิม แล้วปรับปริมาณเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 8.0×10^5 cells/ 8 ml/ plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี FBS ร้อยละ 10 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปริมาณแล้วในอาหารที่เติมสารเคอร์คิวมินหรือ SP600125 หรือ Tanshinone IIA ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3 ระดับ ได้แก่ 2.5, 5 และ 10 μM ในเซลล์ K562 และ 5, 10 และ 15 μM ในเซลล์ Molt4 ซึ่งใช้ไม่เกินค่า IC_{20} เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งทำการเติม DMSO ในปริมาตรที่เทียบเท่ากับร้อยละของสารเคอร์คิวมินหรือ SP600125 หรือ Tanshinone IIA ที่เติมในกลุ่มทดสอบ โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO จะต้องน้อยกว่า 0.8% ของปริมาตรทั้งหมด เพื่อไม่ให้ DMSO เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม CO_2 ที่มี CO_2 ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาทำการเก็บเซลล์ ย้อมเซลล์และนำไปศึกษาการกระจายตัวของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ต่อไป

7.2 การย้อมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 หรือ Molt4 เพื่อศึกษาวัฏจักรเซลล์ด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry)

เมื่อทำการบ่มเซลล์กับสารเคอร์คิวมิน หรือ SP600125 หรือ Tanshinone IIA เป็นเวลาครบ 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS ที่เย็น โดยปั่นที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบ ทำการปรับปริมาณเซลล์และนับเซลล์ใน counting chamber โดยใช้ Trypan blue ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จากนั้นทำการละลาย (resuspend) pellet ด้วย PBS ที่เย็น ปริมาตร 300 µl แล้ว fixed เซลล์ด้วย absolute ethanol ที่เย็น 700 µl ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นปั่นที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้งให้หมด จากนั้นเติม PI solution ปริมาตร 500 µl นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow Cytometer รุ่น Cytomics FC 500 ยี่ห้อ Beckman Coulter และโปรแกรม FlowJo V10

8. การศึกษาผลของสารเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน cyclin B และ cdc2 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค Acrylamide gel electropgoresis และ Western blotting

8.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ในอาหารที่มีสารเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125

เพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับร้อยละ 80 (80% cell confluence) ปั่นล้างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt4 ด้วย PBS โดยปั่นที่ 1,700 rpm เป็นเวลา 5นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง ปรับปริมาณเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 1.0×10^5 cells/ ml ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี FBS ร้อยละ 10 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปริมาณแล้วในอาหารที่เติมสารเคอร์คิวมิน หรือ Tanshinone IIA หรือ SP600125 ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3 ระดับ (5, 10 และ 15 µM) ซึ่งใช้ไม่เกินค่า IC_{20} เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งทำการเติม DMSO ในปริมาตรที่เทียบเท่ากับร้อยละของสารเคอร์คิวมิน หรือ Tanshinone IIA หรือ SP600125 ที่เติมในกลุ่มทดสอบ โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO จะต้องน้อยกว่า 0.8% ของปริมาตรทั้งหมด เพื่อไม่ให้ DMSO เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม CO_2 ที่มี CO_2 ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลานำเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัดโปรตีนรวม (whole protein) และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน cyclin B และ cdc2 ต่อไป

8.2 การเตรียมโปรตีนรวมจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

เมื่อทำการบ่มเซลล์กับสารเคอร์คิวมิน หรือ Tanshinone IIA หรือ SP600125 เป็นเวลาครบ 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS ที่เย็น โดยปั่นที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการปรับปริมาณเซลล์และนับเซลล์ใน counting chamber โดยใช้ Trypan blue ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS โดยปั่นที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อีก 2 รอบ โดยรอบสุดท้ายจะปรับปริมาณด้วย PBS ปริมาตร 1 ml ผสมเซลล์ให้เข้ากันและใส่ลงไปใน microcentrifuge tube ที่สะอาด ขนาด 1.5 ml ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน นำเซลล์ไปปั่นตกด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกให้หมด เก็บเฉพาะส่วนของ cell pellet ไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปสกัดโปรตีนรวมต่อไป

8.3 การสกัดโปรตีนรวม (whole protein lysate) ด้วย RIPA buffer

นำ cell pellet ที่เก็บได้ในข้อ 4.2 มาผสมกับ RIPA buffer ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ให้ตะกอนละลายอย่างสมบูรณ์ หลังจากผสมกันแล้วให้นำส่วนผสมแช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปผสมให้เข้ากันแรงๆ ด้วยเครื่องvortex อีก ทำเช่นนี้จนครบเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้วให้นำ microcentrifuge tube ไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ใน microcentrifuge tube โดยแบ่งเก็บหลอดละ 30-35 µl ที่ -20°C เพื่อรอทำการวัดปริมาณโปรตีนและดูการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจต่อไป

8.4 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Folin-Lowry

ทำการวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Folin-Lowry ตามข้อ 5.4.3 เพื่อคำนวณหาปริมาณของโปรตีนที่จะนำไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ cyclin B และ cdc2 ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

8.5 การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยใช้เทคนิค Acrylamide gel electrophoresis และ Western blot

วิเคราะห์ตาม section ที่ 5.4.4 โดยใช้ แอนติบอดีต่อ cyclin B และ cdc2 และใช้ GAPDH เป็น internal control

9. การทำ c-Jun knockdown เพื่อศึกษาผลของ c-Jun/AP1 ต่อการแสดงออกของยีน *WT1*

นำเซลล์ K562 มาเพาะเลี้ยงใน 12-well plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำ viral infection ใน complete RPMI-1640 medium (1 ml) หลังจากนั้นเซลล์โดยประมาณ 50% confluent ในวันที่จะทำการ infection (Day 2) โดยการนำเอาอาหารเพาะเลี้ยงออกจาก well แล้วเติม polybrene (10 µg/ml) ปริมาตร 1 ml ใน media mixture ต่อ well (สำหรับ 12-well plate) หลังจากนั้นทำการ infect โดยการเติม shRNA Lentiviral Particles ใน culture medium แล้วบ่มข้ามคืน (18-20 ชั่วโมง) จากนั้นดูดอาหารที่มี lentiviral particles ออกจาก wells ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจาก infection แล้วเติมอาหารใหม่ (Fresh media) ในแต่ละ well โดยอาหารต้องไม่มี polybrene (without polybrene) ในวันที่ 4 จะพบ stable clones ที่มีการเจริญเติบโตขึ้น ให้เติม puromycin (10 µg/ml) เพื่อคัดเลือก clone ที่มี shRNA อยู่แล้วเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา for 24-48 ชั่วโมง ใน complete medium.

10. สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก และแขนงวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการของ Prof.Dr.Colleen Sweeney ที่ UC Davis, School of Medicine, Cancer center, Sacramento, USA

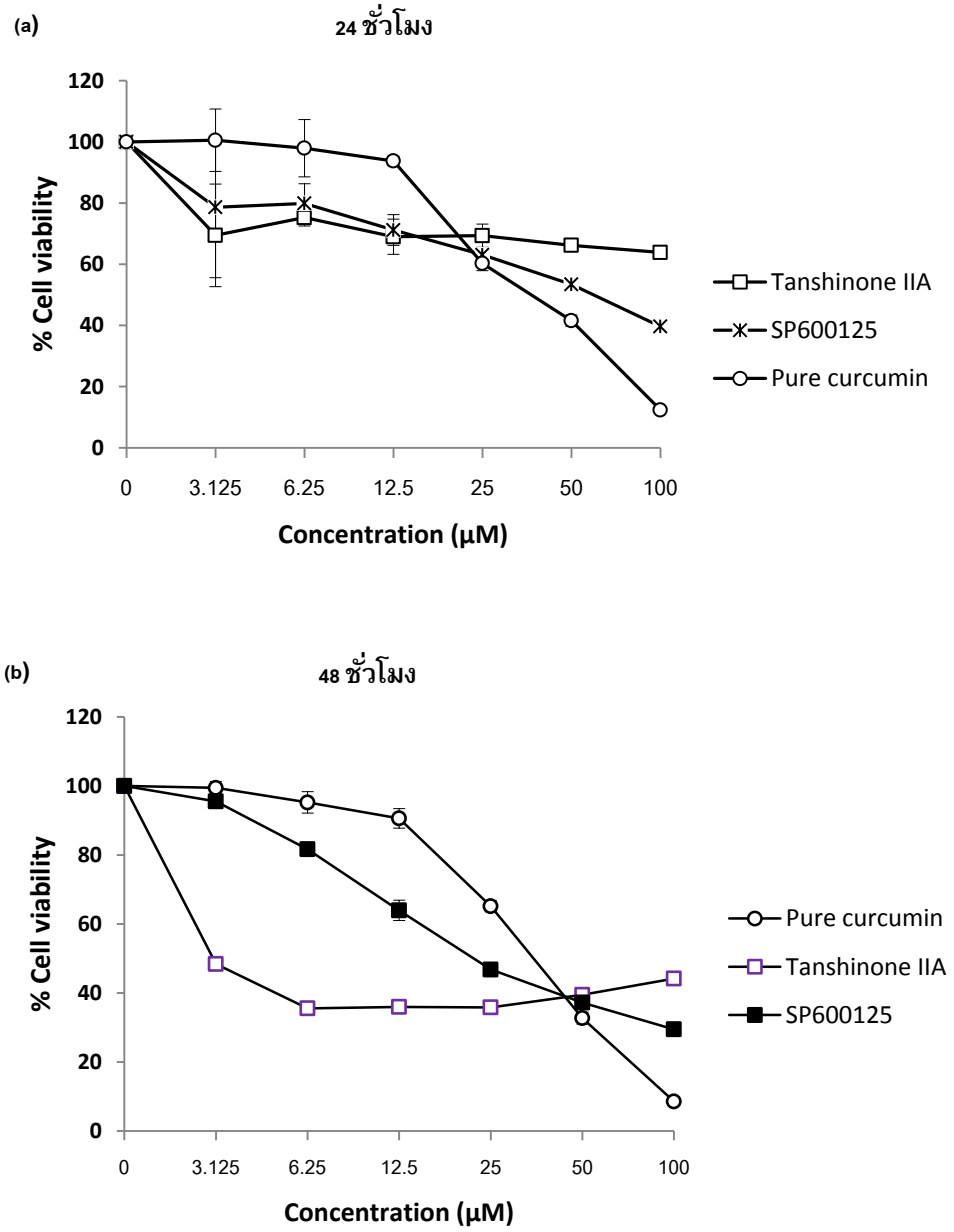
ผลการทดลอง

1. ผล cytotoxicity ของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

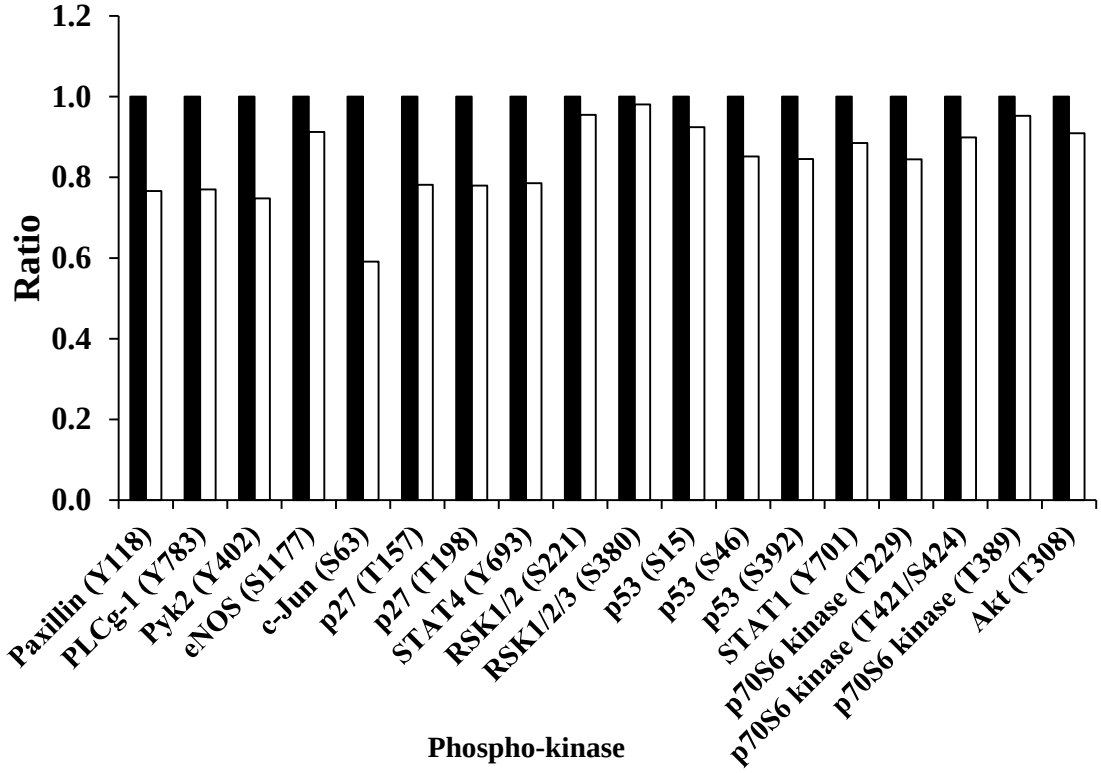
จากผลการทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ให้ผลในการทำลายเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยเมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดโดยใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory concentration at 50%) หรือ IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.5, >100 และ 62.5 µM ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.5, 3.1 และ 22.9 µM ตามลำดับ จากการพิจารณาค่า IC_{20} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *WT1* ในการทดลองถัดไป พบว่าให้ค่า IC_{20} ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 17.7, 2.1 และ 6.2 µM ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.7, 1.3 และ 7.03 µM ตามลำดับ ดังแสดงค่าในรูปที่ 11 (a) และ 11 (b) ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) ถูกคำนวณเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาผลของสารต่อการแสดงออกของยีน *WT1* และโปรตีน WT1 รวมทั้ง WT1-DNA binding ในการทดลองต่อไป

2. ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot

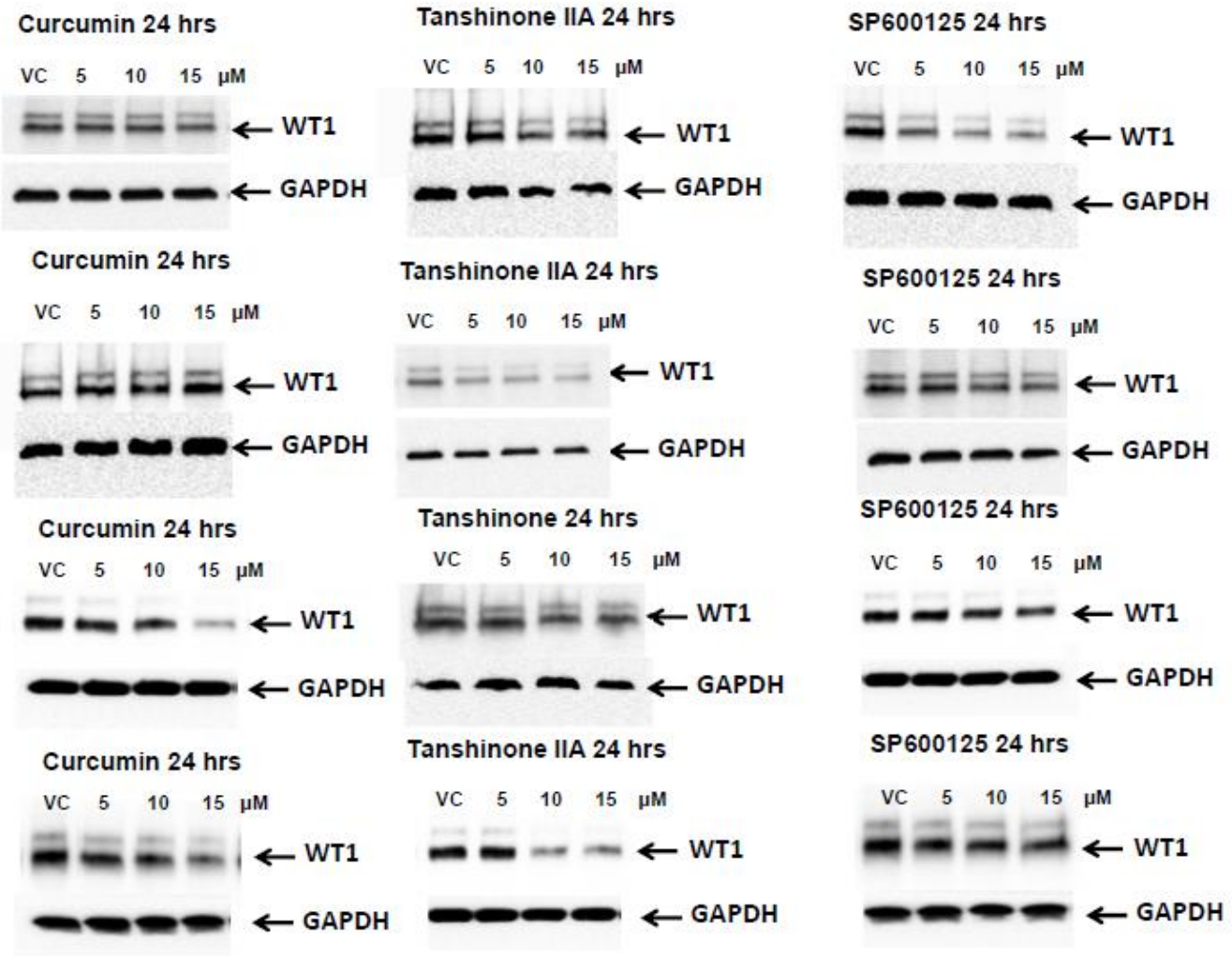
จากการศึกษาที่ผ่านมาทางกลุ่มวิจัยได้พบว่า c-Jun N-terminal Kinase (JNK) มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของโปรตีน WT1 จากการศึกษาด้วย protein microarray (รูปที่ 12) การทดลองนี้จึงได้ลองศึกษา c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) และ JNK inhibitor (SP600125) ต่อการการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งคาดว่าจะส่งผลทำให้ลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 อย่างไรก็ตามเนื่องจาก JNK สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน transcription factor ได้ทั้ง WT1 และ c-Jun (AP1) (heterodimer ของ c-Jun และ c-Fos) จึงเป็นที่น่าสนใจว่า JNK มีผลต่อ โปรตีน WT1 หรือ c-Jun ในการกระตุ้นการทำงานของยีน *WT1* กันแน่ ดังนั้นในเบื้องต้นจึงได้ทำการศึกษาโดยใช้ c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) เปรียบเทียบกับการยับยั้งด้วยเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 µM ซึ่งอ้างอิงมาจากผลการทดลองที่ 1) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบร่วมด้วย จากการศึกษาผลของการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (curcumin) เบื้องต้น พบว่าเคอร์คิวมิน มีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 เป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (5, 10 และ 15 µM) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งเท่ากับ 13.3, 22.3 และ 53.8% ส่วน Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) มีผลยับยั้ง เท่ากับ 17.4, 43.2 และ 40.1% และได้ทำการศึกษา SP600125 (JNK inhibitor) เปรียบเทียบผลการทดลองด้วย ซึ่งให้ผลในการยับยั้ง เท่ากับ 7.9, 18.9 และ 23.6% ตามลำดับ โดยทำการศึกษาทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะเวลาที่แตกต่างกัน (4 time-independent experiment) ดังแสดงในตารางที่ 2 รูปที่ 13 และ 14



รูปที่ 11 ผล cytotoxicity ของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี MTT ที่ระยะเวลา 24 (a) และ 48 (b) ชั่วโมง



รูปที่ 12 แสดงผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของโปรตีน Phospho-kinase จากการศึกษาด้วยวิธี Protein microarray

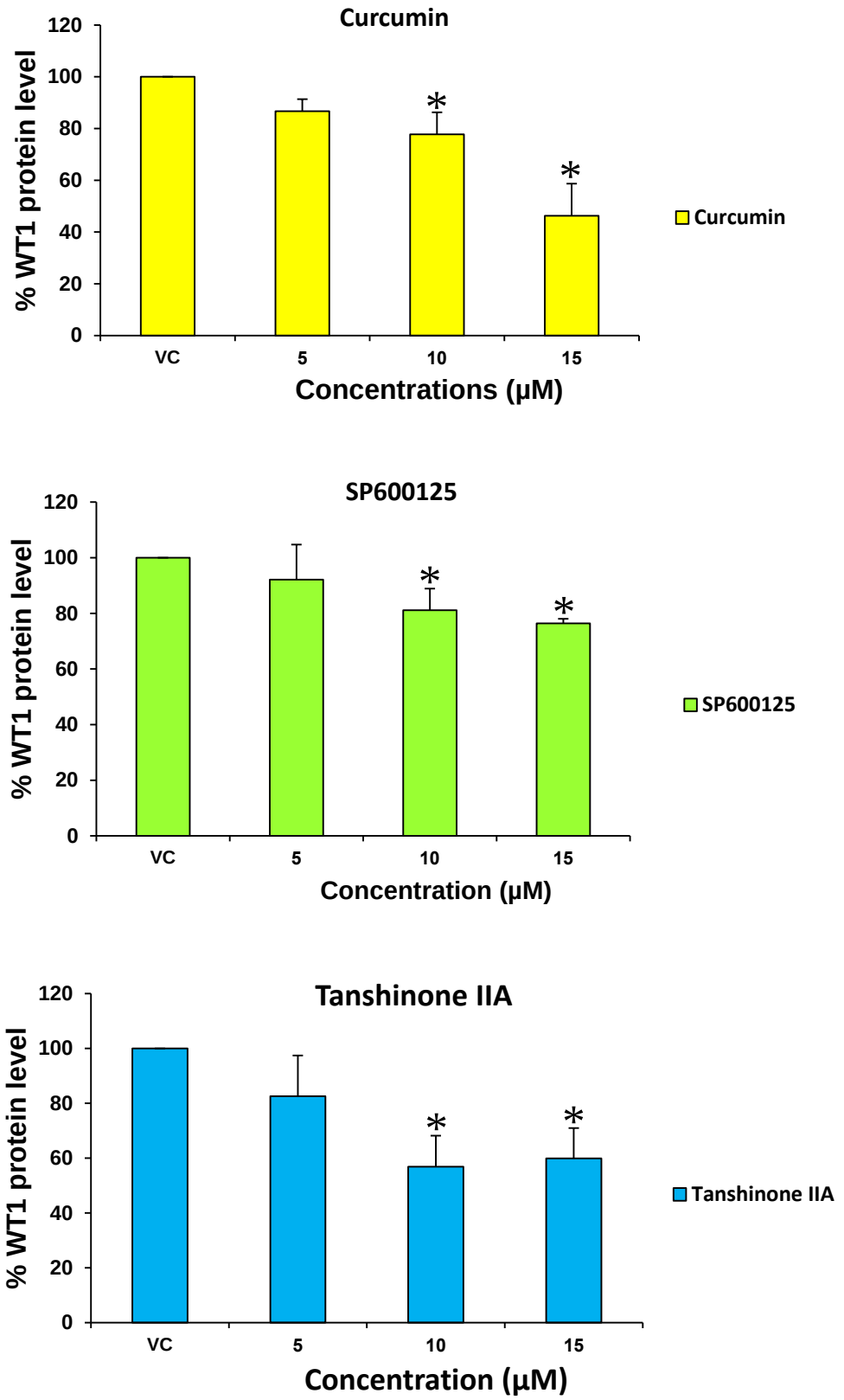


รูปที่ 13 ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อระดับโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อระดับโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot

การทดลอง		ร้อยละของระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1					
		1	2	3	4	5	Mean ± SD
Curcumin	VC	100	100	100	100	100	100 ± 0
	5	85.1	94.5	82.96	83.44	87.3	86.66 ± 4.7
	10	70.26	86.58	68.09	78.06	85.7	77.74 ± 8.52*
	15	27.92	59.41	40.1	50	53.84	46.25 ± 12.44*
SP600125	VC	100	100	100	100	100	100 ± 0
	5	99.36	99.47	77.53	ND	99.47	92.12 ± 12.64
	10	70	77.89	75.44	ND	98.41	74.44 ± 4.04*
	15	56	58.19	54.94	ND	90.17	56.38 ± 1.66*
Tanshinone IIA	VC	100	100	100	100	100	100 ± 0
	5	96.59	96.51	67.43	85.6	66.79	82.58 ± 14.82
	10	39.59	69.66	58.07	53.89	63.04	56.85 ± 11.30*
	15	43.63	73.04	64.68	62.83	55.25	59.89 ± 11.07*

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control)



รูปที่ 14 กราฟแสดงผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), SP600125 (JNK inhibitor) และ Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) ต่อระดับโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เวลา 24 ชั่วโมง * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

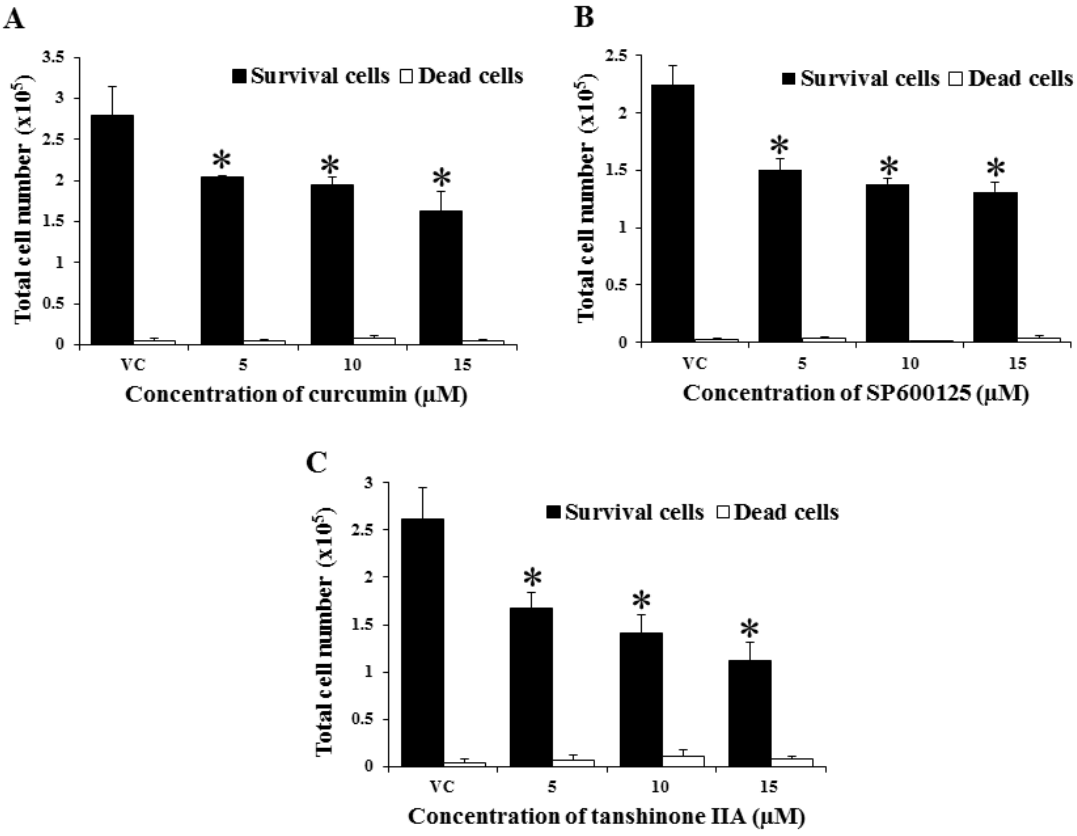
3. ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องมาจากการศึกษาในข้อ 2) โดยการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion จากผลการศึกษาพบว่าทั้ง เคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562 เป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น โดยเคอร์คิวมินสามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 27.1, 30.7 และ 42.1% Tanshinone IIA ลดได้ 35.6, 46, 57.1% ส่วน SP ลดได้ 33, 38.4, และ 41.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p<0.05) เมื่อพิจารณาผลของ เคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อปริมาณเซลล์ตาย (dead cells) พบว่ามีปริมาณที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 3 รูปที่ 15

ตารางที่ 3 ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562

การทดลอง		Viable cells		Dead cells	
		Mean ($\times 10^5$)	SD ($\times 10^5$)	Mean ($\times 10^5$)	SD ($\times 10^5$)
Curcumin	VC	2.8	0.35	0.044	0.035
	5	2.04*	0.014	0.044	0.025
	10	1.94*	0.1	0.078	0.025
	15	1.62*	0.25	0.044	0.025
Tanshinone IIA	VC	2.61	0.34	0.044	0.035
	5	1.68*	0.16	0.072	0.042
	10	1.41*	0.19	0.1	0.073
	15	1.12*	0.19	0.083	0.017
SP600125	VC	2.24	0.17	0.022	0.0096
	5	1.5*	0.1	0.033	0.017
	10	1.38*	0.043	0.017	0
	15	1.31*	0.088	0.039	0.025

หมายเหตุ * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control; VC)

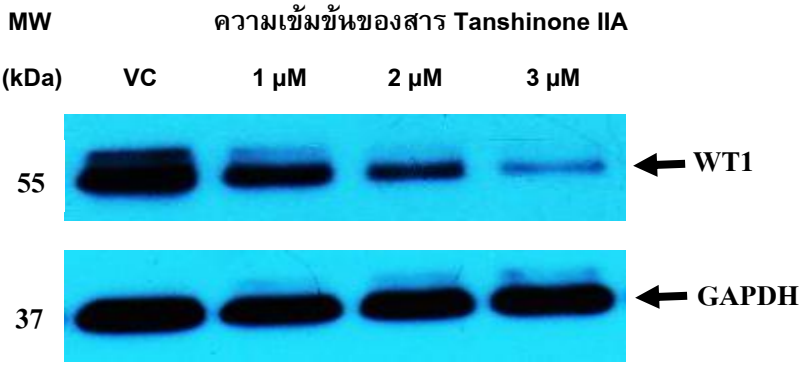


รูปที่ 15 ผลของเคอร์คิวมิน SP600125 และ Tanshinone IIA ต่อจำนวนเซลล์ K562 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดย (A) คือเคอร์คิวมิน (B) SP600125 และ (C) Tanshinone IIA ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์โดยใช้วิธี trypan blue exclusion ข้อมูลเป็นค่า mean ± SD * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control; VC)

4. การศึกษาผลของ Tanshinone IIA ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1, c-Jun และ c-Fos ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

จากการศึกษาผลของ Tanshinone IIA ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Jun พบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วย Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า Tanshinone IIA สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ร้อยละ 9.9 ± 3.6%, 33.3 ± 9.4% และ 57.0 ± 12.2% ตามลำดับ เมื่อทำการปรับเทียบการแสดงออก (normalization) ด้วย GAPDH และเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (dose dependent maner) ดังแสดงในตารางที่ 4 รูปที่ 16 และ 17 และเมื่อศึกษาผลของ Tanshinone IIA ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Jun พบว่า Tanshinone IIA มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ที่ลดลงร้อยละ 12.7 ± 15.3%, 47.6 ± 8.0% และ 48.5 ± 12.8% ตามลำดับ ตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 5 รูปที่ 18 และรูปที่ 19 และเมื่อทำการศึกษาผลของ Tanshinone IIA ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Fos พบว่า Tanshinone IIA มีผลในการเหนี่ยวนำให้โปรตีน c-Fos

มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น ตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น เท่ากับ 6.1 ± 3.0, 63.1 ± 14.6 และ 291.5 ± 58.6 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 รูปที่ 20 และรูปที่ 21 นอกจากนี้ Tanshinone IIA ที่มีผลทำให้ลดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 22

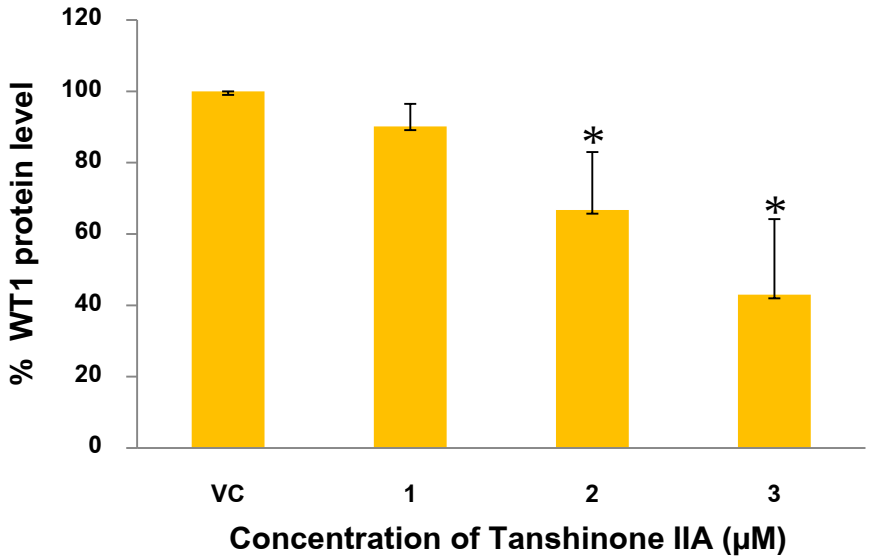


รูปที่ 16 ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 µM ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot

ตารางที่ 4 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน WT1 ที่เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 µM

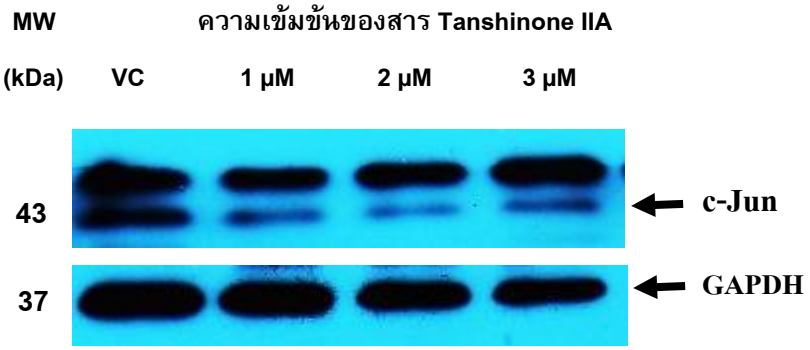
ความเข้มข้น Tanshinone IIA (µM)	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน WT1			mean	SD	SE
VC	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
1	84.9	97.2	88.3	90.2	6.3	3.6
2	48.2	78.5	73.5	66.7*	16.3	9.4
3	18.5	56.4	54.0	43.0*	21.2	12.2

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control)



รูปที่ 17 ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 วิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบด้วยโปรแกรม Quantity one (BIO-RAD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)

หมายเหตุ : VC = Vehicle control, * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)



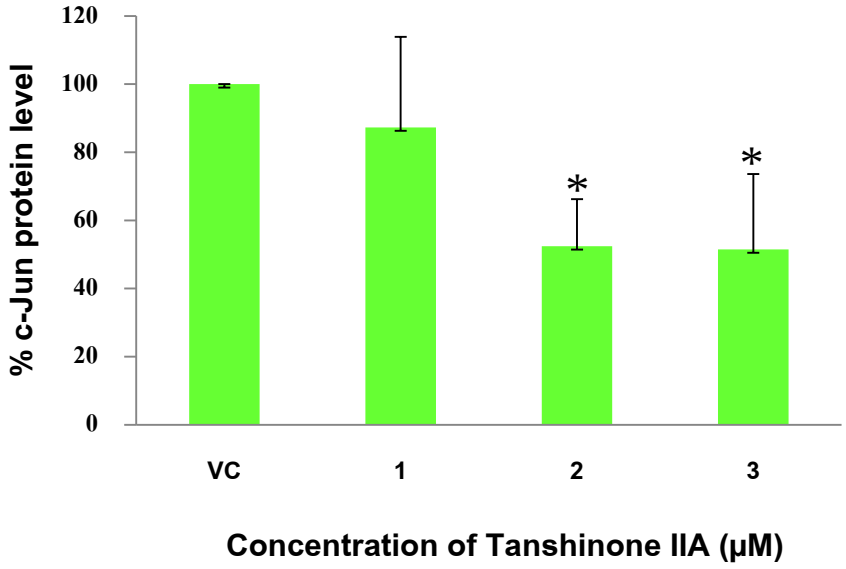
รูปที่ 18 ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot

หมายเหตุ : VC = Vehicle control

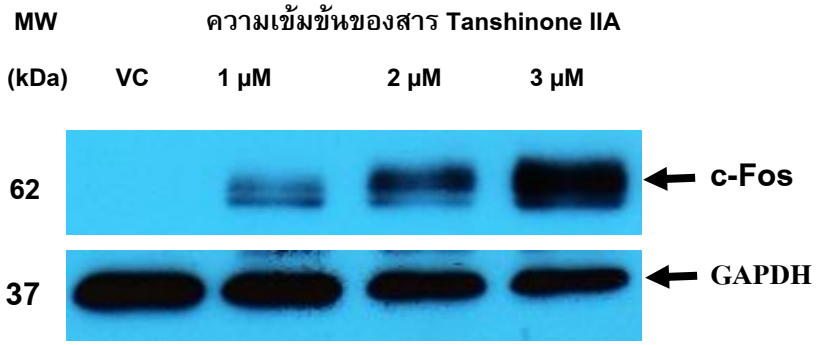
ตารางที่ 5 ผลการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ที่เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM

ความเข้มข้น Tanshinone IIA (μM)	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน c-Jun			mean	SD	SE
VC	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
1	97.7	107.1	57.1	87.3	26.6	15.3
2	43.3	68.3	45.7	52.4*	13.8	8.0
3	31.0	48.5	75.0	51.5*	22.1	12.8

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบทียบกับชุดควบคุม (vehicle control)



รูปที่ 19 ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 วิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบด้วยโปรแกรม Quantity one (BIO-RAD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)
หมายเหตุ : VC = Vehicle control * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

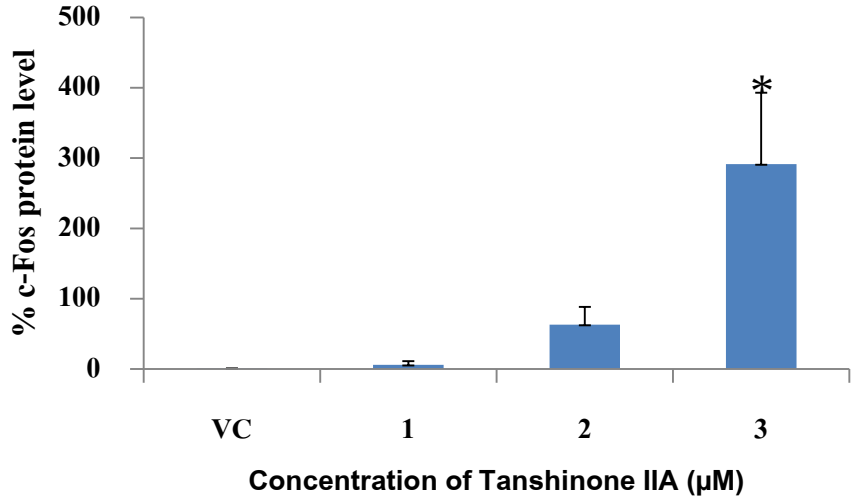


รูปที่ 20 ผลของ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot

ตารางที่ 6 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ที่เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM

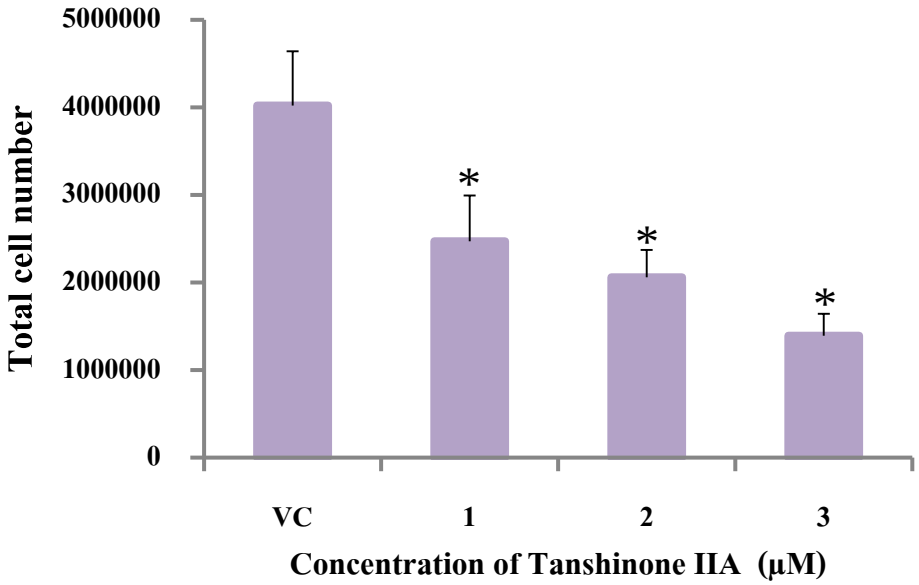
ความเข้มข้น Tanshinone IIA (μM)	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน c-Fos			mean	SD	SE
VC	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0
1	12.0	3.6	2.6	6.1	5.2	3.0
2	58.8	40.3	91.2	63.1	25.2	14.6
3	247.9	407.6	219.1	291.5*	101.6	58.6

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control)



รูปที่ 21 ผลของสาร Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยแสดงผลการทดลองด้วยวิธี Western blot และวิเคราะห์ความเข้มของแถบด้วยโปรแกรม Quantity one (BIO-RAD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time independent study)

หมายเหตุ : VC = Vehicle control, * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)



รูปที่ 22 แสดงจำนวนเซลล์หลังจากทดสอบด้วยสาร Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM โดยวิธี Trypan blue exclusion

หมายเหตุ : * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5. ผลของเคอร์คิวมิน และ Tanshinone IIA ต่อการจับของโปรตีน WT1 และ AP1 ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1*

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ JNK มีผลทำให้โปรตีน WT1 มีการแสดงออกลดลง ส่วน Tanshinone IIA นั้นโดยปกติมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด heterodimer ของ c-Jun และ c-Fos โดยการศึกษา hot spot ที่บริเวณ *WT1* gene promoter นั้นพบว่ามีบริเวณที่จับเฉพาะของโปรตีน AP1 อยู่ด้วย คือ บริเวณ TGAGTGA ดังแสดงในรูปที่ 23 ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เกิดคำถามว่า โปรตีน WT1 หรือ AP1 ที่มีบทบาทสำคัญที่ WT1 gene promoter ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งก็ให้ผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือ เมื่อทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ให้ผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า ทั้ง WT1 และ AP1 น่าจะมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน WT1 ทั้งคู่ก็อาจจะเป็นได้ ดังนั้นเพื่อความมั่นใจในผลของการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาต่อไปในส่วนของผลของเคอร์คิวมินและ Tanshinone IIA ต่อการจับกันระหว่าง WT1 protein-DNA และ c-Jun-DNA complex โดยวิธี ChIP assay

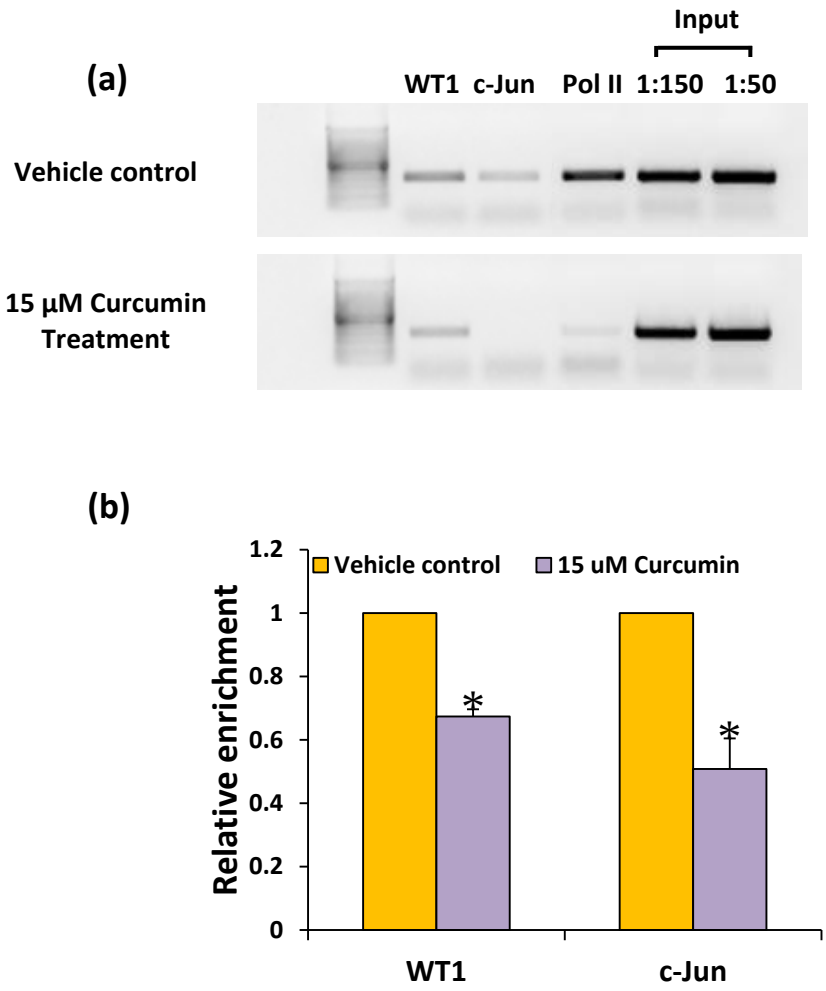
รูปที่ 23 บริเวณ WT1 binding site และ AP1 binding site ที่ proximal *WT1* gene promoter

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าโปรตีน WT1 หรือ AP1 (c-Jun และ c-Fos) ที่เป็น transcription factor ที่สำคัญต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* การศึกษานี้ได้ทำการศึกษา Protein-DNA binding โดยวิธี ChIP assay โดยการทำ immunoprecipitation ด้วย WT1 antibody และ c-Jun antibody ผลการทดลองเริ่มต้นโดยการทดสอบผลของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้ง WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเกิด WT1-DNA complex ได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 31% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) และสามารถยับยั้ง c-Jun-DNA complex ได้เท่ากับ 56% (ตารางที่ 7 รูปที่ 24(a), 24(b) และ 24(c)) ซึ่งมากกว่า WT1-DNA complex การทดลองได้ทำการ normalized ด้วย input 1:50 โดยมี Pol II–DNA complex เป็น positive control แต่อย่างไรก็ตามการจับกันระหว่าง c-Jun และ DNA นั้นพบว่าเกิดน้อยกว่า WT1-DNA complex โดย c-Jun-DNA complex เกิดขึ้นเพียง 51.6% เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับ WT1-DNA complex (ให้เป็น 100%) ดังแสดงในตารางที่ 7 รูปที่ 24 (d) หลังจากนั้น เพื่อเป็นการ confirm ผลของเคอร์คิวมิน ต่อการยับยั้ง WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ได้ทำการศึกษาผลของ Tanshinone IIA ต่อ WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding จากการศึกษาผลของ c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) พบว่าสามารถลดทั้ง WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ได้เช่นกัน โดยสามารถลด WT1-DNA binding ได้ 94% และ 54% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 7 รูปที่ 25(a) และ 25(b) ดังนั้นการทดลองดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน AP1 สามารถลด WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ลงได้เช่นเดียวกับเคอร์คิว-มิน ซึ่งเป็นไปได้ว่า AP1 น่าจะมีส่วนสำคัญต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 อย่างไรก็ตามการศึกษานี้จะต้องทำการศึกษาผลของทั้งเคอร์คิวมินและ Tanshinone IIA ต่อการทำงานของยีน *WT1* อีกครั้งจากการศึกษาด้วย Luciferase activity

ตารางที่ 7 ผลของเคอร์คิวมินและ Tanshinone IIA ต่อ WT1- และ c-Jun/AP1- DNA binding ที่ WT1 promoter (-301 bp) โดยวิธี ChIP

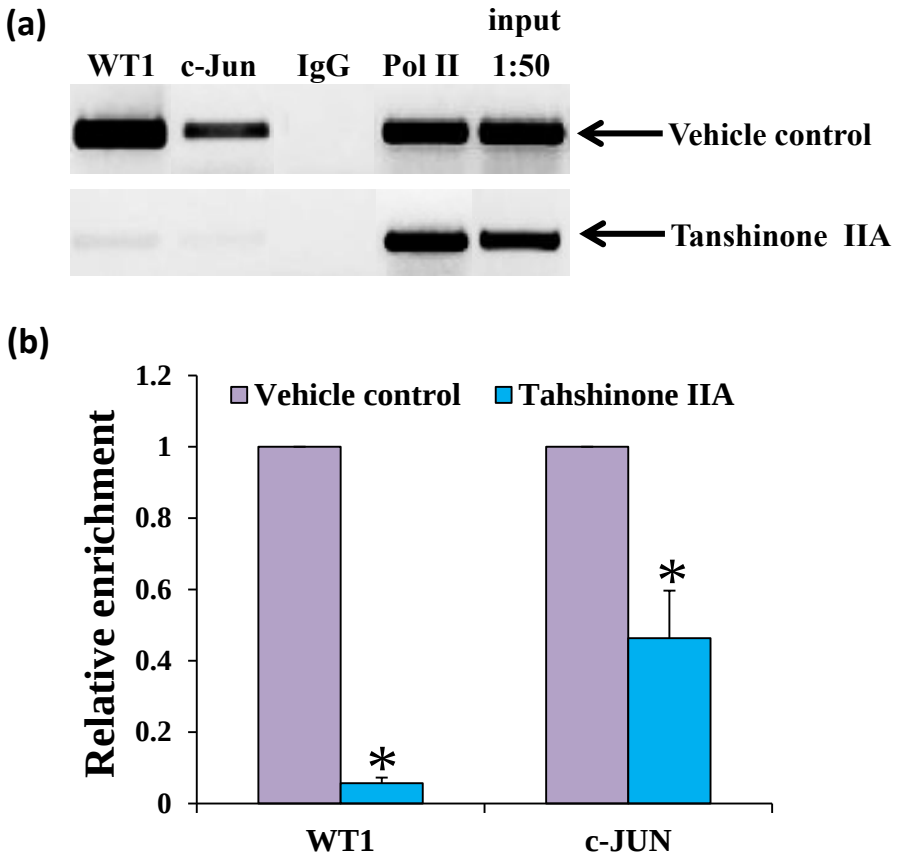
การทดลอง		**Relative enrichment**			
		ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**Mean±SD**
Vehicle control	WT1	1.0	1.0	1.0	1.0 ± 0
	c-Jun/AP1	1.0	1.0	1.0	1.0 ± 0
Curcumin	WT1	0.69	0.66	0.62	0.66 ± 0.03*
	c-Jun/AP1	0.20	0.38	0.12	0.23 ± 0.13*
Tanshinone IIA	WT1	0.02	0.08	0.07	0.06 ± 0.03*
	c-Jun/AP1	0.32	0.43	0.64	0.46 ± 0.24*

หมายเหตุ : * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (VC)



รูปที่ 24 ผลของเคอร์คิวมินต่อการเกิด WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของ WT1 ด้วยวิธี ChIP assay (a) ผลการศึกษา WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ครั้งที่ 1 (b) ผลจากการวิเคราะห์ relative enrichment เมื่อทำการทดสอบด้วย curcumin ต่อการยับยั้งการเกิด protein-DNA binding โดยให้ protein-DNA binding ของ WT1 และ c-Jun มีค่า relative enrichment เท่ากับ 1

หมายเหตุ : VC = Vehicle control * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)



รูปที่ 25 ผลของ Tanshinone IIA ต่อการเกิด WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของ WT1 ด้วยวิธี ChIP assay (a) ผลการศึกษา WT1-DNA binding และ c-Jun-DNA binding (b) ผลจากการวิเคราะห์ relative enrichment เมื่อทำการทดสอบด้วย curcumin ต่อการยับยั้งการเกิด protein-DNA binding โดยให้ protein-DNA binding ของ WT1 และ c-Jun มีค่า relative enrichment เท่ากับ 1

หมายเหตุ: VC = Vehicle control; * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control; VC)

6. ผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการทำงานของ WT1 promoter โดยวิธี luciferase activity

จากการศึกษาการทำงานของ WT1 promoter ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ที่บริเวณ WT1 proximal promoter (-301 bp) นั้น ได้เคยมีรายงานของ Semsri (2010) พบว่าที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *WT1* นั้นมี บริเวณ SP1 binding site (+74 to +82) อยู่ด้วย แต่พบว่าไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *WT1* แต่อย่างใด จากการศึกษาด้วยวิธี Luciferase activity จากการศึกษาในครั้งนี้ได้พบว่าบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *WT1* ยังมี consensus sequence ของ AP1 (+144 to +150) อยู่ด้วย เพื่อศึกษาผลของทั้ง WT1 และ AP1 ต่อการแสดงออกของยีน *WT1* (3) การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้เคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 มาทดสอบผลต่อการทำงานของ WT1 promoter reporter ที่ 24 ชั่วโมง โดยวิธี Luciferase activity การทดลองใช้เซลล์ K562 ที่ทำการ transfect ด้วย pGL3_basic luciferase reporter vector ที่มี 301 bp ของ WT1 proximal promoter (pGL3-WT1) แล้วจึงทำการทดสอบด้วย เคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจวัด การทำงานของ firefly luciferase และ beta-galactosidase และทำการเปรียบเทียบกับ pGL3 basic vector และทำการ confirm ผลการทดลองอีกครั้งโดยใช้ WT1 mutant (pGL3-WT1 mutant) ที่บริเวณ -50 to -39 bp เพื่อยับยั้งการทำงานของ WT1 promoter ส่วน β-galactosidase activities ทำการ co-transfect พร้อมกับ pGL3_basic luciferase reporter vector เพื่อเป็นตัว normalization ผลการทดลองพบว่า เซลล์ K562 ที่ทำการtransfect ด้วย pGL3-WT1 (301 bp) มี luciferase activity ที่สูงกว่าชุดควบคุม (vehicle control หรือ pGL3) และพบว่าเมื่อทดสอบด้วย curcumin, tanshinone IIA และ SP600125 ที่ความเข้มข้น 15 μM สามารถลดการทำงานของโปรโมเตอร์ ของยีน *WT1* ลง 39.28, 30.59 และ 79.09% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 8 รูปที่ 26 ส่วน reporter ที่มี mutated WT1 consensus site (negative control) มีการทำงานของ reporter ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 8 ผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการทำงานของ WT1 promoter โดยวิธี luciferase activity

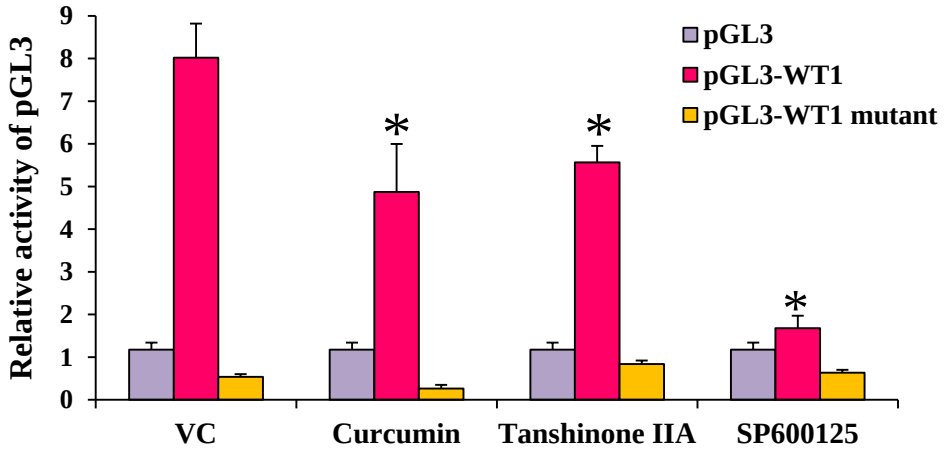
การทดลอง	pGL3			Mean ± SD
VC	1.33	1.00	1.19	1.17 ± 0.17
Curcumin	1.33	1.00	1.19	1.17 ± 0.17
Tanshinone IIA	1.33	1.00	1.19	1.17 ± 0.17
SP600125	1.33	1.00	1.19	1.17 ± 0.17

การทดลอง	pGL3-WT1			Mean ± SD
VC	8.16	7.16	8.74	8.02 ± 0.80
Curcumin	6.17	4.25	4.19*	4.87 ± 1.13
Tanshinone	5.43	5.27	6.00*	5.57 ± 0.38
SP600125	2.00	1.43	1.60*	1.68 ± 0.29

ตารางต่อหน้าที่ 42

การทดลอง	pGL3-WT1 mutant			Mean ± SD
VC	0.60	0.47	0.54	0.54 ± 0.07
Curcumin	0.18	0.35	0.26	0.26 ± 0.09
Tanshinone	0.93	0.77	0.81	0.84 ± 0.08
SP600125	0.64	0.56	0.70	0.63 ± 0.07

หมายเหตุ : * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (VC)



รูปที่ 26 ผลของเคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ต่อการทำงานของ WT1 promoter reporter ที่ 24 ชั่วโมง โดยวิธี Luciferase activity จากการทดลองใช้เซลล์ K562 ที่ทำการ transfect ด้วย pGL3_basic luciferase reporter vector ที่มี -301 bp ของ WT1 proximal promoter แล้วจึงทำการทดสอบด้วย เคอร์คิวมิน Tanshinone IIA และ SP600125 ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจวัด firefly luciferase และ β-galactosidase activities และทำการ plot กราฟ relative activities เปรียบเทียบกับ pGL3 basic vector และบริเวณที่ทำการเปลี่ยนแปลงเบสเพื่อการากลายพันธุ์ของบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *WT1* (directed mutagenesis of the WT1 consensus sequence) ที่บริเวณ -50 to -39 bp เพื่อยับยั้งการทำงานของ WT1 promoter เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับ wild type WT1 promoter construct (-301 bp WT1) ส่วน β-galactosidase activities ทำการ co-transfect พร้อมกับ pGL3_basic luciferase reporter vector เพื่อเป็นตัว normalization ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ข้อมูลที่ได้เป็นค่า mean value ± SD สัญลักษณ์ *หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (p<0.05)

7. ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อ cell cycle arrest

จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการชะลอตัวของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ในเซลล์ K562 (chronic myelocytic leukemia) โดยการย้อมเซลล์ด้วย Propidium iodide (PI) และตรวจสอบด้วยวิธี Flow cytometry พบว่า ในช่วงเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เคอร์คิวมินส่งผลทำให้เกิดการชะลอการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ โดยพบว่าเคอร์คิวมินสามารถทำให้เซลล์ชะลออยู่ที่ ระยะ G2/M อย่างเห็นได้ชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 9 รูปที่ 27(a) 27(b) และ 28(a) 28(b) โดยในการทดลองที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงจะพบว่าการเกิดการชะลอตัวของวัฏจักรเซลล์ จะเป็นไปตามความเข้มข้นของเคอร์คิวมินที่เพิ่มมากขึ้น (dose dependent manner) และมีค่าแตกต่างอย่างมี

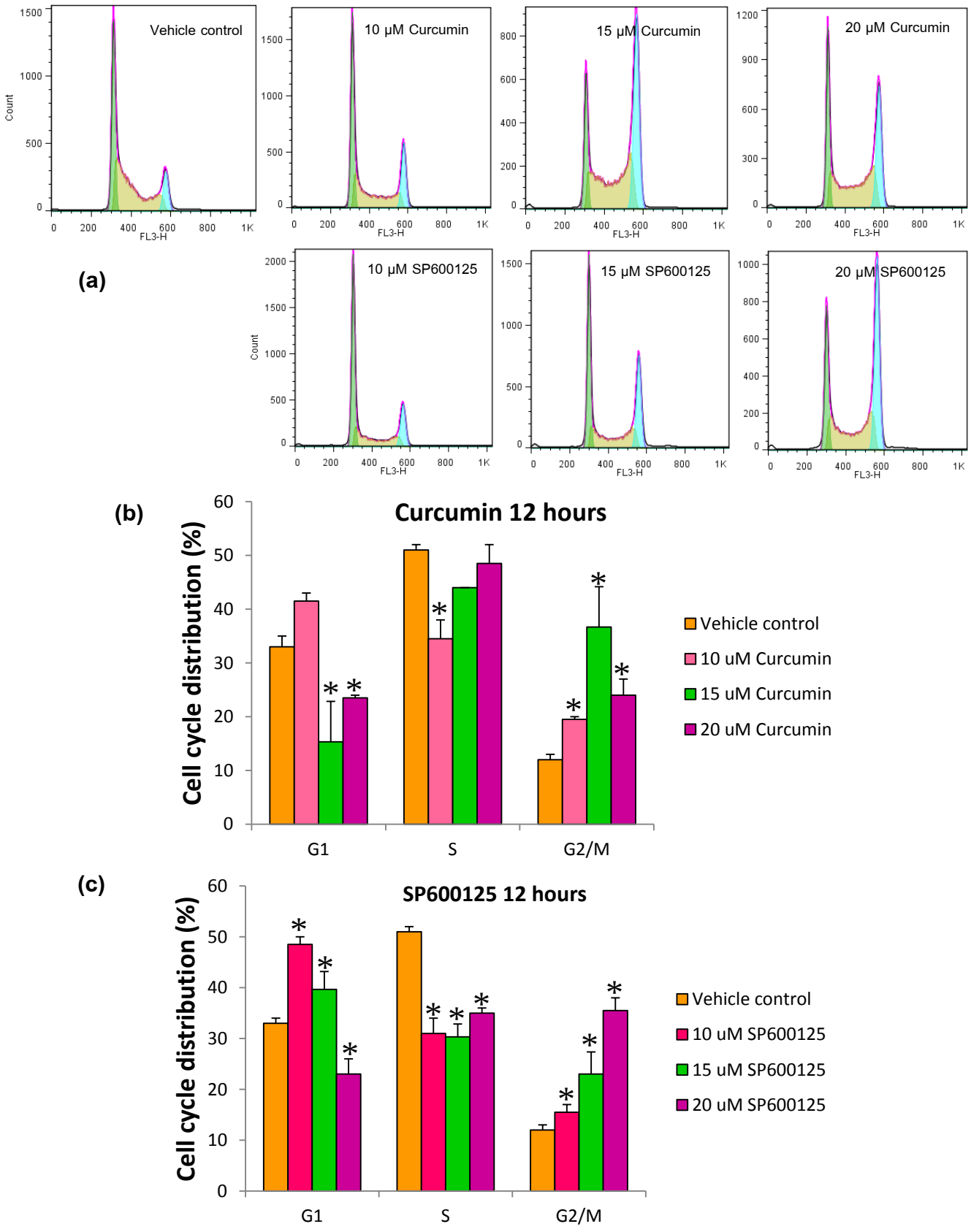
นัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และที่ความเข้มข้นของเคอร์-คิวมินที่ 20 μM มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ที่ระยะ G2/M เท่ากับ 52 ± 2.5% ซึ่งมีค่า %cell cycle distribution เพิ่มจากชุดควบคุม (vehicle control) และเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 15 μM เท่ากับ 13.7 ± 4.0%, 19 ± 1%, และ 27 ± 11.3% ตามลำดับ ซึ่งมีค่า % Cell cycle distribution สูงกว่า 38%, 33% และ 25% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการใช้ SP600125 ซึ่งเป็น JNK inhibitor ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เช่นเดียวกับความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน จากการศึกษาพบว่า SP6002125 ส่งผลให้เกิดการชะลอเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์อยู่ที่ ระยะ G2/M เช่นเดียวกับเคอร์คิวมิน อย่างเห็นได้ชัดเจนเช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 รูปที่ 27(a) 27(c) และ 28(a) 28(c) โดยในการทดลองที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการเกิด การชะลอตัวของวัฏจักรเซลล์ จะเป็นไปตามความเข้มข้นของ SP600125 ที่เพิ่มมากขึ้น (dose dependent manner) จากความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมี % cell distribution เท่ากับ 12 ± 1% และ SP600125 ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM มีค่า 16 ± 1.5%, 23 ± 4.4% และ 36 ± 2.5% ตามลำดับ โดยมีระดับของ % cell cycle distribution ที่เพิ่มขึ้นที่ระยะ G2/M เท่ากับ 4%, 11% และ 24% ตามลำดับ ส่วนในช่วงระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของ SP600125 ที่ 10 และ 15 μM มีผลให้เซลล์พักตัวที่ระยะ S เพิ่มขึ้น 5 และ 12% ส่วนที่ 48 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ cell cycle arrest ที่ G2/M (ตารางที่ 9 รูปที่ 29) การศึกษาการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผ่านวัฏจักรเซลล์ โดยใช้ Tanshinone IIA ด้วยวิธีโฟลไซโตเมตทรี ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 μM ต่อเซลล์ K562 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในระยะ G_2/M โดยมีร้อยละของปริมาณเซลล์ K562 ที่อยู่ในระยะนี้หลังจากทดสอบด้วย Tanshinone IIA มีค่าเท่ากับ 37.07, 34 และ 32 (ตารางที่ 10 รูปที่ 30) ซึ่งผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p<0.05)

ดังนั้นจากการศึกษาเบื้องต้นนี้ สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 15 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงมีผลทำให้เซลล์ชะลอการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะ G2/M และจากการศึกษาผลของ SP600125 ซึ่งเป็น JNK inhibitor พบว่าให้ผลของการชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์ K562 ที่ในระยะ G2/M เช่นเดียวกัน โดยการทดลองนี้สามารถตอบคำถามการวิจัยได้ว่า JNK ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*WT1*) ที่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถถูกยับยั้งด้วยเคอร์คิวมิน และเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ JNK (ด้วย SP600125) พบว่าสามารถชะลอการแบ่งเซลล์ในระยะ G2/M ได้เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน การศึกษานี้จึงสามารถสนับสนุน การศึกษาก่อนหน้านี้ว่า JNK เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ โปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว จากการศึกษานี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่า เคอร์คิวมิน น่าจะไปมีผลต่อโปรตีนที่สำคัญในการควบคุมการทำให้เซลล์เคลื่อนตัวเข้าสู่ระยะ G1 ในรอบถัดไป คาดว่าเคอร์คิวมินน่าจะมีผลต่อโปรตีน cyclin A-CDK1 และ cyclin B-CDK1 complexes ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนจากระยะ G2 ไปเป็น M แม้ว่าการทำงานของ cyclin A-CDK1 complex จะพบได้ทั้งระยะ S และ G2 ด้วย แต่การทำงานของ cyclin A-CDK1 จะพบได้ในระยะ G2 เท่านั้น การเปลี่ยนแปลงจากระยะ G2 ไปอยู่ในระยะ M และการดำเนินไปของระยะ M ถูกควบคุมโดยการทำงานของ cyclin B-CDK complex ซึ่งระดับของ cyclin B จะขึ้นลงตลอดในระหว่างการดำเนินไปของวงจรชีวิตเซลล์ โดยพบได้ครั้งแรกในระยะ S และเพิ่มสูงขึ้นในระยะ G2 และจะสลายไปในการแบ่งเซลล์ขั้น แอนาเฟส

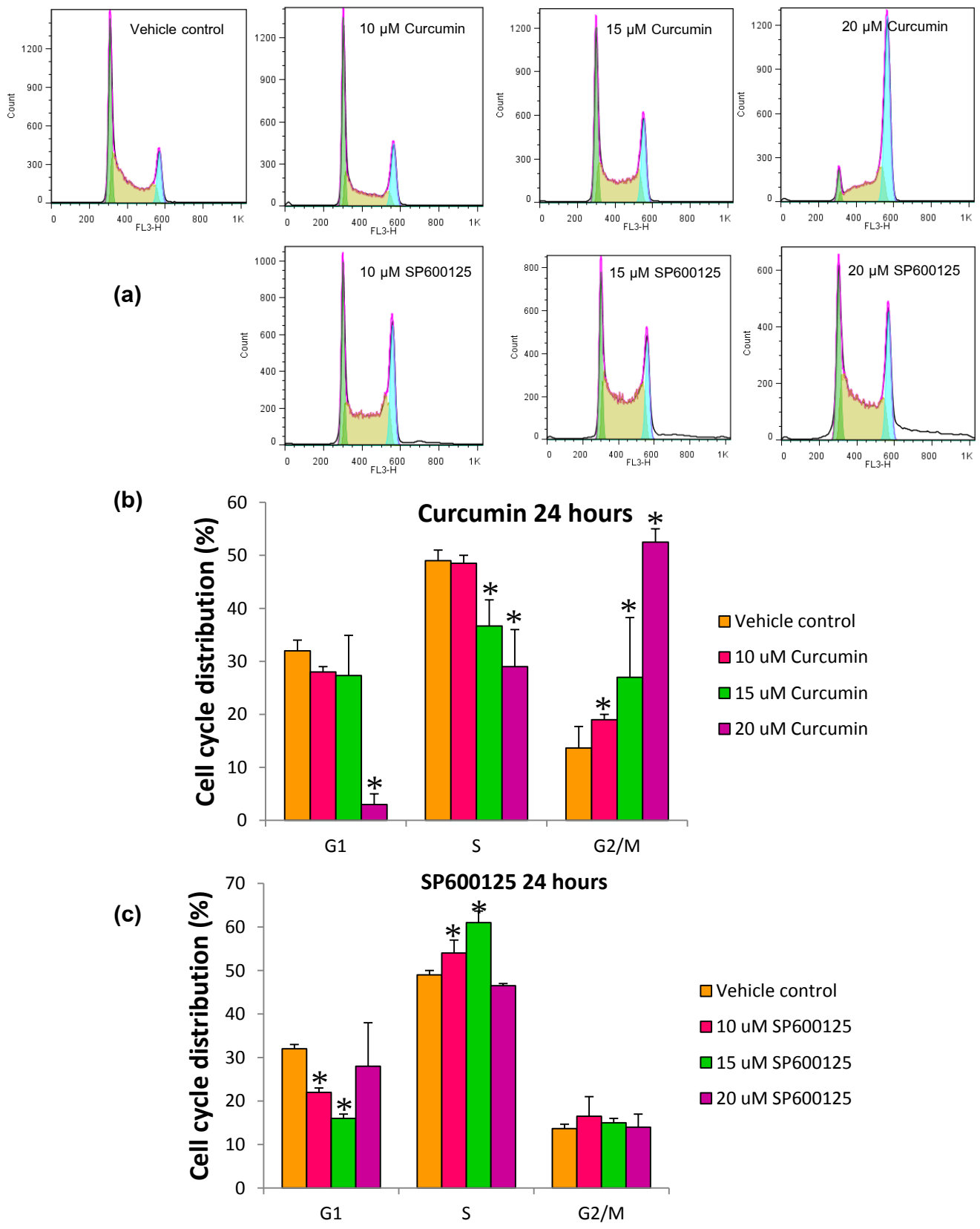
(anaphase) ของระยะ M โดยการทำงานของ cyclin B จะมากที่สุดในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากระยะ G2 ไปเป็น M และคงอยู่จนกระทั่ง cyclin B ถูกสลายไป ดังแสดงในรูปที่ 31

ตารางที่ 9 แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 หลังจากการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน (curcumin) และ SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 µM เป็นระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)

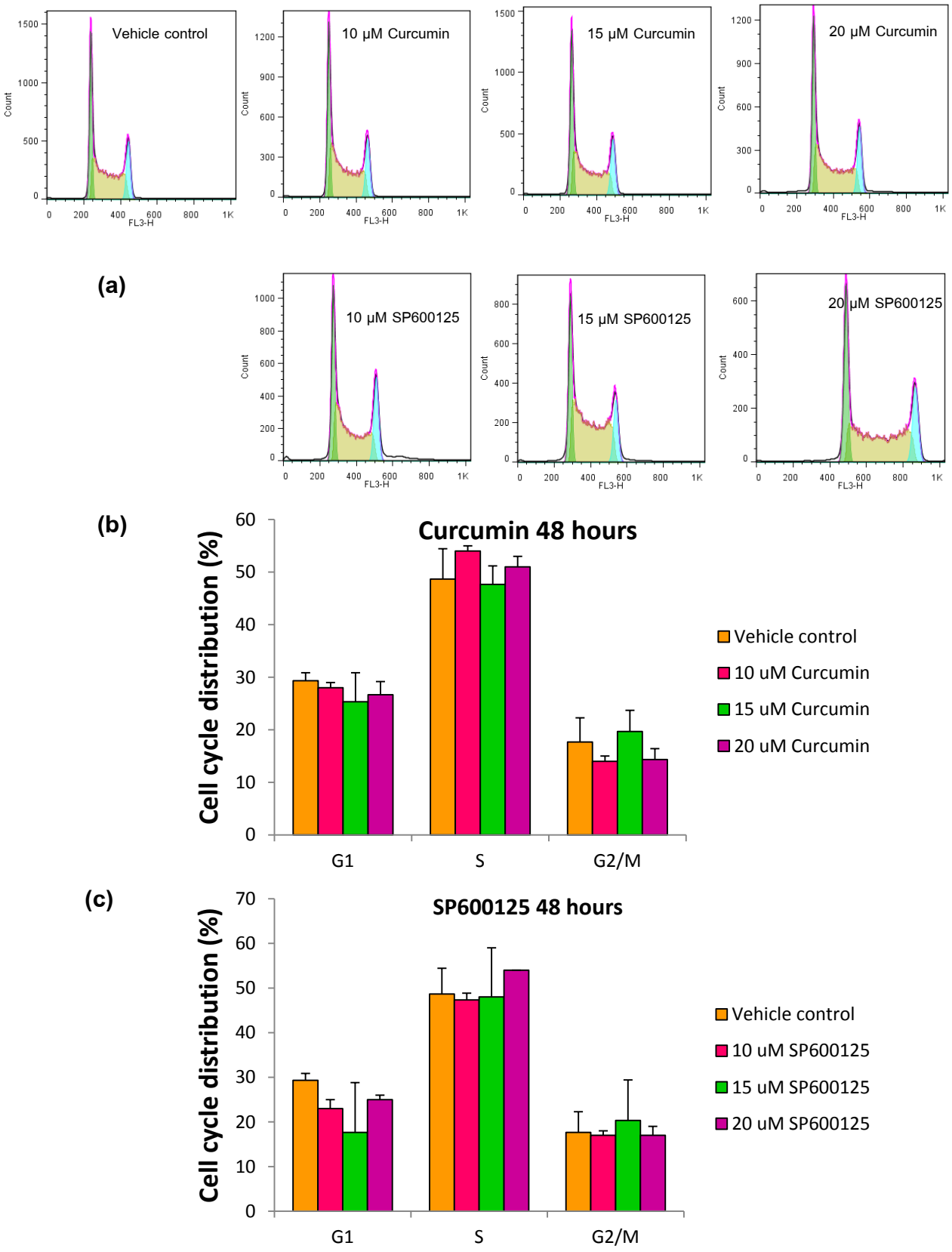
		% Cell distribution at 12 h						**% Cell distribution at 24 h**						**% Cell distribution at 48 h**					
Treatment		**Curcumin**			**SP600125**			**Curcumin**			**SP600125**			**Curcumin**			**SP600125**		
		G1	S	G2/M	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
Vehicle control		33	52	12				34	49	10				31	42	23			
		31	51	13				32	51	13				29	52	15			
		35	50	11				30	47	18				28	52	15			
	Mean	33	51	12				32	49	13.67				29.3	48.7	17.7			
	SD	2	1	1				2	2	4.041				1.53	5.77	4.62			
10 µM		40	38	19	47	34	14	27	50	18	21	51	21	28	54	15	25	47	18
		43	31	20	50	28	17	29	47	20	23	57	12	27	53	13	23	49	17
		41.5	34.5	20	49	31	16	28	48.5	19	22	54	16.5	29	55	14	21	46	16
	Mean	41.5	34.5	20	49	31	16	28	48.5	19	22	54	16.5	28	54	14	23	47.3	17
	SD	1.5	3.5	0.5	1.5	3	1.5	1	1.5	1	1	3	4.5	1	1	1	2	1.53	1
15 µM		23	44	29	43	33	18	22	31	40	15	64	16	28	44	22	26	48	19
		8	44	44	40	28	25	36	39	21	17	59	14	19	48	22	22	59	12
		15	44	37	36	30	26	24	40	20	16	60	15	29	51	15	5	37	30
	Mean	15.3	44	37	40	30	23	27.3	36.7	27	16	61	15	25.3	47.7	19.7	17.7	48	20.3
	SD	7.51	0.00	7.51	3.51	2.52	4.36	7.57	4.93	11.27	1.00	2.65	1.00	5.51	3.51	4.04	11.15	11.00	9.07
20 µM		24	45	27	26	34	33	5	36	55	18	46	17	27	51	15	24	54	19
		23	52	21	20	36	38	1	22	50	38	47	11	24	49	16	26	54	15
		23.5	48.5	24	23	35	36	3	29	52.5	28	46.5	14	29	53	12	25	54	17
	Mean	23.5	48.5	24	23	35	36	3	29	52.5	28	46.5	14	26.7	51	14.3	25	54	17
	SD	0.5	3.5	3	3	1	2.5	2	7	2.5	10	0.5	3	2.52	2.00	2.08	1	0	2



รูปที่ 27 แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 โดย (a) Flow cytometry หลังจากการทดสอบด้วย (b) เคอร์-คิวมิน (curcumin) และ (c) SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)



รูปที่ 28 แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 โดย (a) Flow cytometry หลังจากการทดสอบด้วย (b) เคอร์-คิวมิน (curcumin) และ (c) SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 µM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)

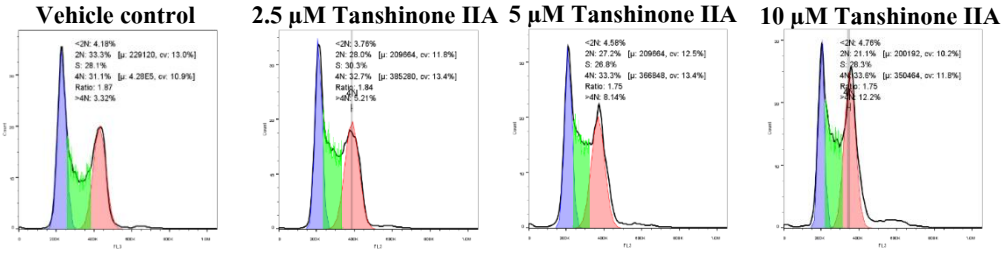


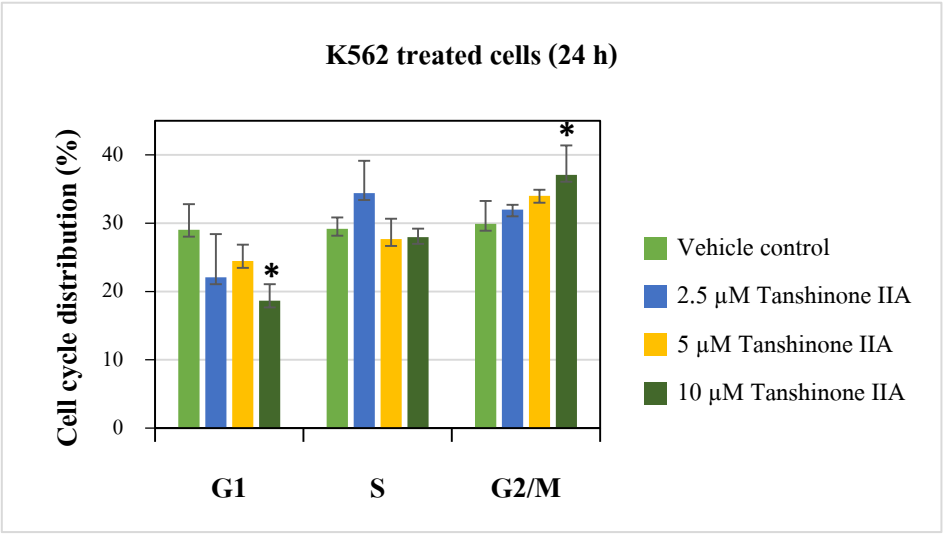
รูปที่ 29 แสดง % cell distribution ของเซลล์ K562 โดย (a) Flow cytometry หลังจากการทดสอบด้วย (b) เคอร์-คิวมิน (curcumin) และ (c) SP600125 (JNK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 time-independent experiment)

ตารางที่ 10 แสดงผลของ Tanshinone IIA ต่อร้อยละจำนวนเซลล์ที่อยู่ในแต่ละระยะ (phase) ของ วัฏจักรเซลล์ในเซลล์ K562 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นสาร (μM)	Phase	%Cell population			Mean ± SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
VC	G_0/G_1	33.30	26.30	27.50	29.03 ± 3.74
	S	28.10	31.10	28.30	29.17 ± 1.68
	G_2/M	31.10	26.10	32.50	29.90 ± 3.36
2.5	G_0/G_1	28.00	15.40	22.80	22.07 ± 6.33
	S	30.30	39.60	33.30	34.40 ± 4.75
	G_2/M	32.70	32.00	31.30	32.00 ± 0.70
5	G_0/G_1	27.20	23.50	22.70	24.47 ± 2.40
	S	26.80	25.20	31.00	27.67 ± 3.00
	G_2/M	33.30	33.70	35.00	34.00 ± 0.89
10	G_0/G_1	21.10	18.60	16.30	18.67 ± 2.40*
	S	28.30	29.00	26.60	27.97 ± 1.23
	G_2/M	33.60	35.70	41.90	37.07 ± 4.32*

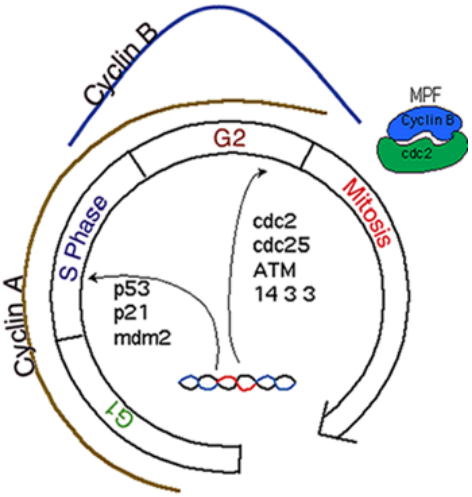
หมายเหตุ : * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (VC)





รูปที่ 30 ผลของสาร Tanshinone IIA ในเซลล์ K562 ต่อการชะลอตัวในวัฏจักรเซลล์โดยวิธีโฟลไซโตเมตทรี (Flow cytometry) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

หมายเหตุ : * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (VC)



รูปที่ 31 การทำงานของโปรตีน cyclin A และ cyclin B ในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

(http://www.vetmed.ucdavis.edu/pmi/Wilson_lab_web/Images/Cycle_Diagram.png)

8. ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin) Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อโปรตีน cyclin A, cyclin B และ cdc2 ใน cell cycle arrest

เมื่อทำการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องการการเกิด cell cycle arrest โดยการศึกษาโปรตีน cdc2 (CDK1), cyclin A และ cyclin B พบว่าหลังจากทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า cyclin B และ cdc2 ลดระดับของการแสดงออกลงได้อย่างชัดเจน และเมื่อทำการทดสอบด้วย Tashinone IIA (c-Jun inhibitor) พบว่าทั้ง cyclin A, cyclin B และ cdc2 ลดการแสดงออกลงทั้งหมด ส่วนการทดสอบด้วย SP00125 (JNK inhibitor) พบว่าระดับการแสดงออกของ cyclin B และ cdc2 ลดระดับของการแสดงออกลงเหมือนกับที่พบเมื่อทำการทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน ดังแสดงในรูปที่ 32

รูปที่ 32 ผลของเคอร์คิวมิน (curcumin), Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) และ SP600125 (JNK inhibitor) ต่อการแสดงออกของโปรตีน cyclin A, cyclin B และ cdc2 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

จากการศึกษาในรอบ 2 ปีที่ผ่านมาพบว่าผลของ Tanshinone IIA ซึ่งเป็นสารต้านการจับของโปรตีน AP1 กับยีนโปรโมเตอร์ของยีน *WT1* ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 พบว่า Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ซึ่งเป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ซึ่งสัมพันธ์กับ

จำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tanshinone IIA ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาด้วยเคอร์คิวมิน และ SP600125 และจากการศึกษาของ Semsri และคณะ (3) พบว่า การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน WT1 เกิดจากการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน PKC_{α} และ JNK ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ความรู้ใหม่ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน AP1 จะจับที่บริเวณ AP1 binding site ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1* มีผลทำให้กระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งการทำงานของโปรตีน AP1 น่าจะทำงานร่วมกับโปรตีน WT1 โดยเมื่อเติมสาร โดยสาร Tanshinone IIA ลงไป พบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการเติมฟอสเฟตให้กับ c-Jun ทำให้โปรตีน c-Jun ไม่สามารถจับกับโปรตีน c-Fos ได้ ส่งผลให้ไม่เกิด AP1 complex จึงทำให้โปรตีน AP1 ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้ไม่เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีน *WT1* ได้ ส่งผลทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน WT1 ลดลงในเซลล์ K562

9. ผลของ c-Jun knockdown ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1

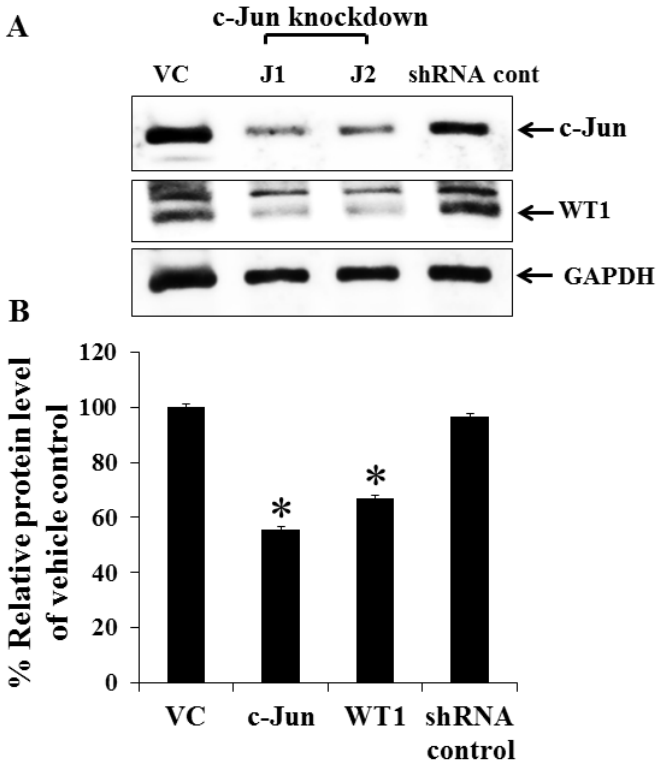
การศึกษาต่อมาได้ทำการ knockdown การแสดงออกของโปรตีน c-Jun เพื่อใช้ในการ confirm ผลการทดลอง โดยใช้ระบบ c-Jun shRNA (short hairpin RNA) lentiviral particle ใช้ระบบของการคัดเลือกเซลล์ที่ transduction ด้วย puromycin ผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการ knockdown การแสดงออกของโปรตีน c-Jun พบว่าปริมาณของโปรตีน c-Jun ลดลง 44.3% ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 33 และพบว่ามีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน WT1 ลดลง 32.9% ไปด้วย (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) และ ชุดควบคุม shRNA (Lrig 1 shRNA หรือ shRNA control) ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน เท่ากับ 100 และ 96.7±5.8% ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่ได้นี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ทำให้มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ด้วย ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 ชนิดน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1* ร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งการทดลองที่ได้ สนับสนุนการทดลองโดยวิธี ChIP และ Luciferase activity ที่ได้ทำมาก่อนหน้านี้

ตารางที่ 11 ผลการแสดงออกของโปรตีน c-Jun และ WT1 เมื่อทำการ knockdown การแสดงออกของโปรตีน c-Jun โดยใช้ระบบ c-Jun shRNA (short hairpin RNA) lentiviral particle โดยใช้ Lrig1 shRNA เป็น shRNA control

ครั้งที่	Vehicle control	c-JUN	WT1	shRNA control
1	100	57.2	53.1	100
2	100	57.2	71.9	90
3	100	52.8	76.3	100
เฉลี่ย ± SD	100 ± 0	55.7 ± 2.5*	67.1 ± 12.3*	96.7 ± 5.8

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 33 ผลของ c-Jun knockdown ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Jun และ WT1 การทดลองนี้ ทำการ knockdown *c-Jun* gene expression ซึ่งยับยั้งโดยใช้ระบบของ c-Jun shRNA lentiviral particle กับเซลล์ K562 การทดลองนี้ใช้ Lrig-1 shRNA lentiviral particle เป็น shRNA control โดย J1 และ J2 เป็นการทำ c-Jun knockdown คนละครั้งกัน ทำการศึกษาด้วยวิธี Western blotting 3 ครั้ง ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean value) ± SD เครื่องหมาย (*) หมายถึง ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า Tanshinone IIA มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอดและมะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบว่าการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน WT1 เกิดจากการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน PKCα และ JNK (Semsri, 2011) และในการศึกษาผลของโปรตีน AP1 ต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 (3) โดยใช้สาร Tanshinone IIA และ SP600125 ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการจับของโปรตีน AP1 กับ DNA binding site (AP1 binding inhibitor) และ ยับยั้งการทำงานของโปรตีน JNK (c-Jun N terminal kinase) ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดโดยใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ค่า IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 37.5, >100 และ 62.5 μM ตามลำดับ มีค่า IC_{20} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะนามาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *WT1* ในการทดลองถัดไป พบว่าให้ค่า IC_{20} ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 17.7, 2.1 และ 6.2 μM ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสารทั้ง 3 ชนิดต่อการแสดงออกของยีน *WT1* พบว่าเคอร์คิวมิน มีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 เป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (5, 10 และ 15 μM) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งเท่ากับ 13.3, 22.3 และ 53.8% ส่วน Tanshinone IIA (c-Jun inhibitor) มีผลยับยั้ง เท่ากับ 17.4, 43.2 และ 40.1% และได้ทำการศึกษา SP600125 (JNK inhibitor) เปรียบเทียบผลการทดลองด้วย ซึ่งให้ผลในการยับยั้ง เท่ากับ 7.9, 18.9 และ 23.6% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการ confirm ผลการทดลองของ Tanshinone IIA ที่ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า Tanshinone IIA สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ลง 9.9 ± 3.6%, 33.3 ± 9.4% และ 57.0 ± 12.2% เมื่อใช้ Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μM ตามลำดับ ดังนั้นจะพบว่าสารทั้ง 3 ชนิดสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ได้เช่นเดียวกัน ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการเกิด WT1-DNA และ c-Jun-DNA complex พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเกิด WT1-DNA complex ได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 31% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) และสามารถยับยั้ง c-Jun-DNA complex ได้เท่ากับ 56% แต่อย่างไรก็ตามการจับกันระหว่าง c-Jun และ DNA นั้นพบว่าเกิดน้อยกว่า WT1-DNA complex โดย c-Jun-DNA complex เกิดขึ้นเพียง 51.6% เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับ WT1-DNA complex (ให้เป็น 100%) และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้ Tanshinone IIA ผลการทดลองพบว่า Tanshinone IIA สามารถยับยั้ง WT1-DNA และ c-Jun-DNA complex ลง 94% และ 54% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า โปรตีน AP1 น่าจะมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *WT1* และจากการทดลองยังพบว่า Tanshinone IIA มีผลลดปริมาณ c-Jun โดยวิธี Western blot ด้วย อาจจะเป็นผลเนื่องมาจาก ตัวของสาร Tanshinone IIA เองไปมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน c-Jun เองด้วย นอกจากจะมีผลโดยตรงกับการยับยั้งการทำงานของโปรตีน JNK และส่งผลในการลดการกระตุ้นการทำงานของ c-Jun แต่อย่างไรก็ตาม หากต้องการศึกษาปริมาณของ activated c-Jun (phosphorylated c-Jun) ที่เป็นผลจาก Tanshinone IIA ควรต้องทำการศึกษาต่อโดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ phosphorylated c-Jun ซึ่งจะได้ข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนผลของ Tanshinone IIA ต่อการทำงานของโปรตีน c-Jun ด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาผลของ Tanshinone IIA ต่อการแสดงออกของโปรตีน c-Fos พบว่า Tanshinone IIA มีผลในการเหนี่ยวนำให้โปรตีน c-Fos มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น ตาม

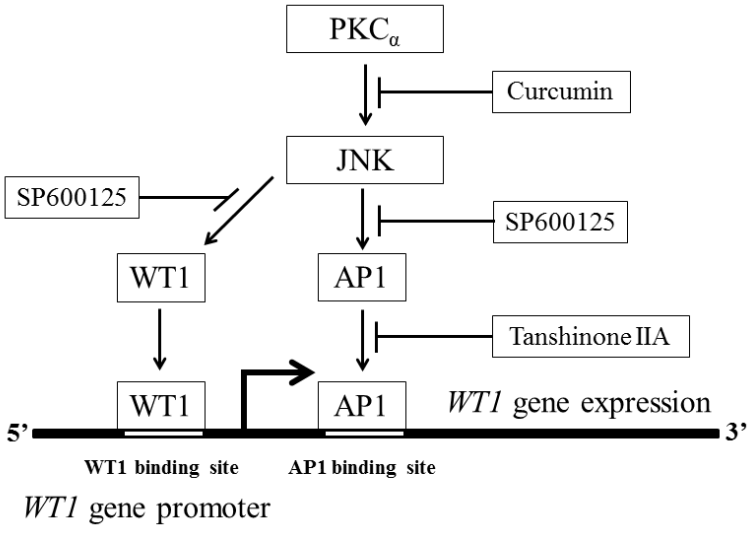
ความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น เท่ากับ 6.1 ± 3.0, 63.1 ± 14.6 และ 291.5 ± 58.6 เท่า ตามลำดับเมื่อทำการปรับเทียบการแสดงออก (normalization) ด้วย GAPDH และเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษานี้พบว่า Tanshinone IIA มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ลง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้สาร Tanshinone IIA ทำให้ AP1 complex ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน c-Jun และ c-Fos รวมตัวเป็นโปรตีน AP1 ไม่สามารถจับกับ AP1 binding site ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1* ได้ ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีนได้ จึงทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน WT1 ที่ลดลง จากการศึกษานี้จึงสามารถตอบโจทย์การทดลองได้อย่างชัดเจนว่า โปรตีน AP1 มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งส่งผลต่อการสร้างโปรตีน WT1 ซึ่งจากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าทั้ง AP1 และ WT1 นั้นน่าจะมีการทำงานร่วมกัน ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* เนื่องจากทั้ง AP1 และ WT1 สามารถถูกกระตุ้นการทำงานได้โดยโปรตีน JNK และเนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Semsri และคณะ พบว่าโปรตีน JNK มีบทบาทสำคัญต่อการจับกันของโปรตีน WT1 และ DNA ที่บริเวณยีนโปรโมเตอร์ของ *WT1* ซึ่งจากการศึกษาที่ยีนโปรโมเตอร์ของ *WT1* นอกจากบริเวณ consensus sequence ของ AP1 แล้วยังพบว่ามี consensus sequence ของโปรตีน SP1 ด้วย ซึ่งจากการศึกษาโดยการใช้วิธี ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) พบว่าไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *WT1* แต่อย่างใด รวมทั้งไม่มีผลต่อ WT1-DNA binding ด้วย ซึ่งต่างจากผลของโปรตีน AP1 ซึ่งผลของการทดลองนี้ ทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ Tanshinone IIA ที่มีผลทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน c-Jun ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และหลังจากการทดสอบด้วย Tanshinone IIA ซึ่งมีผลลดการแสดงออกของยีน *WT1* ลดลงแล้วยังทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวลดลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 22 นอกจากนี้ยังพบว่า เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเกิด WT1-DNA complex ได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 31% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (vehicle control) และสามารถยับยั้ง c-Jun-DNA complex ได้เท่ากับ 56% จากการศึกษาในครั้งนี้ช่วยสนับสนุนผลการทดลองว่า AP1 มีผลในการช่วยสนับสนุนการแสดงออกของยีน *WT1* ร่วมกับโปรตีน WT1 ดังนั้นเมื่อใช้ เคอร์คิวมิน ซึ่งมีผลทั้งยับยั้งโปรตีน WT1 และ AP1 จึงทำให้การแสดงออกของยีน *WT1* ลดลง การศึกษาได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนผลการทดลองว่า AP1 มีผลต่อการแสดงออกของยีน *WT1* โดยทำการ knockdown ยีน *c-Jun* โดยใช้ระบบของ shRNA ผลการทดลองทำให้ทราบว่าหลังจากทำการ knockdown การแสดงออกของยีน *c-Jun* มีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน c-Jun และ WT1 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน AP1 มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและโปรตีน WT1 ทั้งนี้ในส่วนของการเพิ่มขึ้นของโปรตีน c-Fos อาจต้องมีการศึกษาในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะศึกษาถึงกลไกและความสัมพันธ์ของโปรตีน c-Fos ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบด้วย Tanshinone IIA

อย่างไรก็ตามการยับยั้ง Protein-DNA binding จำเป็นต้องมีการศึกษาผลของ เคอร์คิวมิน c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) และ JNK inhibitor (SP600125) ต่อการทำงานของยีน *WT1* โดยวิธี reporter gene (Luciferase activity) จากผลการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมิน c-Jun inhibitor (Tanshinone IIA) และ JNK inhibitor (SP600125) ที่ความเข้มข้น 15 μM สามารถยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ลง 39.28, 30.59 และ 79.09% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p<0.05) จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการชะลอตัวของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) โดยวิธี Flow cytometry พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 15 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงมีผลทำให้เซลล์ชะลอการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะ G2/M และจากการศึกษาผลของ SP600125 ซึ่งเป็น JNK inhibitor พบว่าให้ผลของการชะลอการ

เจริญเติบโตของเซลล์ K562 ที่ในระยะ G2/M เช่นเดียวกัน เมื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องการการเกิด cell cycle arrest โดยการศึกษาโปรตีน cdc2 (CDK1), cyclin A และ cyclin B พบว่าหลังจากทดสอบด้วยเคอร์คิวมิน และ SP00125 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง cyclin B และ cdc2 ลดระดับของการแสดงออกลงได้อย่างชัดเจน ส่วน Tashinone IIA พบว่าทั้ง cyclin A, cyclin B และ cdc2 ลดการแสดงออกลงทั้งหมด

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของ Tanshinone IIA ซึ่งเป็นสารต้านการจับของโปรตีน AP1 กับยีนโปรโมเตอร์ของยีน *WT1* ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 พบว่า Tanshinone IIA ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ซึ่งเป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tanshinone IIA ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาด้วยเคอร์คิวมิน และ SP600125 และจากการศึกษาของ Semsri และคณะ[1] พบว่า การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน WT1 เกิดจากการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน PKCα และ JNK ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ความรู้ใหม่ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน AP1 จะจับที่บริเวณ AP1 binding site ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1* มีผลทำให้กระตุ้นการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งการทำงานของโปรตีน AP1 น่าจะทำงานร่วมกับโปรตีน WT1 โดยเมื่อเติมสารโดยสาร Tanshinone IIA ลงไป พบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการเติมฟอสเฟตให้กับ c-Jun ทำให้โปรตีน c-Jun ไม่สามารถจับกับโปรตีน c-Fos ได้ ส่งผลให้ไม่เกิด AP1 complex จึงทำให้โปรตีน AP1 ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้ไม่เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีน *WT1* ได้ ส่งผลทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน WT1 ลดลงในเซลล์ K562 ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลการทดลองโดยวิธี ChIP และ Luciferase activity ทั้งนี้ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดที่ Tanshinone IIA ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีการแสดงออกของโปรตีน c-Fos ที่เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของ Tanshinone IIA ที่เพิ่มขึ้นต้องมีการศึกษาในระดับอณูชีวโมเลกุลต่อไป



รูปที่ 34 โปรตีน AP1 ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน c-Jun และ c-Fos เมื่อถูกเติมฟอสเฟตแล้วสามารถจับบริเวณ AP1 binding site ที่โปรโมเตอร์ของยีน *WT1* เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1*

บรรณานุกรม

1. Sugiyama H, Watanabe T, Hirayama T. Nitration of pyrene in metallic oxides as soil components in the presence of indoor air, nitrogen dioxide gas, nitrite ion, or nitrate ion under xenon irradiation. J Health Sci. 2001;47(1):28-35.
2. Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, et al. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. Blood. 1996;87(7):2878-84.
3. Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney CA, Anuchapreeda S. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor 1 (WT1) gene expression through the PKCalpha signaling pathway in leukemic K562 cells. FEBS Lett. 2011;585(14):2235-42.
4. Herrera R, Agarwal S, Walton K, Satterberg B, Distel R, Goodman R, et al. A direct role for c-fos in AP-1-dependent gene transcription. Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research. 1990;1(10):483-90.
5. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, et al. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell. 1987;49(6):729-39.
6. Matsunaga E. Genetics of Wilms' tumor. Hum Genet. 1981;57(3):231-46.
7. Breslow N, Langholz B. Childhood cancer incidence: geographical and temporal variations. Int J Cancer. 1983;32(6):703-16.
8. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell. 1990;60(3):509-20.
9. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. Leukemia. 1995;9(6):1060-7.
10. Karin M, Liu Z-g, Zandi E. AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol. 1997;9(2):240-6.
11. Whitmarsh A, Davis R. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med. 1996;74(10):589-607.
12. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. Curr Opin Cell Biol. 1996;8(2):205-15.
13. Lee W, Mitchell P, Tjian R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell. 1987;49(6):741-52.
14. Monje P, Hernández-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK A novel role for the prolyl isomerase PIN1. J Biol Chem. 2005;280(42):35081-4.

15. Yun S-M, Jeong S-J, Kim J-H, Jung JH, Lee H-J, Sohn EJ, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase mediates tanshinone IIA-induced apoptosis in KBM-5 chronic myeloid leukemia cells. Biol Pharm Bull. 2013;36(2):208-14.
16. Hyun J, Sun M, Yoosik Y. Tanshinone II A, an ingredient of Salvia miltiorrhiza Bunge, induces apoptosis in human leukemia cell lines through the activation of caspase-3. Exp Mol Med. 1999;31(4):174-8.
17. Yoon Y, Kim Y-O, Jeon W-K, Park H-J, Sung HJ. Tanshinone IIA isolated from Salvia miltiorrhiza BUNGE induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line. J Ethnopharmacol. 1999;68(1):121-7.
18. Kastanos E, Hjiantoniou E, Phylactou LA. Restoration of protein synthesis in pancreatic cancer cells by trans-splicing ribozymes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;322(3):930-4.
19. Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell. 1992;71(4):587-97.
20. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science. 1996;274(5293):1672-7.
21. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Curr Sci. 2004;87(1):44-53.
22. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. Altern Med Rev. 2009;14(2):141-53.
23. Sharma OP. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. Biochem Pharmacol. 1976;25(15):1811-2.
24. Toda S, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H, Takino Y. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of Curcuma longa L. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1985;33(4):1725-8.
25. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. J Agric Food Chem. 1999;47(10):4297-300.
26. Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. 1986;24(12):651-4.
27. Srimal RC, Dhawan BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent*. J Pharm Pharmacol. 1973;25(6):447-52.
28. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. Wound Repair Regen. 1998;6(2):167-77.
29. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. Adv Exp Med Biol. 2007;595:1-75.
30. Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa). Cancer Lett. 1985;29(2):197-202.
31. Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? Nature Reviews Neuroscience. 2007;8(5):368-78.

32. Wahlström B, Blennow G. A Study on the Fate of Curcumin in the Rat. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1978;43(2):86-92.
33. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. Xenobiotica. 1978;8(12):761-8.
34. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. Drug Metab Dispos. 1999;27(4):486-94.
35. Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Res. 1988;48(21):5941-6.
36. Reddy S, Aggarwal BB. Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. FEBS Lett. 1994;341(1):19-22.
37. Liu JY, Lin SJ, Lin JK. Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. Carcinogenesis. 1993;14(5):857-61.
38. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med. 1991;57(1):1-7.
39. Anuchapreeda S, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P, Limtrakul P. Curcumin inhibits WT1 gene expression in human leukemic K562 cells. Acta Pharmacol Sin. 2006;27(3):360-6.
40. Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P. Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. Arch Pharm Res. 2006;29(1):80-7.
41. Anuchapreeda S, Tima S, Duangrat C, Limtrakul P. Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on WT1 gene expression in leukemic cell lines. Cancer Chemother Pharmacol. 2008;62(4):585-94.
42. Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney CA, Anuchapreeda S. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor 1 (WT1) gene expression through the PKCα signaling pathway in leukemic K562 cells. FEBS Lett. 2011;585(14):2235-42.
43. Tima S, Ichikawa H, Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S. Inhibitory effect of turmeric curcuminoids on FLT3 expression and cell cycle arrest in the FLT3-overexpressing EoL-1 leukemic cell line. J Nat Prod. 2014;77(4):948-54.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ซึ่งมี acknowledgement สกว. และควรระบุเลขที่สัญญา (หากยังไม่มีผลงาน ให้ระบุชื่อเรื่องและชื่อวารสารนานาชาติที่คาดจะตีพิมพ์ได้ และคาดว่าจะตีพิมพ์ได้เมื่อใด)

1. Singkome Tima, Hideki Ichikawa, Chadarat Ampasavate, Siriporn Okonogi*, **Songyot Anuchapreeda***. Inhibitory Effect of Turmeric Curcuminoids on FLT3 Expression and Cell cycle Arrest in the FLT3-Overexpressing EoL-1 Leukemic Cell Line. Journal of Natural Products. 77(4), 948-954, 2014. (Impact factor 3.94)
2. Methee Rungrojsakul, Aroonchai Saiai, Chadarat Ampasavate, **Songyot Anuchapreeda***, Siriporn Okonogi*. Inhibitory effect of mammea E/BB from Mammea siamensis seed extract on Wilms' tumour 1 protein expression in a K562 leukaemic cell line. Natural Product Research. DOI: 10.1080/ 14786419.2015.1017491, 1-5, 2015. (Impact factor 1.2)
3. **Songyot Anuchapreeda**, Methee Rungrojsakul, Sheryl R. Krig, Nucharee Yokdang, Colleen A. Sweeney. Turmric curcumin suppresses *WT1* expression leukemia cells through inhibition of c-JUN/AP1 mediated expression. (Manuscript preparation)
4. Ornchuma Naksuriya, Methee Rungrojsakul, SingkomeTima, **Songyot Anuchapreeda**, Siriporn Okonogi Evaluation of curcumin loaded HPMA-based polymeric micelles on normal cell compatibility and anticancer activity in K562 cells. (Manuscript preparation)
5. Singkome Tima, **Songyot Anuchapreeda**, Chadarat Ampasavate, Cory Berkland, Siriporn Okonogi. A stable micelle formulation of curcumin enhances cellular uptake. (Manuscript preparation)

กิจกรรมอื่น ๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

(1) ผลงานอื่นๆ เช่นการไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญเป็นวิทยากร
ได้ไปเสนอผลงานวิจัยที่ต่างประเทศ

Methee Rungrojsakul, Chadarat Ampasavate, **Songyot Anuchapreeda**, Siriporn Okonogi. Antiproliferative and cytotoxic effects of Thai medicinal plants in Thai traditional medicine's recipes on leukemia cells, Poster presentation at The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Sapporo, Japan, 19-21 September, 2012.

Singkome Tima, **Songyot Anuchapreeda**, Chadarat Ampasavate, Siriporn Okonogi. Inhibitory Effect of Curcumin on FLT3 expression and Cell Cycle Arrest in FLT3 Overexpressing

EoL-1 Leukemic Cells. Oral presentation at The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Yokohama, Japan, 3-5 October, 2013.

Songyot Anuchapreeda, Methee Rungrojsakul, Sheryl R. Krig, Nucharee Yokdang, Sarawut Taowtep, Colleen A. Sweeney. Curcumin suppresses *WT1* gene promoter activity and gene expression by blocking co-activation of WT1 and AP1 in K562 cells. Poster presentation at The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Yokohama, Japan, 25-27 September, 2014.

(2) การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

มีความเชื่อมโยงการทำงานร่วมกันระหว่าง Prof. Dr. Colleen Sweeney ที่ UC Davis, School of Medicine, Cancer center, Sacramento, USA ในการทำวิจัยร่วมกัน และส่งนักศึกษาปริญญาเอกไปทำวิจัยในครั้งนี้ด้วย

มีความเชื่อมโยงการทำงานร่วมกันระหว่าง Prof. Dr. Cory Berkland ที่ University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA

การเชื่อมโยงกับต่างประเทศหรือรางวัลที่ได้รับ

งานวิจัยที่ทำนี้ เป็นงานวิจัยที่ทำร่วมกับ Prof. Dr. Colleen Sweeney ที่ UC Davis, School of Medicine, Cancer center, Sacramento, USA และ Prof. Dr. Cory Berkland ที่ University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA ซึ่งได้รับความร่วมมือ อีกทั้งความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดียิ่ง ซึ่งงานวิจัยบางส่วนได้การสนับสนุนทั้งสารเคมีและเครื่องมือที่จำเป็นจากห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Colleen Sweeney ทำให้การทำงานลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้เป็นอย่างดีทุกประการ โดยผู้วิจัยได้มีโอกาสที่ดีไปทำวิจัยจากการสนับสนุนของ Prof. Dr. Colleen Sweeney และผลการศึกษาและทดลองที่ได้จะได้รวบรวมและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกันต่อไปในอนาคต นอกจากนี้งานวิจัยที่ทำร่วมกันยังสามารถทำให้เกิดเครือข่ายความร่วมมืออันดี ที่สามารถส่งนักศึกษาปริญญาเอก นายเมธี รุ่งโรจน์สกุล และนายสิงห์คำ ธิมา ไปทำวิจัยเพิ่มเติมที่ห้องห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Colleen Sweeney และ Prof. Dr. Cory Berkland ซึ่งเป็นผลพลอยได้อันดีของโครงการนี้ อีกทั้งยังได้มีโอกาสทำงานร่วมกับนักวิจัยอีกหลายท่านที่มีประสบการณ์อีกด้วย

ลงนาม.....

(รศ.ดร.ทรงยศ อนุชปรีดา)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

30 สิงหาคม 2558

ภาคผนวก

JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION
さっぽろテレビ塔展望台より大通公園を望む
北洋銀行
NORTH PACIFIC BANK
The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- Towards a new era and liaison of cancer research and life science -
第71回日本癌学会学術総会
— がん研究とライフサイエンスの更なるリエゾン —
PROCEEDINGS
September 19 (Wed.) - 21 (Fri.), 2012
Royton Sapporo
Sapporo Geibunkan
Sapporo Education and Culture Hall
President
Noriyuki Sato
Sapporo Medical University
佐藤 昇志
札幌医科大学医学部 病理学第一講座 教授
http://www.congre.co.jp/jca2012

เอกสารปกปิด ห้ามเผยแพร่ก่อนได้รับอนุญาต

Room R-P1 Sep. 21 (Fri) 16:40 - 17:30

P18-16 Natural anticancer compounds
天然抗がん物質

Chairperson: Hiroeki Sahara (Azabu Univ. Sch. of Veterinary Med.)
座長：佐原 弘益（麻布大学　獣医学部）

P-3131 Antiproliferative and cytotoxic effects of Thai medicinal plants in Thai traditional medicine recipes on leukemia cells

Methee Rungrojsakul[1], Chadarat Ampasavate[1], Songyot Anuchapreeda[2], Siriporn Okonogi[1] ([1]Faculty of Pharmacy, Chiang Mai Univ., [2]Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai Univ.)

Thai medicinal plants have long been used in Thai traditional medicine's recipes for cancer treatments with less scientific data support.This study aimed to investigate the anti-cancer activities of plants commonly used in the Thai traditional anti-cancer recipes against four leukemia cells (K562, U937, Molt4, and HL60). Eleven plant species were extracted by 95% ethanol. The cytotoxicity was determined by MTT assay. Cell proliferation was determined by Trypan blue exclusion and Western blotting. Crude seed extract of *Mammea siamensis* gave the highest cytotoxicity to all cancers with IC_{50} values of 9.3±3.0, 2.3±0.4, 15.4±3.9, and 2.1±0 ug/mL in response to K562, U937, Molt4, and HL60, respectively. Crude *Piper betle* leaf extract possessed high cytotoxicity with the IC_{50} values of 36.4±1.5, 17.3±0.7, 19.7±1.6, and 28.9±5.6 ug/mL, respectively. Crude *M.siamensis* extract could decrease WT1 protein level and cell number by 78% and 91%, respectively, while crude *P. betle* leaf extracts could decrease by 41% and 41%, respectively in K562cells. In summary, *M. siamensis* and *P. betle* extract had anti-cancer activity which suitable for further investigation of a new chemotherapeutic agent.

Keywords: Leukemia, Plant

第72回 日本癌学会学術総会
72nd Annual Meeting of
the Japanese Cancer Association
PROGRAM
President
Yusuke Nakamura
The University of Chicago
学術会長
中村 祐輔
シカゴ大学医学部
がん患者の希望につながるがん研究
Cancer research providing hope to fight against cancer
JCA
JAPANESE CANCER ASSOCIATION
October 3 (Thu.) - 5 (Sat.), 2013
PACIFICO YOKOHAMA, Yokohama
URL：http://www2.convention.co.jp/jca2013/

เอกสารปกปิด ห้ามเผยแพร่ก่อนได้รับอนุญาต

English Oral Sessions

Room 10 Oct. 4 (Fri.) 9:00-10:00

E16-2 Oncopharmacology (1)
抗がん薬の薬理（1）

Chairperson: Takao Yamori (Ctr. for Product Evaluation, PMDA)
座長：矢守 隆夫（医薬品医療機器総合機構・審査センター）

E-2018 **A Novel Preclinical Model of Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy Using iPSC-derived Human Neurons**
Masaaki Komatsu, M. Eileen Dolan (HemOnc, Dept. Med, Univ. of Chicago)
ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた化学療法誘発性末梢神経障害の新規前臨床研究モデル
小松 正明、M. Eileen Dolan（シカゴ大・医・血液学腫瘍学）

E-2019 **Inhibitory Effect of Curcumin on FLT3 expression and Cell Cycle Arrest in FLT3 Overexpressing EoL-1 Leukemic Cells**
Singkome Tima[1], Songyot Anuchapreeda[2], Chadarat Ampasavate[3], Siriporn Okonogi[3] ([1]Fac. of Grad School., CMU, [2]Dept. of Med Tech., CMU, [3]Dept. of Pharm Sci, CMU)

E-2020 **Bisphosphonates produce cytotoxic effects on mesothelioma through inhibiting topoisomerase II and Rab functions**
Shinya Okamoto[1], Yuanyuan Jiang[1], Shuji Kubo[2], Yuji Tada[3], Ikuo Sekine[4], Yuichi Takiguchi[4], Koichiro Tatsumi[3], Hideaki Shimada[5], Kenzo Hiroshima[6], Masatoshi Tagawa[1] ([1]Div. Pathol & Cell Ther., Chiba Cancer Ctr. Res. Inst., [2]Dept. of Genetics, Hyogo College of Med., [3]Dept. Respirol., Grad. Sch. Med., Chiba Univ., [4]Dept. Med. Oncol., Grad. Sch. Med., Chiba Univ., [5]Dept. Surgery, Sch. Med., Toho Univ., [6]Dept. Pathol.,Tokyo Women's Med Univ. Yachiyo Med Ctr.)
Topoisomerase IIとRab機能の阻害によりビスフォスフォネートは悪性中皮腫に対する細胞傷害活性を発揮する
岡本 慎也[1]、江 媛媛[1]、久保 秀司[2]、多田 裕司[3]、関根 郁夫[4]、滝口 裕一[4]、巽 浩一郎[3]、島田 英昭[5]、廣島 健三[6]、田川 雅敏[1]（[1]千葉がんセ・研・細胞治療、[2]兵庫医大・遺伝学、[3]千葉大・院医・呼吸器内科、[4]千葉大・院医・先端化学療法、[5]東邦大・医・一般消化器外科、[6]東京女子医大・八千代医療セ・病理）

E-2021 ***Caesalpinia sappan* L. Enhances Cytotoxicity of Cisplatin on HeLa Cells through Cell Cycle Arrest**
Edy Meiyanto[2,4], Ulfatul Husnaa[1,2], Ratna A. Susidarti[2,4], Ni Putu Linda Laksmiani[2,3] ([1]Dept. of Biotechnology, Graduate School, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, [2]Cancer Chemoprevention Research Center, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, [3]Department of Pharmacy, Universitas Udayana, Bali, [4]Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta)

E-2022 **Anticancer effects of palmitic acid derivatives**
Masumi Suzui, Yasuaki Isoda, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Kenta Moriwaki (Dept Mol Tox, Grad Sch Med Sci, Nagoya City Univ)
パルミチン酸誘導体の抗がん効果
酒々井 眞澄、礒田 泰彰、深町 勝巳、二口 充、森脇 健太（名市大・院・医・分子毒性）

Japanese Oral Sessions

Room 10 Oct. 4 (Fri.) 10:00-11:00

J16-3 Oncopharmacology (2)
抗がん薬の薬理（2）

Chairperson: Yasutsuna Sasaki (Div. Med. Oncol., Dept. Med., Showa Univ. Sch. Med.)
座長：佐々木 康綱（昭和大学医学部内科学講座腫瘍内科学部門）

J-2040 **Analysis of the single nucleotide polymorphisms of the *DPY* gene that affect adverse events in 5-FU treated patients.**
Masahide Toshima[1], Shinobu Ohnuma[1], Koh MIura[3], Michi Tanaka[4], Hiroaki Musha[1], Sho Haneda[1], Katuyoshi Kudou[1], Atsu Kohyama[1], Munenori Nagao[1], Takeshi Naitou[1], Yu Katayose[2], Chik Shibata[1], Michiaki Unno[2] ([1]Dept. Surg., Tohoku. Univ., Sch. M [2]Dept. Surg., Tohoku. Univ., Sch. Med., [3]Dept. Surg., Miyagi. Can Ctr., [4]Comp. Biol. Res. ctr., AIST)
5-FU投与患者におけるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ遺伝 多型とその表現型の解析
戸嶋 政秀[1]、大沼 忍[1]、三浦 康[3]、田中 道廣[4]、武者 宏昭[1]、羽根 祥[1]、工藤 克昌[1]、神山 篤史[1]、長尾 宗紀[1]、内藤 剛[1]、片寄 友[2]、田 近[1]、海野 倫明[2]（[1]東北大学・医・胃腸外科、[2]東北大学・医・胆膵外科、[3]宮城県立がんセンター・消化器外科、[4]産総研・生命工学センター）

J-2041 **Increased α1 acid glycoprotein binds to paclitaxel and substantially alters its anticancer effects in gastric cancer**
Sachio Fushida[1], Yoshinao Obatake[1], Tomoya Tsukada[1], Jun Kinos Katsunobu Oyama[1], Tomoharu Miyashita[1], Hidehiro Tajima[1], Ninomiya[1], Hirohisa Kitagawa[1], Takashi Fujimura[1], Tetsuo Ot Masakazu Yashiro[2], Kousei Hirakawa[2] ([1]Gastroenterological Surg Kanazawa Univ.,Sch. Med., [2]Oncological Surgery, Osaka city Univ. Med.)
胃癌の進行とともに増加するアルファ1酸性糖蛋白はパクリタキセルと結合し、その抗腫瘍効果を阻害する
伏田 幸夫[1]、大畠 慶直[1]、柄田 智也[1]、木下 淳[1]、尾山 勝信[1]、三知治[1]、田島 秀浩[1]、二宮 致[1]、北川 裕久[1]、藤村 隆[1]、太田 哲生[1]、八代 正和[2]、平川 弘聖[2]（[1]金沢大・医・消化器・乳腺・移植再生[1]、[2]大阪市大・医・腫瘍外科）

J-2042 **Tumor suppression by GSK-3β activator DIF-1 in xenograft cancer model mice by oral administration**
Fumi Takahashi, Toshiyuki Sasaguri (Dept. of Clinical Pharm., Fac of Medical Sciences, Kyushu Univ.)
GSK－3β活性化物質DIF－1の担がんモデルマウスへの経口投与による抗腫瘍効果
高橋 富美、笹栗 俊之（九大院・医・臨床薬理）

J-2043 **Adenine nucleotide translocase-2 is a target protein of apigenin in the enhancement of TRAIL sensitivity**
Masakatsu Oishi[1,2], Yosuke Iizumi[2], Tsuneharu Miki[1], Toshiyuki Sa ([1]Dept. Uro., Kyoto Pref. Univ. Med., [2]Dept. Mol. Target. Cancer. Pr Kyoto Pref. Univ. Med.)
ANT2はアピゲニンによるTRAIL感受性増強の標的タンパク質である
大石 正勝[1,2]、飯泉 陽介[2]、三木 恒治[1]、酒井 敏行[2]（[1]京都府立医大学・医・泌尿器科、[2]京都府立医科大学・医・分子標的癌予防医

J-2044 **DP curcumin analog has both anti-inflammatory and anti-oncogenic activities to prevent gastric carcinogenesis in mi**
Uehara Yoshihiko[2], Kazunori Otsuka[1], Keigo Komine[1], Yoshih Iwabuchi[3], Masanobu Ohshima[4], Hiroyuki Shibata[1] ([1]Dept. C Oncology, Akita Univ., Grad. Sch. Med., [2]Lab. Radiation Biol Tohoku Univ., Grad. Sch. Med., [3]Dept. Organic Chem., Tohoku Un Graduate School Pharm., [4]Dev. Genetics, Cancer Research In Kanazawa Univ.)
ディアリルペンタノイド型クルクミン誘導体による胃がん発癌予防の開発
上原 芳彦[2]、大塚 和令[1]、小峰 啓吾[1]、岩渕 好治[3]、大島 正伸[4]、田 浩行[1]（[1]秋田大学 院医 臨床腫瘍学、[2]東北大学 院医 ゲノ生物学、[3]東北大学・大学院薬学研究科・合成有機化学、[4]金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍遺伝学）

From: **Abstract Registration System** <jca2013@convention.co.jp>
Date: Mon, May 6, 2013 at 7:03 PM
Subject: Abstract Registration [30126]
To: singkome@gmail.com

Abstract Submission Form The 72nd Annual Meeting of Japanese Cancer Association (registration page)

This e-mail message has been sent to confirm your abstract submission. Please note that the text below does not show any image, even if included, and may not properly display the words you have entered. To confirm that your abstract was properly submitted, please go to the "View/Edit/Delete the Submitted Abstract" page online.

Submission No.:30126
First Name_Middle Initial of Presenting Author: Singkome
Last Name of Presenting Author: Tima
Address of Author's Institution: Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 110 Intawaror
oj Rd., Sripoom, Chiang Mai, Thailand.
Zip Code of Author's Institution: 50200
Country: Kingdom of Thailand
Telephone Number of Author's Institution: +66-53-94-9237
Extension Number of Author's Institution:
Fax Number of Author's Institution: +66-53-94-6042
E-mail Address: singkome@gmail.com
Re-enter E-mail Address: singkome@gmail.com
E-mail Address (for Proceedings use): singkome@gmail.com
Name of Author's Institution 1: Fac. of Grad School., CMU
Institution-2: Dept. of Med Tech., CMU
Institution-3: Dept. of Pharm Sci, CMU
Institution Number of Presenting Author: 1
First Name_Middle Initial of Co-author1: Songyot
Last Name of Co-author1: Anuchapreeda
Member's Number1:
Institution Code of Co-author1: 2
First Name_Middle Initial of Co-author2: Chadarat
Last Name of Co-author2: Ampasavate
Member's Number2:
Institution Code of Co-author2: 3
First Name_Middle Initial of Co-author3: Siriporn
Last Name of Co-author3: Okonogi
Member's Number3:
Institution Code of Co-author3: 3

Presentation Style: General Presentation Session- Poster
Application for International Sessions or Symposia: Do not wish to Apply
Choose your preferred session title:
Application for Travel Grant: Wish to Apply
Category1: 16-1.Natural anticancer compounds
Category2: 14-12.hematopoietic malignancy
Title:
Inhibitory Effect of Curcumin on FLT3 expression and Cell Cycle Arrest in FL
T3 Overexpressing EoL-1 Leukemic Cells

Abstract:

Chemotherapy is widely used for leukemia treatment. However, side effects are
main problem for patients. Thus, natural products have been applied to be
an alternative treatment for leukemia. This study, curcumin was investigated
for its inhibitory effects on cell growth and <I>FLT3</I> gene expression i
n FLT3 overexpressing EoL-1 cells. Cells were tested for cytotoxicity, cell
cycle arrest, and inhibitory effects on <I>FLT3</I> gene expression by MTT
assay, flow cytometry, RT-PCR, and Western blotting, respectively. Curcumin
showed the strong cytotoxic effects on EoL-1 cells with IC₅₀ value
of 9.6±0.5 μM and showed its activity on cell cycle arrest at G0/
G1 phase by dose dependent manner. The significant decrease of <I>FLT3</I>
gene expression was found after 5 μM curcumin treatment for 12 hrs. Moreover,
FLT3 mRNA and protein levels were reduced by dose dependent manner. In
conclusion, curcumin inhibits cell growth, cell cycle progression, and <I>FLT
3</I> gene expression in EoL-1. This report is the new finding of curcumin
on its inhibitory effect on <I>FLT3</I> gene expression level. The result of
this study is essential for further investigation on inhibitory mechanisms of
curcumin on <I>FLT3</I> gene expression.

Keyword1: Curcumin
Keyword2: FLT3
Keyword3: EoL-1 cell
Disclosure of Conflict of Interest: No
About a copyright of Proceedings: I agree that the copyright of proceedings belongs to
Japanese Cancer Association.

The body text shown above is not word-wrapped.
Word-wrapping will be done in the Abstract Book.

การนำเสนอผลงานครั้งที่ 3 The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Yokphama, Japan, 25-27 September, 2014.

The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

Title of the Meeting	Deeper insights into cancer biology bringing cures for cancer patients
Theme	The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
Dates	September 25(Thu.) - 27 (Sat.), 2014
Venue	PACIFICO Yokohama 1-1-1 Minato Mirai, Nishi-ku, Yokohama 220-0012, JAPAN
President	Tetsuo Noda The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research
Headquarters	The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research 3-8-31, Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan TEL: +81-3-3520-0111 FAX: +81-3-3520-014
Secretariat	C/O Japan Convention Services, Inc. Daido Seimei Kasumigaseki Bldg. 1-4-2, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, JAPAN TEL: +81-3-3508-1214 FAX: +81-3-3508-1302 E-mail: jca2014@convention.co.jp

ページトップ へ

Copyright © 2014 The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. All Rights Reserved.

Curcumin suppresses *WT1* gene promoter activity and gene expression by blocking co-activation of WT1 and AP1 in K562 cells

Songyot Anuchapreeda[a], Methee Rungrojsakul[b], Sheryl R. Krig[c], Nucharee Yokdang[c], Sarawut Taowtep[a], Colleen A. Sweeney[c]

[a] *Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand*

[b] *Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand*

c UC Davis Cancer Center, 4645 2nd Avenue, Sacramento, CA 95817, USA

ABSTRACT

Curcumin revealed the new knowledge-intensive mechanisms on *WT1* gene expression by blocking the WT1 signaling pathway *via* PKC_{α} and JNK. However, there is no report which JNK-protein related transcription factor (WT1 or AP1) would bind and stimulate *WT1* gene promoter in leukemic cells. The non-cytotoxic doses (IC_{20} values) of curcumin, tanshinone IIA (AP1-DNA binding inhibitor), and SP600125 (JNK inhibitor) were used to examine their effects on *WT1* gene expression. The results showed that curcumin, Tanshinone IIA, and SP600125 could inhibit WT1 protein expression in a dose dependent manner (5-15 μM) at 24 h by Western blotting. The curcumin inhibited the DNA-WT1 and -AP1 binding by 34 and 54%, respectively by ChIP assay. The WT1 promoter activities were decreased after curcumin, tanshinone IIA, and SP600126 treatments by 39.28, 30.55, and 79.05%, respectively by luciferase activity assay. Furthermore, AP1 related *WT1* gene expression was confirmed its activity by c-Jun knocking down. The levels of WT1 and c-Jun proteins were decreased by 32.9 and 44.27%, respectively. In summary, AP1 plays a key role in co-activating with WT1 to regulate *WT1* gene expression in leukemic K562 cells.

[JCA2014] Notice Regarding Presentation at the 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA) 30153

JCA2014 <pro-jca2014@convention.co.jp> Fri, Jul 25, 2014 at 11:55 AM
Reply-To: pro-jca2014@convention.co.jp
To: sanuchapreeda@gmail.com

Dear Dr. Songyot Anuchapreeda [30153],

Thank you very much for your abstract submission to 73rd Annual Meeting of the JCA. It is our pleasure to inform you that your abstract has been accepted by the Program Committee of the meeting. We would like to inform and ask you to present in the Poster Session. We appreciate your kind understanding.

Your presentation is scheduled in the program is as follows. Again, we appreciate your contribution to the 73rd Annual Meeting of JCA and are looking forward to seeing you in Yokohama, Japan.

Abstract Title: Curcumin suppresses <I>WT1</I> gene promoter activity and expression by blocking co-activation of WT1 and AP1 in K562 cells
Abstract Registration No.:30153
Your Abstract No.: P-1071

~ Presentation Information ~
Presentation Style: Poster Session
Session Title: P5-2 Signal transduction (2)
Session Date & Time: Sep. 25(Thu.) 17:45-18:30
Venue : Room P

For details, refer to the URL below;
http://www2.convention.co.jp/jca2014/english/

Best Regards,

Secretariat of the 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association:
Japan Convention Services, Inc.
<pro-jca2014@convention.co.jp>

JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

Article

pubs.acs.org/jnp

Inhibitory Effect of Turmeric Curcuminoids on FLT3 Expression and Cell Cycle Arrest in the FLT3-Overexpressing EoL-1 Leukemic Cell Line

Singkome Tima,[†] Hideki Ichikawa,[‡] Chadarat Ampasavate,[§] Siriporn Okonogi,*[,§,∥] and Songyot Anuchapreeda*[,⊥,∥]

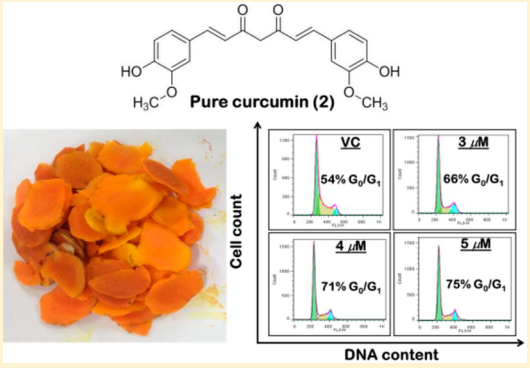
[†]Nanoscience and Nanotechnology Program, Faculty of Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[‡]Faculty of Pharmaceutical Science and Cooperative Research Center of Life Sciences, Kobe Gakuin University, Minatojima 1-1-3, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan

[§]Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[⊥]Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

ABSTRACT: Leukemia is a hematologic malignancy with a frequent incidence and high mortality rate. Previous studies have shown that the *FLT3* gene is overexpressed in leukemic blast cells, especially in acute myeloid leukemia. In this study, a commercially available curcuminoid mixture (**1**), pure curcumin (**2**), pure demethoxycurcumin (**3**), and pure bisdemethoxycurcumin (**4**) were investigated for their inhibitory effects on cell growth, FLT3 expression, and cell cycle progression in an FLT3-overexpressing EoL-1 leukemic cell line using an MTT assay, Western blotting, and flow cytometry, respectively. The mixture (**1**) and compounds **2**−**4** demonstrated cytotoxic effects with IC_{50} values ranging from 6.5 to 22.5 μM. A significant decrease in FLT3 protein levels was found after curcuminoid treatment with IC_{20} doses, especially with mixture **1** and compound **2**. In addition, mixture **1** and curcumin (**2**) showed activity on cell cycle arrest at the G_0/G_1 phase and decreased the FLT3 and STAT5A protein levels in a dose-dependent manner. Compound **2** demonstrated the greatest potential for inhibiting cell growth, cell cycle progression, and FLT3 expression in EoL-1 cells. This investigation has provided new findings regarding the effect of turmeric curcuminoids on FLT3 expression in leukemic cells.



Leukemia is a hematopoietic disorder that is frequently associated with genetic instability characterized by a diversity of chromosomal and molecular changes. It is now becoming evident that specific genetic mutations exist in a large proportion of acute myeloid leukemia (AML) patients, and these are further refining prognosis and presenting novel treatment opportunities. FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) is one of the most common leukemia diagnostic markers, especially in AML patients. It is a member of the type III receptor tyrosine kinase (RTK) family and is expressed at high levels in a spectrum of hematologic malignancies, including 70% to 100% of AML, B-precursor cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), and blast crisis chronic myelogenous leukemia (CML) cases.[1] The presence of FLT3-overexpressing blast cells tends to indicate a poor prognosis in leukemia pateints.[2] Interaction of FLT3 with its ligand (FLT3-L or FL) promotes the cell survival and proliferation of leukemic blast cells.[3] FLT3 causes activation of cell signal transduction networks, including phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), MAP kinase, and Jak-STAT pathways. Activation of these pathways is critical for leukemic cell proliferation and survival.[4]

To date, chemotherapy has been generally effective and has been used widely for the treatment of leukemia. However, there exists many unwanted side effects of chemotherapy after treatment. In recent years, many dietary factors and natural products are being evaluated as potential chemopreventive or therapeutic agents for cancer treatment. Due to their biological activities and lack of toxicity in animal models, natural compounds have been used as alternative medicines for the treatment of leukemia.

Turmeric curcuminoids are well-known active major components present in the rhizome of turmeric (*Curcuma longa* L.; Zingiberaceae). These curcuminoids are composed of three distinct components: curcumin (**2**), demethoxycurcumin (**3**), and bisdemethoxycurcumin (**4**). Among these three components, pure curcumin (**2**) is known to be the major component of a commercially available curcuminoid mixture. Curcuminoids are being clinically evaluated as chemopreventive agents for major cancers, including breast, prostate, lung, stomach, duodenal, and colon cancers, as well as leukemias.[5] It was reported that the

Received: December 10, 2013

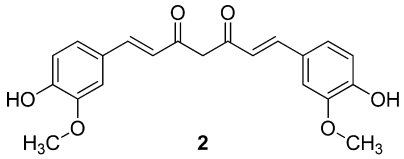
ACS Publications © XXXX American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy

dx.doi.org/10.1021/np401028h | *J. Nat. Prod.* XXXX, XXX, XXX−XXX

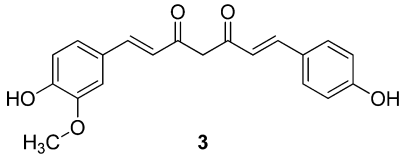
dietary curcuminoids induce cell apoptosis in the human leukemia HL-60 cell line at a low concentration of 3.5 μg/mL.[6] Also, curcuminoid treatments have been shown to be cytotoxic to the K562, U937, and HL-60 leukemic cell lines.[7,8] In addition, it has been found that curcumin exhibits an inhibitory effect on cell proliferation and the expression of STAT5 mRNA in primary CML cells.[9] Curcuminoids have strong inhibitory effects on both patient leukemic cells and leukemic cell lines.[7,10] Moreover, pure curcumin was reported to decrease *WT1* gene expression and cell proliferation in K562 and Molt4 cell lines.[11]

Several medicinal plant extracts have been studied for their effects on FLT3 leukemic cells. Mangiferin, an active xanthone from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*, was found to inhibit the activity of wild-type and mutant FLT3 tyrosine kinase.[12] Additionally, several flavonoids, especially luteolin, demonstrated antiproliferative activity on FLT3 mutant in MV4-11 cells and were observed to be acting as potent FLT3 enzyme inhibitors.[13] Several green tea catechin derivatives were also found to exhibit inhibitory effects on FLT3 expression cell lines carrying FLT3 mutations.[14] However, to date, there has been no publication that supports the effect of curcuminoids on FLT3-overexpressing leukemic cell lines.

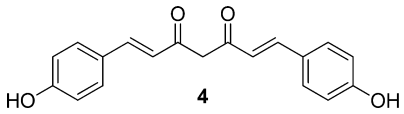
The present study investigated the cytotoxic effects of turmeric curcuminoids on cell growth, FLT3 expression, and cell cycle arrest in an FLT3-overexpressing eosinophilic leukemic cell line (EoL-1).



2



3



4

RESULTS AND DISCUSSION

In the present investigation, it was demonstrated that pure curcumin (**2**) exhibits a strong inhibitory effect on EoL-1 cells, with an IC_{50} value of 6.7 ± 0.5 μM, while the IC_{50} values of a curcuminoid mixture (**1**), pure demethoxycurcumin (**3**), and pure bisdemethoxycurcumin (**4**) were 9.6 ± 0.5, 15.6 ± 1.9, and 22.3 ± 0.5 μM, respectively (Figure 1). The EoL-1 cells are more sensitive to pure curcumin (**2**) than other leukemic cell lines (K562, U937, HL-60, and Molt4 cells).[7,11] This finding indicates that pure curcumin (**2**) may have potent antileukemic

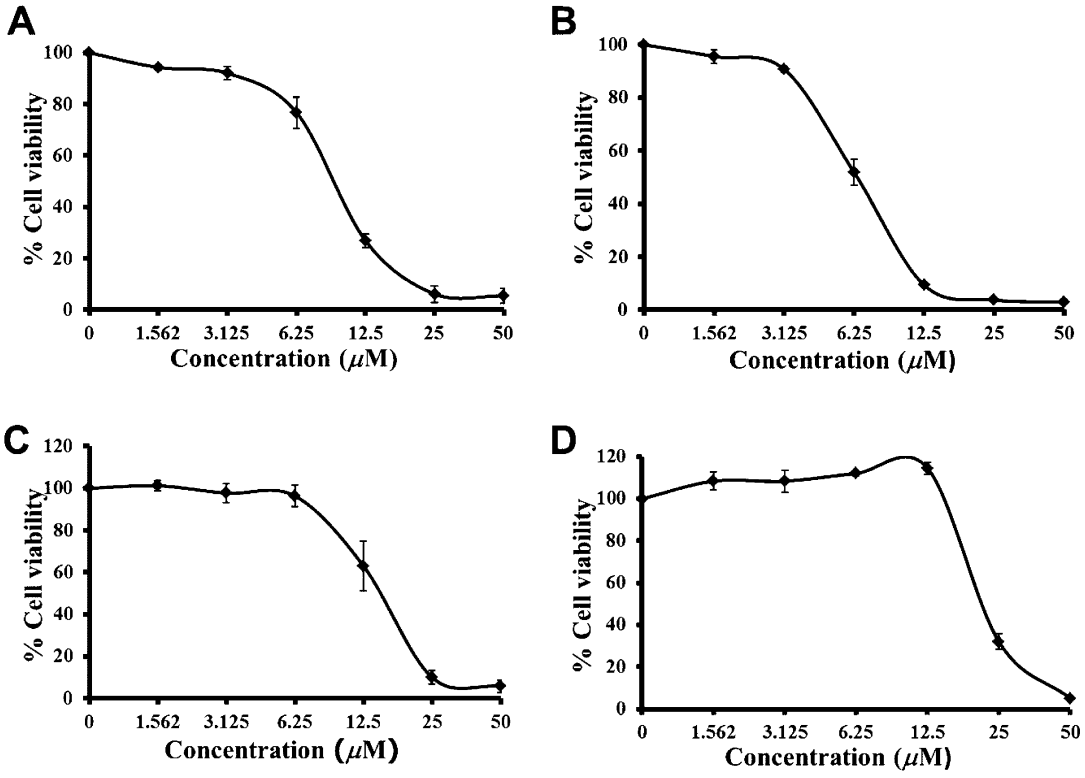


Figure 1. Dose−response curves of turmeric curcuminoids on EoL-1 cells. Cells (5×10^4 cells/well) were grown in the presence of 0.1% DMSO (vehicle control) or various concentrations of turmeric curcuminoids, including (A) a commercially available curcuminoid mixture (**1**), (B) pure curcumin (**2**), (C) pure demethoxycurcumin (**3**), and (D) pure bisdemethoxycurcumin (**4**), for 48 h. The numbers of viable cells were determined using the MTT assay and demonstrated as a percentage of vehicle control. Each point represents the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate.

dx.doi.org/10.1021/np401028h | *J. Nat. Prod.* XXXX, XXX, XXX−XXX

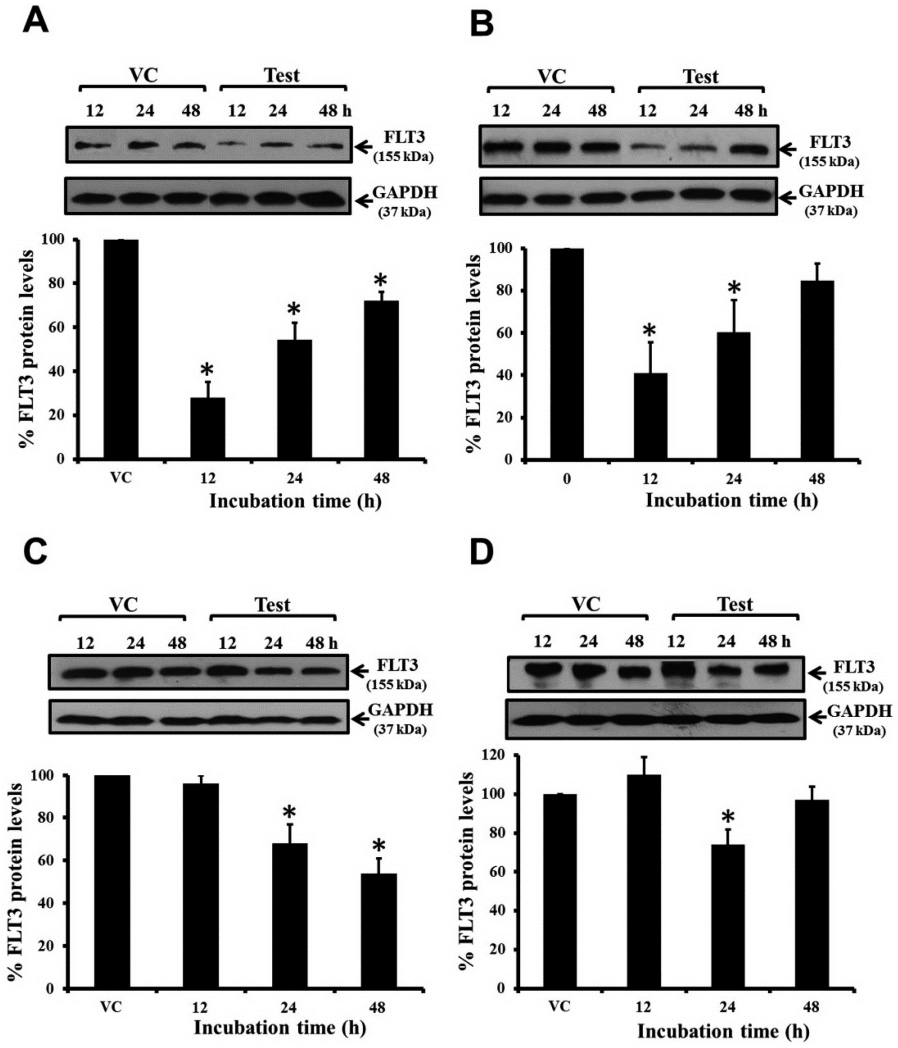


Figure 2. Inhibitory effects of curcuminoids on FLT3 protein levels in EoL-1 cells. Cells were incubated with noncytotoxic doses (IC_{20} values) of (A) a commercially available curcuminoid mixture (**1**), (B) pure curcumin (**2**), (C) pure demethoxycurcumin (**3**), and (D) pure bisdemethoxycurcumin (**4**) for 12, 24, and 48 h. The total proteins of control (VC) and the treated cells were probed using anti-FLT3 antibody and anti-GAPDH antibody (housekeeping control). The bands were quantified and the expression levels of FLT3 were normalized using GAPDH. The data are the means ± SEM of three independent experiments. Asterisks (*) denote significant difference from the control group ($p < 0.05$).

and antiproliferative properties against FLT3-expressing leukemic cells. The inhibitory mechanism of pure curcumin (**2**) in terms of its effects on cell signaling pathways is still unclear.

FLT3 has been defined as a type III class of receptor tyrosine kinases, and it plays an important role in leukemogenesis. Many FLT3 inhibitors, including PKC412, AC220, CEP-701, and AR200, have been found to decrease the levels of phosphorylated FLT3 protein.[15−17] Previous findings have supported the theory that most current FLT3 inhibitors are tyrosine kinase inhibitors. This study revealed that the curcuminoid mixture (**1**) and compounds **2**−**4** had different inhibitory effects on FLT3 protein levels. The levels of FLT3 protein (normalized to GAPDH) decreased after treatment with 5 μM curcuminoid mixture (**1**) by 72%, 46%, and 28% (Figure 2A), 4 μM pure curcumin (**2**) by 58%, 33%, and 12% (Figure 2B), and 10 μM pure demethoxycurcumin (**3**) by 4%, 32%, and 46% (Figure 2C) at 12, 24, and 48 h, respectively. Pure bisdemethoxycurcumin (**4**) demonstrated a minimum inhibitory effect when compared to other compounds. The FLT3 protein levels were decreased by 26% and 3% after treatment with 15 μM pure bisdemethoxycurcumin (**4**) for 24 and 48 h, respectively (Figure 2D). Both the curcuminoid mixture (**1**), which is 80% pure curcumin, and the pure curcumin (**2**) exhibited the strongest inhibitory effects on FLT3 protein at 12 h after treatment. Thus, the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) were selected for further experiments. The EoL-1 cells were treated with various concentrations of the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) for 12 h. The levels of the FLT3 protein were found to significantly decrease by 34%, 64%, and 90% after treatment with 3, 5, and 7 μM curcuminoid mixture (**1**), respectively (Figure 3A), and by 17%, 37%, and 70% after treatment with 3, 4, and 5 μM pure curcumin (**2**), respectively (Figure 3B). Because STAT5A signaling leads to FLT3 activation, the effects of both the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) on STAT5A were examined. The STAT5A protein levels were found to have significantly decreased by 16%, 31%, and 70% after treatment with 3, 5, and 7 μM curcuminoid mixture (**1**), respectively (Figure 3A), and by 13%, 44%, and 82% after treatment with 3, 4, and 5 μM pure curcumin (**2**), respectively (Figure 3B). The inhibitory effect of the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) on the FLT3 and STAT5A protein levels is seen to have increased in a dose-dependent manner. These findings are

dx.doi.org/10.1021/np401028h | J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX−XXX

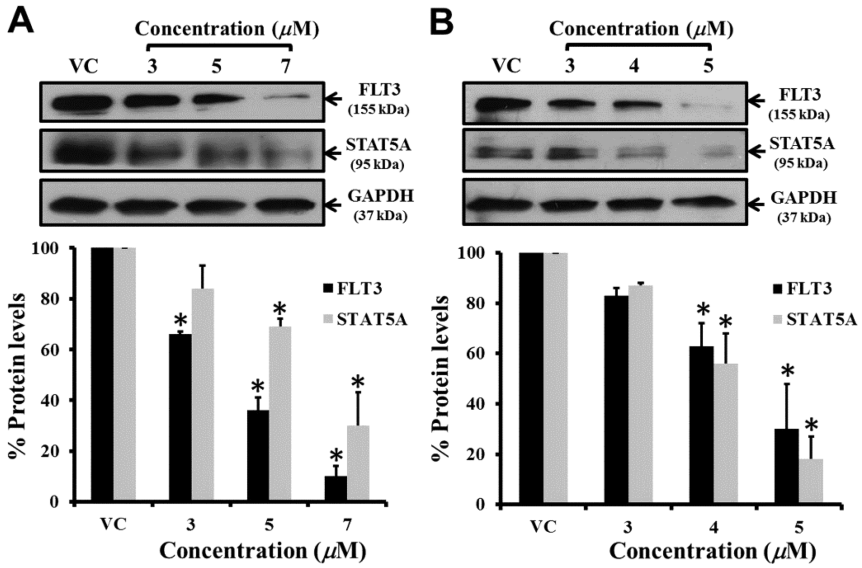


Figure 3. A commercially available curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) inhibited FLT3 and STAT5A protein expression in EoL-1 cells in a dose-dependent manner. The cells were incubated with (A) 3, 5, and 7 μM curcuminoid mixture (**1**) and (B) 3, 4, and 5 μM pure curcumin (**2**) for 12 h. The total proteins of the control (VC) and the treated cells were probed using anti-FLT3 antibody, anti-STAT5A, and anti-GAPDH antibody (housekeeping control). The bands were quantified, and the expression levels of FLT3 and STAT5A were normalized using GAPDH. The data are the means ± SEM of three independent experiments. Asterisks (*) denote significant difference from each control group ($p < 0.05$).

the first reports about the inhibitory effects of curcuminoids on the FLT3 protein in FLT3-overexpressing EoL-1 cells. However, it was observed that both pure curcumin (**2**) and the curcuminoid mixture (**1**) exhibit stronger inhibitory effects on FLT3 protein levels compared to pure demethoxycurcumin (**3**) and bisdemethoxycurcumin (**4**). Moreover, FLT3 and STAT5A were inhibited in a dose-dependent manner after 12 h of treatment with pure curcumin (**2**) and the curcuminoid mixture (**1**). Blasius et al. reported that 20 μM curcumin decreased nuclear STAT3, STAT5A, and STAT5B expression levels in K562 cells after 48 h of treatment.[18] However, the inhibitory mechanism of pure curcumin (**2**) on the STAT5A protein in the FLT3-overexpressing EoL-1 cells may be different from that on K562 (non-FLT3-overexpressing cells). Therefore, the mechanism of action of pure curcumin (**2**) on the STAT5A protein in the FLT3-overexpressing cells will need to be further investigated.

In addition, the present findings were related to the decrease in the cell proliferation rates of EoL-1 cells after treatment with the various concentrations of the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) for 12 h. The number of EoL-1 cells after the treatment was determined using the trypan blue exclusion assay. The results showed that the proliferation rates of the EoL-1 cells had gradually decreased by 30%, 45%, and 50% after the treatment with 3, 5, and 7 μM curcuminoid mixture (**1**), respectively (Figure 4A), and by 17%, 25%, and 58% after treatment with 3, 4, and 5 μM pure curcumin (**2**), respectively (Figure 4B), when compared to the vehicle control. The decrease in the proliferation rate of the EoL-1 cells after curcuminoid treatments may involve the FLT3 via the STAT5A signaling pathway. The inhibitory effect of curcuminoids on both FLT3 and STAT5A was determined by Western blotting. The results from this study demonstrate that pure curcumin (**2**) is an active compound that plays a major role in the reduction of FLT3 protein levels. The direct effect of pure curcumin (**2**) on the FLT3 protein levels in leukemic cells demonstrates a new mode of anticancer action of pure curcumin (**2**). However, an exact mechanism as regards the

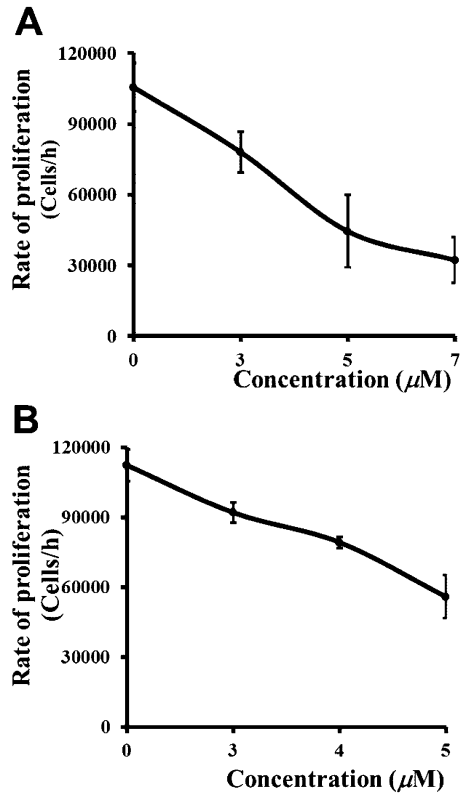


Figure 4. A commercially available curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) decreased the proliferation rates of the EoL-1 cells in a dose-dependent manner. The proliferation rates of the EoL-1 cells were examined after 12 h of treatment with (A) 3, 5, and 7 μM curcuminoid mixture (**1**) and (B) 3, 4, and 5 μM pure curcumin (**2**) using a trypan blue exclusion assay. The slope, or the cell growth rate, at each concentration was determined from the plot of incubation time and cell number. Consequently, the rates of cell proliferation (cells/h) at different concentrations of the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) were plotted and compared to the normal growth rate, which was obtained from the control group.

dx.doi.org/10.1021/np401028h | *J. Nat. Prod.* XXXX, XXX, XXX−XXX

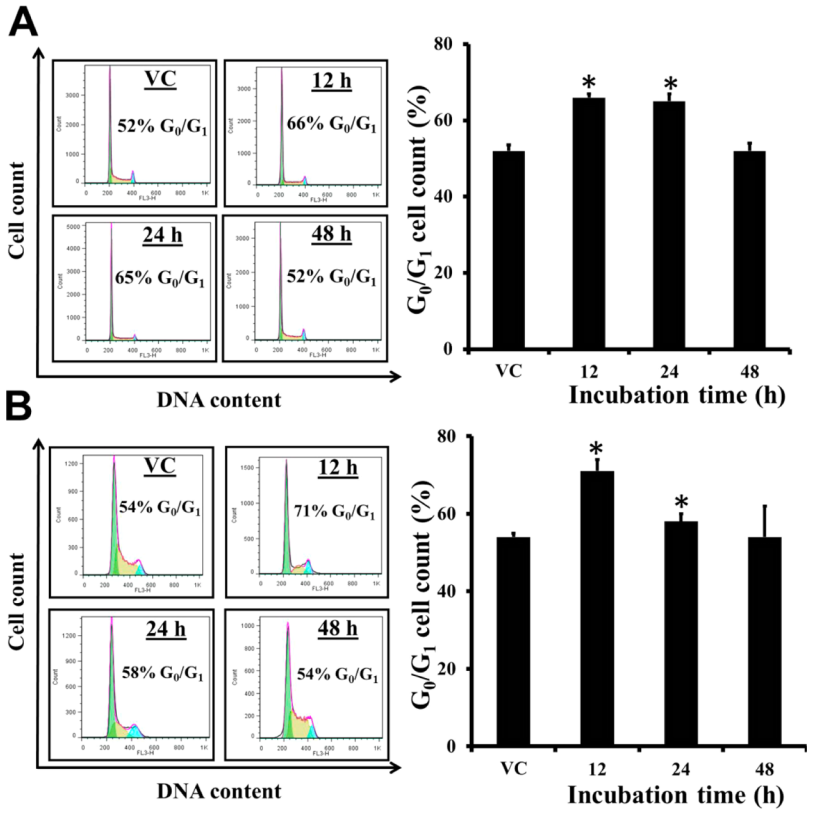


Figure 5. A commercially available curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) induce G_0/G_1 cell cycle arrest of EoL-1 cells. The cells were cultured with noncytotoxic doses of curcuminoid mixture (**1**) and compound **2** for 12, 24, and 48 h, and flow cytometry was performed for cell cycle analysis. The cell cycle histograms of the EoL-1 cells after treatment with (A) curcuminoid mixture (**1**) and (B) compound **2** are presented and compared to the vehicle control group (VC). The percentages of cells in the G_0/G_1 phase are represented as means ± SD of three independent experiments. Asterisks (*) denote significant difference from the control group ($p < 0.05$).

action of pure curcumin (**2**) on FLT3 expression will have to be further investigated.

Many compounds have been investigated in order to determine some of the most potent and specific FLT3 inhibitors. Sorafenib and SU11652, potent FLT3 inhibitors, induced a dose-dependent cell cycle arrest with an increase in the percentage of MV4-11 cells in the G_0/G_1 phase.[19,20] Ki11502, a novel multitargeted RTKs inhibitor, inhibited the growth of EoL-1 cells and increased the number of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle after 24 h of treatment.[21] In this recent study, noncytotoxic doses of the curcuminoid mixture (6 μM) and pure curcumin (4 μM) were used to evaluate their activity on cell cycle progression. It was found that the EoL-1 cells were arrested in the G_0/G_1 phase after treatment with the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) for 12 and 24 h. The percentages of cells in the G_0/G_1 phase after 12 and 24 h of treatment were seen to have significantly increased when compared to the control group. However, there was no significant difference in the number of G_0/G_1 cells at 48 h of treatment when compared to the control group (Figure 5). The inhibitory effect of pure curcumin manifested as cell cycle arrest in EoL-1 cells, present for a short time period of treatment, may have been due to the stability of curcumin.[22] In addition, the percentages of treated cells in the G_0/G_1 phase increased gradually after 12 h of treatment with increasing concentrations (3−7 μM) of the curcuminoid mixture (**1**) and 3−5 μM pure curcumin (**2**) (Figure 6). This finding suggests that the activity of the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) increased in a dose-dependent manner.

In conclusion, the present investigation has demonstrated a new activity of turmeric curcuminoids and the major compound, pure curcumin (**2**), on FLT3 expression in FLT3-overexpressing leukemic cells. The curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) demonstrated inhibitory effects on cell growth, cell cycle progression, and FLT3 protein expression in EoL-1 cells. The findings obtained suggest that pure curcumin (**2**) may be useful in treating leukemia, especially in treating patients afflicted with FLT3-overexpressing leukemia. However, further experiments need to be conducted to investigate the exact mechanism of action of pure curcumin (**2**) and to improve its effectiveness as regards the outcomes of its treatment of leukemia.

EXPERIMENTAL SECTION

Test Compounds. A curcuminoid mixture (**1**), representing about 80% pure curcumin (**2**), 15% pure demethoxycurcumin (**3**), and 5% pure bisdemethoxycurcumin (**4**), was a commercial grade turmeric curcuminoid mixture (product no. C1386) obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Pure curcumin (**2**, product no. 02643-14), pure demethoxycurcumin (**3**, product no. 02644-04), and pure bisdemethoxycurcumin (**4**, product no. 02645-94) were purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). The purity of compounds **2**−**4** used in this study was about 98% by HPLC.

Cells and Cell Culture Conditions. The eosinophilic leukemic cell line (EoL-1), a model of FLT3-overexpressing leukemic cells, was purchased from RIKEN BRC Cell Bank (Ibaraki, Japan). The cell line was cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum, 1 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin (Invitrogen Life, Carlsbad, CA, USA).

MTT Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity of curcuminoids was evaluated using the MTT assay. The cells (5.0×10^4 cells/well) were

dx.doi.org/10.1021/np401028h | J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX−XXX

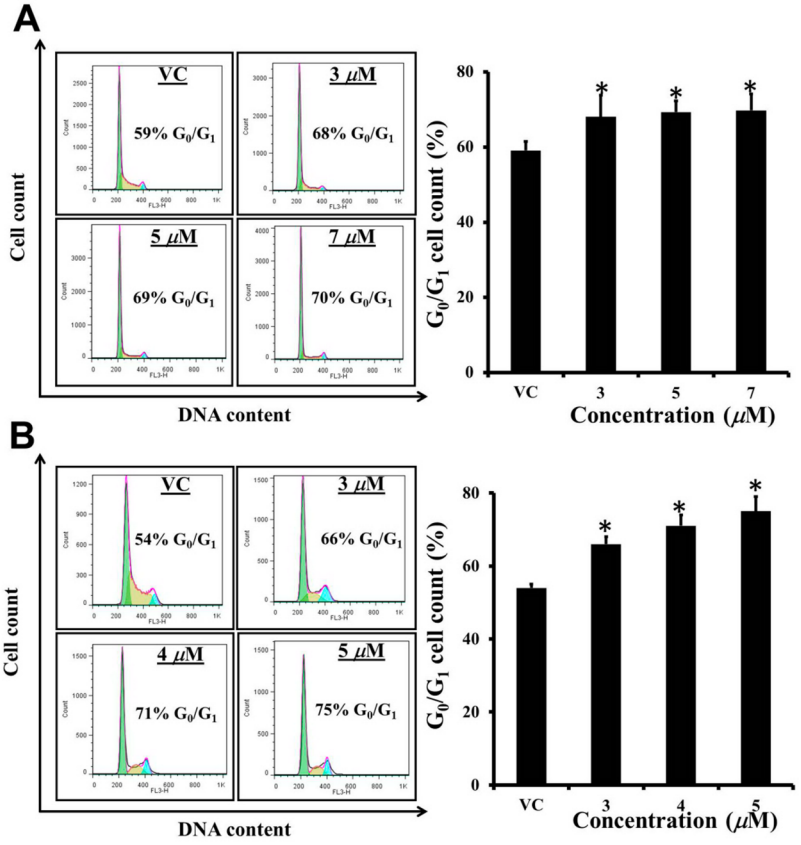


Figure 6. A commercially available curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) induce G_0/G_1 cell cycle arrest of EoL-1 cells in a dose-dependent manner. Cells were cultured with various noncytotoxic doses of curcuminoid mixture (**1**) (3−7 μM) and pure compound **2** (3−5 μM) for 12 h, and flow cytometry was performed for cell cycle analysis. The cell cycle histograms of the EoL-1 cells after treatment with (A) curcuminoid mixture (**1**) and (B) compound **2** are presented and compared to the vehicle control group (VC). The percentages of cells in the G_0/G_1 phase are represented as means ± SD of three independent experiments. Asterisks (*) denote significant difference from the control group ($p < 0.05$).

cultured in 96-well plates containing 100 μL of medium prior to the treatment with the extract at 37 °C for 24 h. After this, 100 μL of the fresh medium containing curcuminoids at various concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, and 50 μM) was added to each well and incubated for another 48 h. After the removal of the 100 μL of medium, 15 μL of MTT dye solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 5 mg/mL was added, and the plate was incubated at 37 °C for 4 h. Then, 200 μL of DMSO was added to each well and mixed thoroughly to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured using an AccuReader microplate reader (Metertech-Inc., Taipei, Taiwan) at 578 nm with a reference wavelength of 630 nm. The metabolic activity of each well was determined and compared to those of the untreated cells (vehicle control). High optical density readings corresponded to a high intensity of the dye color, that is, to a large number of viable cells able to metabolize MTT salts. The average cell survival obtained from triplicate determinations at each concentration was plotted as a dose−response curve. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of the curcuminoids was determined as the lowest concentration that reduced cell growth by 50% in the treated culture, compared to untreated culture or vehicle control culture. The IC_{50} values were determined as means ± standard errors of means (SEM) and compared for their activities.

Protein Extraction and Western Blotting. The total protein extracts from the treated cells were prepared using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, and protease inhibitor cocktail). The protein concentration was measured by the Folin-Lowry method. The proteins were separated by 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The analysis for FLT3 and STAT5A protein detection was performed using primary rabbit polyclonal anti-FLT3 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) and rabbit polyclonal anti-STAT5A (Merck Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) in the ratio 1:500, followed by a treatment with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA) in a 1:15000 dilution. The GAPDH protein was probed with primary rabbit polyclonal anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) in the ratio 1:1000, followed by treatment with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG in a 1:20000 dilution. The proteins were visualized using the Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore Corporation) and quantified by ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Cell Cycle Analysis. Cell cycle analysis was quantified by flow cytometry using propidium iodide (PI), which represents the content of nuclear DNA. EoL-1 cells (5.0×10^5 cells/mL) were cultured in complete RPMI-1640 medium with or without noncytotoxic concentrations (IC_{20}) of the curcuminoid mixture (**1**) and pure curcumin (**2**) for various incubation times (12 to 48 h). After treatment, cells were washed twice with ice-cold PBS and prepared as a single-cell suspension. Then, the cells were fixed with ice-cold 70% ethanol for 30 min and harvested by centrifugation. The cell pellets were then washed with ice-cold PBS and stained with PI solution (0.1% Triton X-100, 8 μg/mL RNase A, 2 mM EDTA, and 20 μg/mL PI) in the dark at 4 °C. Thereafter, the red fluorescence was measured on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A minimum of 25000 events were collected per sample. The data were analyzed using FlowJo 7.6.5 software.

Statistical Analysis. All data were expressed as the means ± standard deviation (SD) or means ± SEM from triplicate samples of three independent experiments. The statistical differences between the means were determined using one-way ANOVA. The differences were considered significant when the probability value obtained was found to be less than 0.05 ($p < 0.05$).

dx.doi.org/10.1021/np401028h | J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX−XXX

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*(S. Okonogi) Tel: +66-53-94-1512. Fax: +66-53-22-2741. E-mail: sirioko@chiangmai.ac.th.

*(S. Anuchapreeda) Tel: +66-53-94-9237. Fax: +66-53-94-6042. E-mail: songyot.anuch@cmu.ac.th.

Author Contributions

‖S. Okonogi and S. Anuchapreeda contributed equally to this study.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for grants received from the Thailand Research Fund (TRF), TRF through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of Thailand (Grant No. PHD/0042/2555), and the Graduate School, Chiang Mai University.

REFERENCES

(1) Rosnet, O.; Bühring, H. J.; Marchetto, S.; Rappold, I.; Lavagna, C.; Sainty, D.; Arnoulet, C.; Chabannon, C.; Kanz, L.; Hannum, C.; Birnbaum, D. *Leukemia* **1996**, *10*, 238−248.

(2) Ozeki, K.; Kiyoi, H.; Hirose, Y.; Iwai, H.; Ninomiya, M.; Kodera, Y.; Miyawaki, S.; Kuriyama, K.; Shimazaki, C.; Akiyama, H.; Nishimura, M.; Motoji, T.; Shinagawa, K.; Takeshita, A.; Ueda, R.; Ohno, R.; Emi, N.; Naoe, T. *Blood* **2003**, *103*, 1901−1908.

(3) Zheng, R.; Levis, M.; Piloto, O.; Brown, P.; Baldwin, B. R.; Gorin, N. C.; Beran, M.; Zhu, Z.; Ludwiq, D.; Hicklin, D.; Witte, L.; Li, Y.; Small, D. *Blood* **2004**, *103*, 267−274.

(4) Grafone, T.; Palmisano, M.; Nicci, C.; Storti, S. *Oncol. Rev.* **2012**, *6*, e8.

(5) Duvoix, A.; Blasius, R.; Delhalle, S.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Hennry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. *Cancer Lett.* **2005**, *223*, 181−190.

(6) Kuo, M. L.; Huang, T. S.; Lin, J. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1317*, 95−100.

(7) Anuchapreeda, S.; Sadjapong, W.; Duangrat, C.; Limtrakul, P. *Bull. Chiang Mai Assoc. Med. Sci.* **2006**, *39*, 60−71.

(8) Duvoix, A.; Morceau, F.; Schnekenburger, M.; Delhalle, S.; Galteau, M. M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, *1010*, 389−392.

(9) Chen, W. H.; Chen, Y.; Cui, G. H.; Gu, J. X.; Hu, D.; Chen, W. K.; Li, X. G. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2004**, *12*, 572−576.

(10) Anuchapreeda, S.; Limtrakul, P.; Thanarattanakorn, P.; Sittipreechacharn, S.; Chanarat, P. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 80−87.

(11) Anuchapreeda, S.; Tima, S.; Duangrat, C.; Limtrakul, P. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *62*, 585−594.

(12) Han, S. Y.; Chin, Y. W. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 445−448.

(13) Chin, Y. W.; Kong, J. Y.; Han, S. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1768−1770.

(14) Ly, B. T.; Chi, H. T.; Yamagishi, M.; Kano, Y.; Hara, Y.; Nakano, K.; Sato, Y.; Watanabe, T. *PLoS One* **2013**, *8*, e66378.

(15) Weisberg, E.; Boulton, C.; Kelly, L. M.; Manley, P.; Fabbro, D.; Meyer, T.; Gilliland, D. G.; Griffin, J. D. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 433−443.

(16) Zarrinkar, P. P.; Gunawardane, R. N.; Cramer, M. D.; Gardner, M. F.; Brigham, D.; Belli, B.; Karaman, M. W.; Pratz, K. W.; Pallares, G.; Chao, Q.; Sprankle, K. G.; Patel, H. K.; Levis, M.; Armstrong, R. C.; James, J.; Bhagwat, S. S. *Blood* **2009**, *114*, 2984−2992.

(17) Fathi, A. T.; Arowojolu, O.; Swinnen, I.; Sato, T.; Rajkhowa, T.; Small, D.; Marmsater, F.; Robinson, J. E.; Gross, S. D.; Martinson, M.; Allen, S.; Kallan, N. C.; Levis, M. *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 224−231.

(18) Blasius, R.; Reuter, S.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 1547−1554.

(19) Auclair, D.; Miller, D.; Yatsula, V.; Pickett, W.; Carter, C.; Chang, Y.; Zhang, X.; Wilkie, D.; Burd, A.; Shi, H.; Rocks, S.; Gedrich, R.; Abriola, L.; Vasavada, H.; Lynch, M.; Dumas, J.; Trail, P. A.; Wilhelm, S. M. *Leukemia* **2007**, *21*, 439−445.

(20) Guo, Y.; Chen, Y.; Xu, X.; Fu, X.; Zhao, Z. J. *J. Hematol. Oncol.* **2012**, *5*, 72.

(21) Nishioka, C.; Ikezoe, T.; Yang, J.; Miwa, A.; Tasaka, T.; Kuwayama, Y.; Togitani, K.; Koeffler, H. P.; Yokoyama, A. *Blood* **2008**, *111*, 5086−5092.

(22) Wang, Y. J.; Pan, M. H.; Cheng, A. L.; Lin, L. I.; Ho, Y. S.; Hsieh, C. Y.; Lin, J. K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1977**, *15*, 1867−1876.

This article was downloaded by: [Chiang Mai University]
On: 09 March 2015, At: 03:25
Publisher: Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK

CrossMark

Click for updates

Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20

Inhibitory effect of mammea E/BB from Mammea siamensis seed extract on Wilms' tumour 1 protein expression in a K562 leukaemic cell line

Methee Rungrojsakul[a], Aroonchai Saiai[b], Chadarat Ampasavate[a], Songyot Anuchapreeda[c] & Siriporn Okonogi[a]

[a] Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai50200, Thailand

[b] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[c] Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Published online: 04 Mar 2015.

To cite this article: Methee Rungrojsakul, Aroonchai Saiai, Chadarat Ampasavate, Songyot Anuchapreeda & Siriporn Okonogi (2015): Inhibitory effect of mammea E/BB from Mammea siamensis seed extract on Wilms' tumour 1 protein expression in a K562 leukaemic cell line, Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, DOI: 10.1080/14786419.2015.1017491

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1017491

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions

Downloaded by [Chiang Mai University] at 03:25 09 March 2015

Natural Product Research, 2015
http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1017491

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Downloaded by [Chiang Mai University] at 03:25 09 March 2015

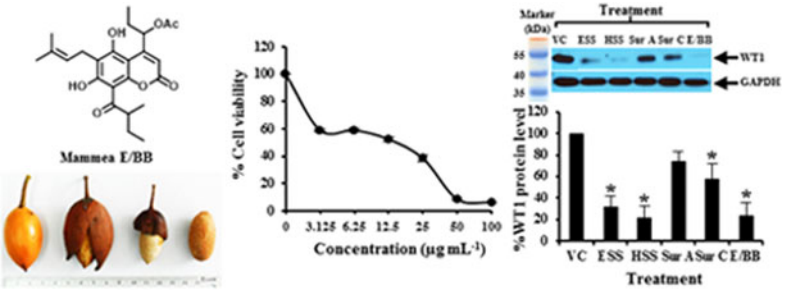
SHORT COMMUNICATION

Inhibitory effect of mammea E/BB from *Mammea siamensis* seed extract on Wilms' tumour 1 protein expression in a K562 leukaemic cell line

Methee Rungrojsakul[a], Aroonchai Saiai[b], Chadarat Ampasavate[a], Songyot Anuchapreeda[c]* and Siriporn Okonogi[a]*

[a]*Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand;* [b]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand;* [c]*Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

(*Received 5 December 2014; final version received 5 February 2015*)



Mammea siamensis is used in traditional Thai medicine. This study was designed to extract and isolate an active compound from the *M. siamensis* seeds and to investigate its activity on Wilms' tumour 1 (WT1) protein expression in K562 cells. WT1 is a transcription factor that stimulates cell proliferation. The ethanol saraphi seed (ESS) extract was fractionated using *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water to obtain *n*-hexane saraphi seed (HSS), ethyl acetate saraphi seed (EASS), *n*-butanol saraphi seed (BSS), and water saraphi seed (WSS) extracts, respectively. The ESS, HSS and EASS extracts had strong cytotoxic effects on K562 cells in the MTT assay. All three fractions decreased WT1 protein levels and decreased total cell numbers. The HSS extract decreased the WT1 protein levels in a time- and dose-dependent manner. HPLC and NMR analyses indicated that the active compound of HSS was mammea E/BB. *M. siamensis* seeds are thus identified as a promising source of bioactive compounds for potential inhibition of WT1 protein expression.

Keywords: *Mammea siamensis*; mammea E/BB; Wilms' tumour 1; leukaemia; K562

Abbreviations: WT1, Wilms' tumour 1; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; BSS, *n*-butanol saraphi seed; EASS, ethyl acetate saraphi seed; ESS, ethanol saraphi seed; HSS, *n*-hexane saraphi seed; WSS, water saraphi seed; Sur A, surangin A; Sur C, surangin C; E/BB, mammea E/BB

1. Introduction

Mammea siamensis (Miq.) T. Anders. (Thai common name, Saraphi) belongs to the family Guttiferae. The young fruit is green and spherical while the ripe fruit is yellow or orange. The

*Corresponding author. Emails: songyot.anuch@cmu.ac.th; okng2000@gmail.com

© 2015 Taylor & Francis

Downloaded by [Chiang Mai University] at 03:25 09 March 2015

rind is white and the fruit contains a single hard brown seed (Smitinand 2001). The compounds from the dichloromethane and acetone extracts of the seeds include siamensone A, surangin B, mammea E/BB and δ-tocotrienol (Laphookhieo et al. 2006). The coumarin compounds have cytotoxic activities on many cell lines including SW-480, HT-29, HCT-116, P-388, KB, Col-2, Lu-1 and BCA-1 (Reutrakul et al. 2003; Yang et al. 2005). Information concerning the activity of *M. siamensis* seed extract on leukaemic cells is limited, especially its effect on the molecular protein target involved in leukaemic cell proliferation. The current research focused on the Wilms' tumour 1 (WT1) as the protein target in a K562 leukaemic cell model. WT1 is a biological marker for leukaemia (Inoue et al. 1994) involved in leukaemogenesis and cell proliferation. A high level of WT1 is related to poor prognosis in leukaemia patients (Menssen et al. 1995).

Natural products have been shown to suppress *WT1* gene expression in leukaemic cells. Curcumin was the first such compound (Anuchapreeda et al. 2006). However, there are no data concerning the effects of *M. siamensis* seed extracts on leukaemic cells. Thus, this study focused on the effects of *M. siamensis* seed extracts on WT1 protein expression. The K562 cell line was used as representative of leukaemic cells because it has a high level of the endogenous WT1 protein expression.

2. Results and discussion

The cytotoxic effects of the crude extracts (ethanol saraphi seed (ESS), *n*-hexane saraphi seed (HSS), ethyl acetate saraphi seed (EASS), *n*-butanol saraphi seed (BSS), and water saraphi seed (WSS)) in K562 cells are shown in Figure 1. ESS, HSS and EASS had strong cytotoxic effects in K562 leukaemic cells at 48 h with the IC_{50} values of 6.5 ± 1.3, 8.7 ± 1.8 and $10.5 \pm 2.0\ \mu g\ mL^{-1}$, respectively (Figure 1(A)–(C)). The IC_{50} values of HSS and ESS extracts are similar while BSS and WSS extracts had no cytotoxic effects ($IC_{50} > 100\ \mu g\ mL^{-1}$, data not shown). Thus, it is possible that the active compounds are non-polar compounds. The IC_{50} values after ESS, HSS and EASS treatments for 72 h were 3.8 ± 0.6, 5.1 ± 1.9 and $6.6 \pm 0.3\ \mu g\ mL^{-1}$, respectively (Figure 1(A)–(C)). Our results were similar to those of Laphookhieo et al. (2007) who found that surangin C from dichloromethane extract of *M. siamensis* seeds showed cytotoxic activity against MCF-7, HeLa, HT-29 and KB by the SRB assay. Therapin C from the petroleum ether extract of *M. siamensis* bark showed the strongest activity with IC_{50} values in the range of 1.6–5.7 μM in the DLD-1, MCF-7, HeLa and NIC-H460 cells by the SRB assay. Furthermore, surangin C also showed cytotoxic effects on these four cell lines with IC_{50} values in the range of 3.8–8.9 μM (Ngo et al. 2010).

WT1 protein levels were decreased after $1.5\ \mu g\ mL^{-1}$ ESS, HSS and EASS extract treatments by $72.3 \pm 5.7\%$, $83.5 \pm 5.0\%$ and $75.3 \pm 2.0\%$, respectively as compared to the

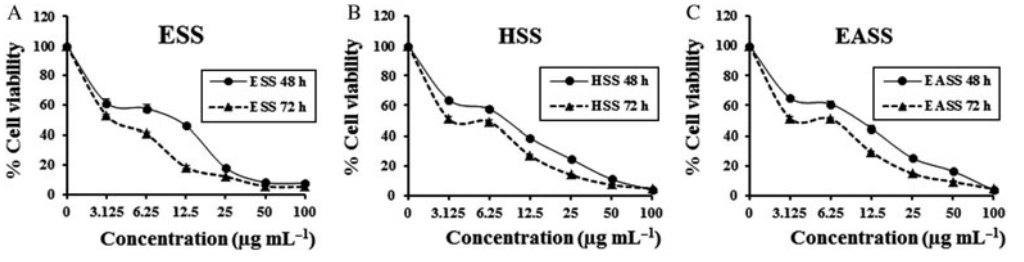


Figure 1. Cytotoxic effects of ESS, HSS and EASS extract on K562 cells by the MTT assay. (A) ESS, (B) HSS and (C) EASS extracts at 72 h. Each point represents the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate.

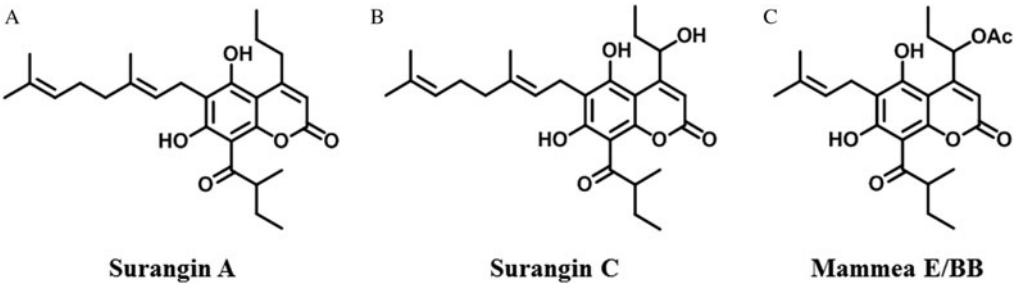


Figure 2. Chemical structure of (A) surangin A (Sur A), (B) surangin C (Sur C) and (C) mammea E/BB (E/BB).

Downloaded by [Chiang Mai University] at 03:25 09 March 2015

vehicle control at 72 h (Figure S1(A),(B)). These treatments also significantly decreased the total cell numbers at 72 h by 90.6 ± 0.1%, 91.6 ± 0.1% and 85.7 ± 0.1%, respectively (Figure S1 (C)). These results suggest that the active compound was most likely the less polar compound that was found in the low to non-polar compartment of the *M. siamensis* seed extract, especially in the *n*-hexane extraction product. However, this active compound may also be present in the ethyl acetate extract. The chemical *n*-hexane is a non-polar organic solvent while ethyl acetate has a higher polarity value (0.009 and 0.228 for *n*-hexane and ethyl acetate, respectively) (Hiran et al. 2009). From the above results the HSS extract was chosen as the candidate *M. siamensis* seed extract for further testing.

Treatment of K562 cells with the HSS extract for 24, 48 and 72 h decreased WT1 protein levels by 71.1 ± 1.2%, 73.9 ± 1.8% and 82.1 ± 0.5%, respectively, when compared to the vehicle control (Figure S1(D),(E)). HSS extract decreased WT1 protein levels by 35.5 ± 7.1%, 58.8 ± 9.5% and 88.9 ± 6.7%, in response to 0.25, 0.5 and 1 $\mu g\,mL^{-1}$, respectively (Figure S1 (G),(H)). The total cell numbers at 24, 48 and 72 h were decreased by 52.8 ± 4.6%, 82.7 ± 0.3% and 88.9 ± 0.8%, respectively (Figure S1(F)).The total cell numbers in response to 0.25, 0.5 and 1 $\mu g\,mL^{-1}$ were significantly decreased at 72 h by 50.6 ± 0.3%, 77.9 ± 0.2% and 90.6 ± 0.1%, respectively when compared to the vehicle control (Figure S1(I)).

The purified Sur A (Figure 2(A)), Sur C (Figure 2(B)) and E/BB (Figure 2(C)) after column chromatography (Table S1, Figures S2–S4) were further investigated for their effects on WT1 protein expression. The non-cytotoxic doses (0.5 $\mu g\,mL^{-1}$) of purified Sur A, Sur C and E/BB (Figure 3(A)–(C)) were used and compared to ESS, HSS and vehicle control. We found that E/BB decreased WT1 protein level by 76.9 ± 12.6%, which was similar to the effect of the HSS extract (78.2 ± 10.6%). Sur A and Sur C decreased WT1 protein expression by 26.4 ± 9.4% and 42.2 ± 14.2%, respectively, when compared to vehicle control (Figure 3(D),(E)). It is considered that although the inhibition of WT1 protein was highly observed in the pure E/BB, the higher amount (35%) of a less potent Sur C or the other components in HSS could substantially enhance the inhibitory effect of E/BB (9%) in the HSS. These results suggested the synergistic effect of compounds existing in the plant and indicated that the main active compound in both HSS and ESS is E/BB. Moreover, Sur A, Sur C and E/BB significantly decreased the total cell numbers at 72 h by 84.7 ± 0.1%, 81.1 ± 0.3% and 91.9 ± 0.1%, respectively, when compared the vehicle control (Figure 2(F)). The cell numbers were similarly decreased by HSS and ESS (90.6 ± 0.1% and 91.6 ± 0.1%).

3. Conclusion

M. siamensis is a source of mammea E/BB, the active compound responsible for the inhibition of WT1 protein expression in leukaemic cells. This is the first report of the inhibitory effects of

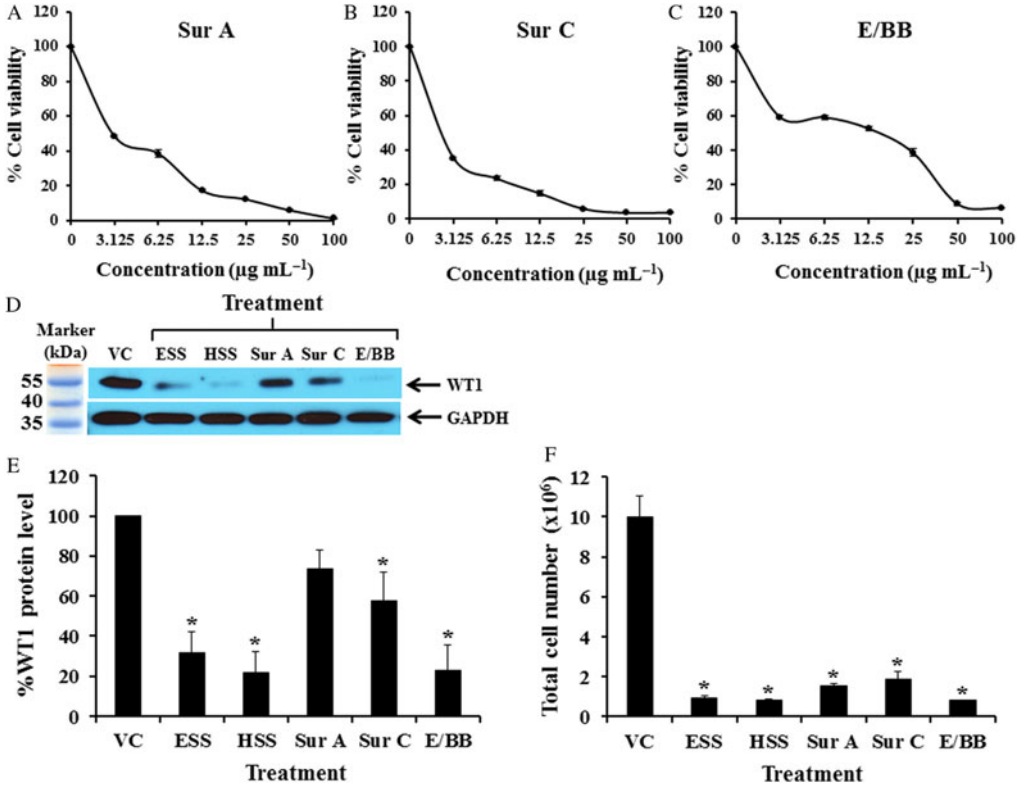


Figure 3. Effects of Sur A, Sur C and E/BB on K562 cell line at 72 h. K562 cells (1×10^4 cells well^{-1}) were cultured with various concentrations of (A) Sur A, (B) Sur C and (C) E/BB extracts for 72 h. The viable cells after treatment were determined by the MTT assay. Each point represents the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. (D) The levels of WT1 protein expression after treatment with 0.5 μg mL^{-1} ESS, HSS, Sur A, Sur C and E/BB were assessed by Western blotting; GAPDH was used as the loading control. (E) The protein levels were analysed with a scan densitometer. (F) The total cell numbers after 72 h were measured by the trypan blue exclusion method. Data are the mean values ± SEM of three independent experiments. Asterisk (*) denotes a significant difference from the control group ($p < 0.05$).

Downloaded by [Chiang Mai University] at 03:25 09 March 2015

mammea E/BB on WT1 protein expression in leukaemic cells. This natural product displays potent inhibitory activity on leukaemic cell proliferation and may have therapeutic potential as an anti-leukaemic drug.

Supplementary material

Experimental and results relating to this paper are available online, alongside Table S1, Figures S1(A)–(I), S2, S3(A)–(C) and S4(A), (B).

Acknowledgements

We are grateful to Assoc. Prof. Dr Araya Jatisatienr for *M. siamensis* material and to Dr Ruttiros Khonkarn for assistance with HPLC analysis. We gratefully thank Dr Dale Taneyhill for his critical review of this paper.

Funding

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) [grant number RSA5580029], the National Research Council (NRC); and Chiang Mai University Research Fund [grant number 2558A10401001].

References

Anuchapreeda S, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P, Limtrakul P. 2006. Curcumin inhibits *WT1* gene expression in human leukemic K562 cells. Acta Pharmacol Sin. 27:360–366. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00291.x.

Hiran P, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N. 2009. Efficacy of plant extract from lime, kaffir lime, and pummelo on microbial inhibition. Agri Sci J. 40:91–94.

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K. 1994. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood. 84:3071–3079.

Laphookhieo S, Maneerat W, Kiattansakul R. 2006. Phenolic compounds from *Mammea siamensis* seeds. Can J Chem. 84:1546–1549. doi:10.1139/v06-157.

Laphookhieo S, Promnart P, Syers JK, Kanjana-Opas A, Ponglimanont C, Karalai C. 2007. Coumarins and xanthones from the seeds of *Mammea siamensis*. J Braz Chem Soc. 18:1077–1080. doi:10.1590/S0103-50532007000500031.

Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, Reinhardt R, Thiel E. 1995. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. Leukemia. 9:1060–1067.

Ngo NT, Nguyen VT, Vo HV, Vang O, Duus F, Ho TD, Pham HD, Nguyen LH. 2010. Cytotoxic coumarins from the bark of *Mammea siamensis*. Chem Pharm Bull. 58:1487–1491. doi:10.1248/cpb.58.1487.

Reutrakul V, Leewanich P, Tuchinda P, Pohmakotr M, Jaipetch T, Sophasan S, Santisuk T. 2003. Cytotoxic coumarins from *Mammea harmandii*. Planta Med. 69:1048–1051. doi:10.1055/s-2003-45154.

Smitinand T. 2001. Thai plant names, botanical names-vernacular names. Bangkok: Prachachon Publisher.

Yang H, Protiva P, Gil PR, Jiang B, Baggett S, Basile MJ, Reynertson KA, Weinstein IB, Kennelly EJ. 2005. Antioxidant and cytotoxic isoprenylated coumarins from *Mammea americana*. Planta Med. 71:852–860. doi:10.1055/s-2005-871257.

Downloaded by [Chiang Mai University] at 03:25 09 March 2015

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Inhibitory effect of mammea E/BB from *Mammea siamensis* seed extract on Wilms' Tumor 1 protein expression in a K562 leukemic cell line

Methee Rungrojsakul[a], Aroonchai Saiai[b], Chadarat Ampasavate[a], Songyot Anuchapreeda[c]*, Siriporn Okonogi[a]*

[a] *Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand;* [b]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand;* [c]*Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

*Corresponding author: S. Okonogi. Tel: +66-53-94-1512. Fax: +66-53-22-2741
E-mail: okng2000@gmail.com
: S. Anuchapreeda. Tel: +66-53-94-9237. Fax: +66-53-94-6042
E-mail: songyot.anuch@cmu.ac.th

Abstract

Mammea siamensis is used in traditional Thai medicine. This study was designed to extract and isolate an active compound from the *M. siamensis* seeds and investigate its activity on Wilms' tumor 1 (WT1) protein expression in K562 cells. WT1 is a transcription factor that stimulates cell proliferation. The ethanol extract (ESS) was fractionated using *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water to obtain HSS, EASS, BSS, and WSS extracts, respectively. The ESS, HSS, and EASS extracts had strong cytotoxic effects on K562 cells in the MTT assay. All three fractions decreased WT1 protein levels and decreased total cell numbers. The HSS extract decreased the WT1 protein levels in a time- and dose-dependent manner. HPLC and NMR analyses indicated that the active compound of HSS was mammea E/BB. *M. siamensis* seeds are thus identified as a promising source of bioactive compounds for potential inhibition of WT1 protein expression.

Keywords: *Mammea siamensis*; mammea E/BB; Wilms' tumor 1; Leukemia, K562

Abbreviations: WT1, Wilms' tumor 1; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; BSS, *n*-butanol saraphi seed; EASS, ethyl acetate saraphi seed; ESS, ethanol saraphi seed; HSS, *n*-hexane saraphi seed; WSS, water saraphi seed. Sur A, surangin A; Sur C, surangin C; E/BB, mammea E/BB

1. Experimental

1.1. *Plant material*

M. siamensis seeds were obtained from Chiang Mai University, Amphoe Muang, Chiang Mai province, Thailand in May 2010. A voucher specimen (J.F. Maxwell, No.92-70) was deposited by the CMU herbarium, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

1.2. *Extraction and isolation*

The *M. siamensis* seeds (10 kg) were washed, chopped into small pieces, and then dried by circulating dry air in an oven at 50°C. The dried weight yield of *M. siamensis* seed was 1 kg (10%). The dried seed (1 kg) was macerated in 95% ethanol and concentrated using an evaporator at 50°C. After evaporation, the ethanolic crude extract was collected, with the final yield of 10% (100 g). The crude ethanolic extract was suspended in water and sequentially partitioned by *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol, respectively. The solvent from each fraction was evaporated and further dried at room temperature. After the removal of solvents, the fractional yield of products of the *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water fractions were 81.5, 5.2, 5.4, and 7.9%, respectively (Table S1). A portion of the crude hexane extract (25 g) was separated by column chromatography on silica gel 60 using gradient elution from 100% *n*-hexane to 100% ethyl acetate to give four separate fractions. Surangin C was found mainly in the fourth fraction as characterized by ^{1}H NMR. Fraction number 2 was further separated by column chromatography eluted by a *n*-hexane and ethyl acetate gradient to give subfractions 2.1-2.5. Subfraction 2.2 was surangin A. Fraction 3 was rechromatographed in a silica gel column using gradient elution from 100% *n*-hexane to 50% ethyl acteate/*n*-hexane to give subfractions 3.1-3.4. Subfraction 3.3 was identified as mammea E/BB (Figure S2). The presence of surangin A, surangin C, and mammea E/BB were confirmed by NMR analysis. The ^{1}H NMR spectra were recorded using a Bruker AV 400 spectrometer. The chemical shifts were recorded in ppm (δ) in $CDCl_3$ using residual solvent peak (δ 7.26) as internal references.

1.3 *Analysis of HSS extracts using high performance liquid chromatography (HPLC)*

0.5 – 100 mg portions of samples were dissolved in 1 mL of ethanol for HPLC analysis. The samples were analyzed using a Dionex ICS-3000 HPLC system with a PDI-100 photodiode array detector. A C18 column (150×4.6 mm, 5 µm particle size, Nucleodur®) with a guard column was

used. For the elution of the constituents, two solvents (denoted as A and B) were applied. A was 1 % v/v acetic acid in water whereas B was 1 % v/v acetic acid in acetonitrile. The isocratic program was 5% A and 95% B for 30 min. The flow rate was 0.5 mL min^{-1} at room temperature and the injection volume was 20 µL. The retention times and UV spectra of major peaks were recorded. The HPLC chromatogram of HSS showed four main peaks at retention times of 8.9, 9.6, 19.3, and 20.8 min using a wave length of 280 nm. A portion of the crude hexane extract (25 g) was further purified by column chromatography using silica gel 60 and characterized by ^{1}H NMR to obtain surangin A (Joshi et al. 1969), surangin C (Yagi et al. 2006), and mammea E/BB (Laphookhieo et al. 2006). The NMR analyses of surangin A, surangin C, and mammea E/BB are shown in Figures S3(A) - S3(C) respectively. The mammea E/BB fraction was then confirmed by the HPLC. The mammea E/BB's peak occurred at the retention time of 8.9 min (Figure S4(A), S4(B)).

1.4 *Cells and cell culture conditions*

The K562 cells (chronic myelocytic leukemic cell line) were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum, 1 mM L-glutamine, 100 units mL^{-1} penicillin, and 100 µg mL^{-1} streptomycin (Invitrogen™ Life, Carlsbad, CA, USA). Cells were incubated at a humidity of 95%, 5% CO_2 atmospheric concentration, and a temperature of 37°C.

1.5 *MTT cytotoxicity assay*

The cytotoxicity of ESS extracts, other fractional extracts (HSS, EASS, BSS, and WSS), and purified compounds (Sur A, Sur C, and E/BB) were evaluated using the MTT assay as described previously (Anuchapreeda et al. 2006). Briefly, cells (1.0×10^4 cells $well^{-1}$) were treated with ESS and fractional extracts of various concentrations (3 to 100 µg mL^{-1}) for 48 or 72 h. The cell cytotoxicity was determined using MTT dye solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and detected using an AccuReader™ microplate reader (Metertech-Inc, Taipei, Taiwan) at 578 nm with reference wavelength of 630 nm. The percent of cell viability was calculated by OD (treatment) ×100 / OD vehicle control. The inhibitory concentration for 50% of cell growth (IC_{50}) values was calculated as the means ± standard errors of the means (SEM), and their activities compared.

1.6 *Protein extraction and Western blotting*

The whole protein extracts from the treated cells were prepared using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, and a protease inhibitor cocktail). The protein concentration was measured using the Folin-Lowry method. The proteins were separated by 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The levels of WT1 protein were determined by a primary rabbit polyclonal anti-WT1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) with a dilution of 1:100, followed by HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA) with a dilution of 1:20,000. The GAPDH protein was probed by primary rabbit polyclonal anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) with the dilution of 1:1,000, followed by HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG with the dilution of 1:20,000. The proteins were visualized using the Luminata^{TM} Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and quantified by the ChemiDoc^{TM} XRS system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

1.7 *Statistical analysis*

All data were expressed as the mean$\pm$standard deviation (SD) or mean$\pm$standard error of the mean (SEM) from triplicate samples of three independent experiments. The statistical differences between the means were determined using one-way ANOVA. The differences were considered significant when the probability value obtained was found to be less than 0.05 ($p< 0.05$).

Table S1. Percent yield of crude, fractional *M. siamensis* seed extracts and pure compounds from *n*-hexane fraction; surangin A, surangin C, and mammea E/BB (%w/w) after column chromatography (%w/w)

Sample	Sample code	%Yield (w/w)
Fresh seed	-	100
- Dry seed	-	10
Dry seed (10%)		100
- Ethanol extract	ESS	10
Ethanol extract		100
- *n*-Hexane extract	HSS	81.5
- Ethyl acetate extract	EASS	5.2
- *n*-Butanol extract	BSS	5.4
- Water extract	WSS	7.9
Hexane fraction (HSS)		100
- Surangin A	Sur A	0.5
- Surangin C	Sur C	35.7
- Mammea E/BB	E/BB	9
- Others	-	54.8

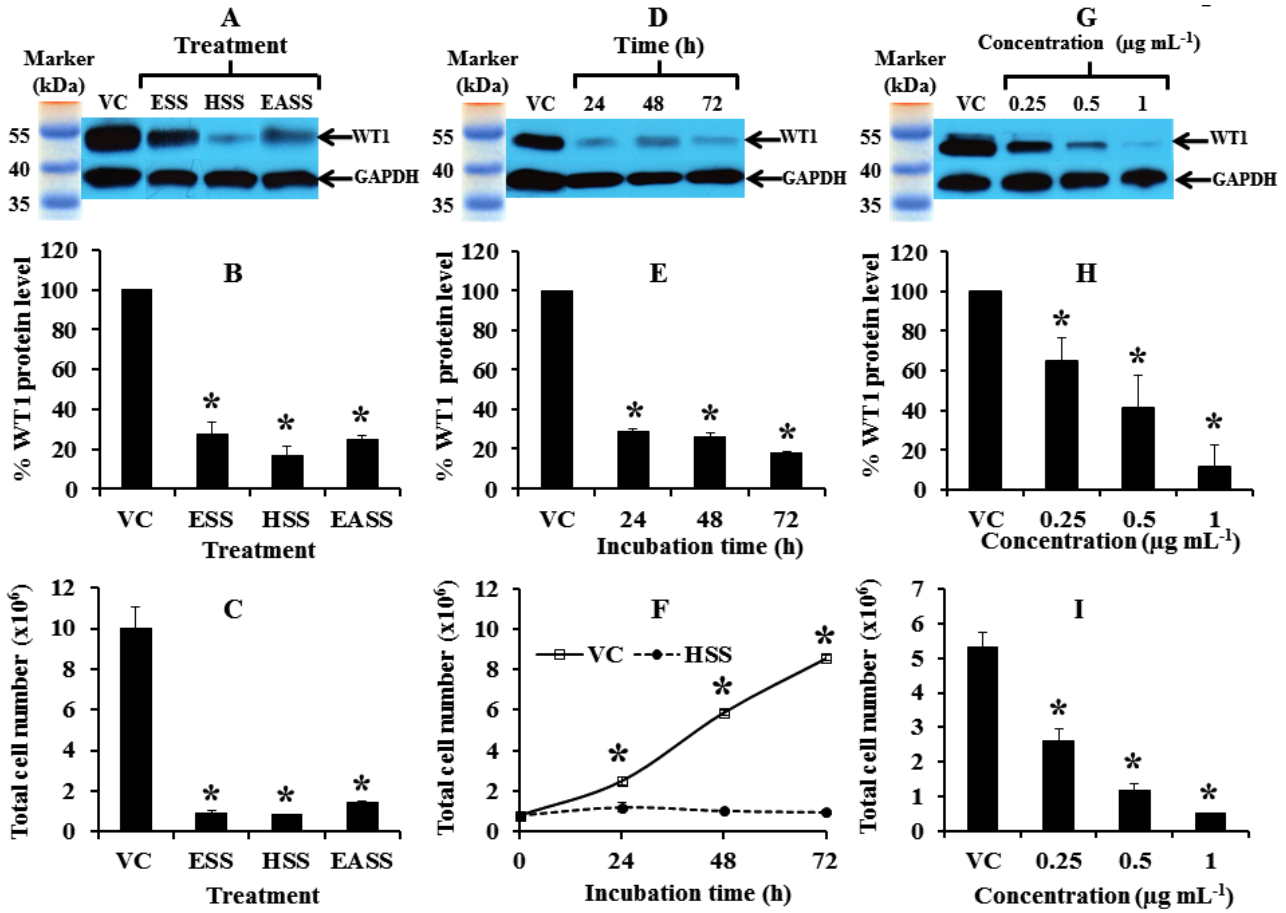


Figure S1. Inhibitory effects of ESS, HSS, and EASS extracts on WT1 protein levels and cell numbers in K562 cells. (A) Cells were treated with 1.5 μg mL^{-1} of ESS, HSS, and EASS extracts for 72 h. Levels of WT1 protein were assessed by Western blotting; GAPDH was used as the loading control. (B) The protein levels were analyzed with a scanning densitometer. (C) The total cell number of K562 cells after treatments for 72 h was determined by the trypan blue exclusion method. (D) K562 cells were treated with HSS extract for 24, 48, and 72 h. (G) WT1 protein levels after HSS treatment (0.25, 0.5, and 1 μg mL^{-1}) for 72 h. (E, H) The protein levels were analyzed using a scanning densitometer. (F, I) The total cell numbers after treatments with various concentrations and times were determined by the trypan blue exclusion method. Data are the mean values ± SEM of three independent experiments. Asterisks (*) denote significant difference from the vehicle control ($p<0.05$).

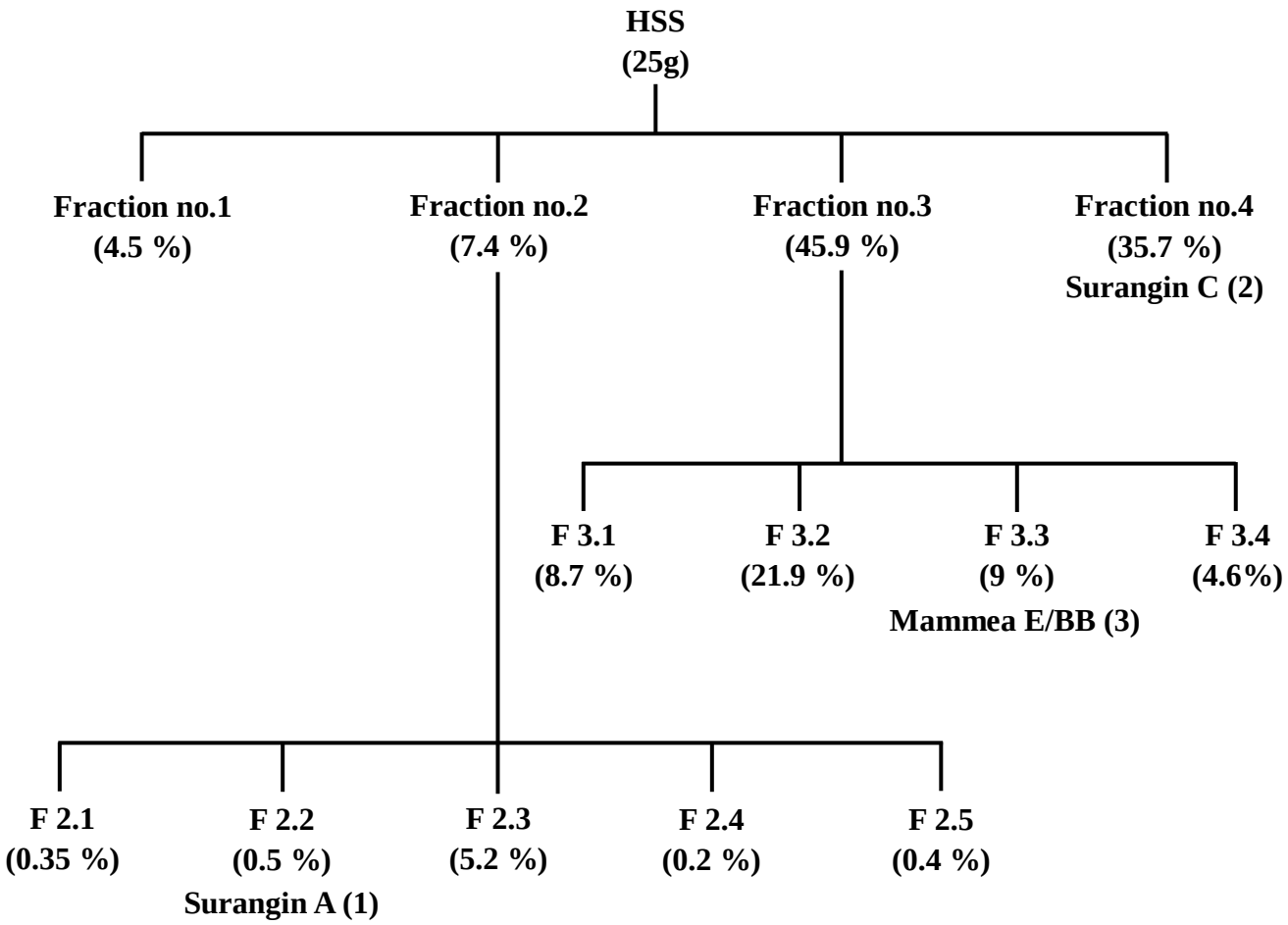
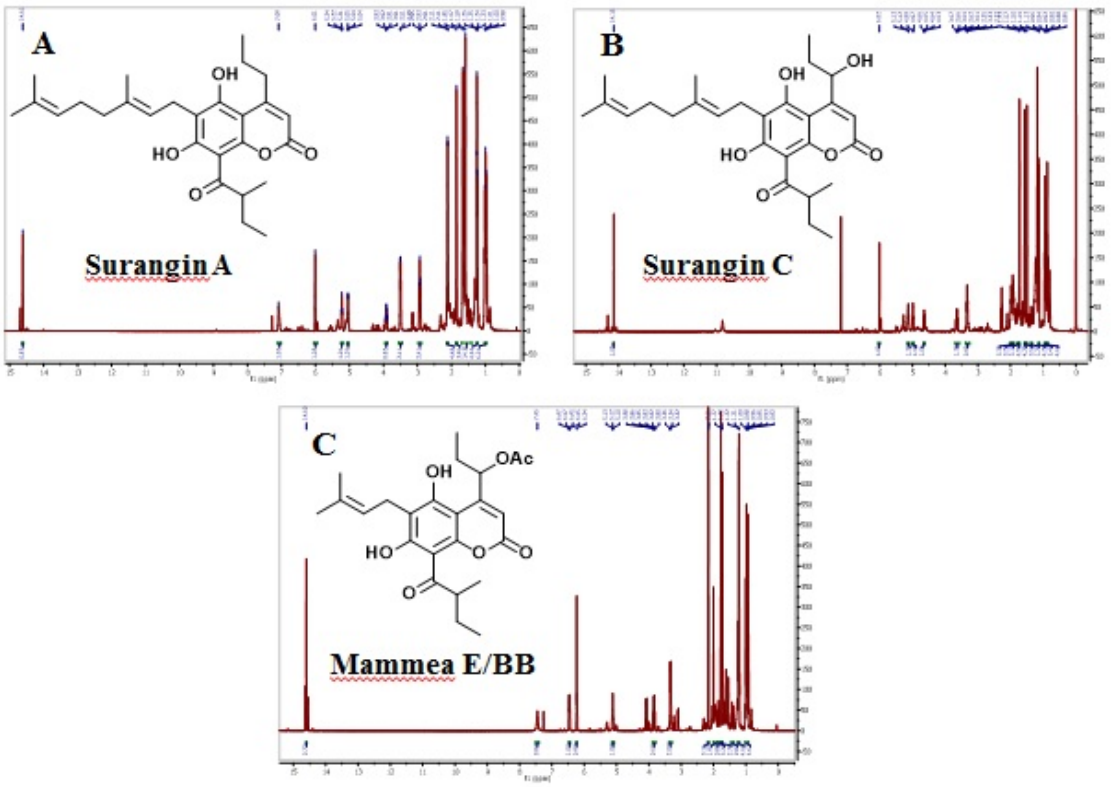


Figure S2. Fraction number and percent yields of surangin A (1), surangin C (2), and mammea E/BB (3) (%w/w) after silica gel 60 column chromatography**.**



Surangin A : Yellowish gum; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 14.61 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.22 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.09 – 4.99 (m, 1H), 3.95 – 3.88 (m, 1H), 3.50 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.11 (d, *J* = 1.9 Hz, 4H), 1.85 (s, 3H), 1.7-1.4 (m, 4H), 1.67 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.24 (dd, *J* = 6.6, 2.4 Hz, 3H), 1.03 – 0.96 (m, 6H)

Surangin C : Yellowish gum; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 14.15 (s, 1H), 10.82 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.99 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.64 (dd, *J* = 7.8, 6.4 Hz, 1H), 3.69 – 3.60 (m, 1H), 3.36 – 3.31 (m, 2H), 2.03-1.95 (m, 4H), 1.94 – 1.83 (m, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 0.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)

Mammea E/BB : Yellowish gum; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 14.60 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.46 (dd, *J* = 8.0, 2.7 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.84 (sextet, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.33 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.99 – 1.90 (m, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 1H), 1.77 (s, 1H), 1.72 (s, 1H), 1.48 – 1.34 (m, 1H), 1.22 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)

Figure S3. Detection of surangin A, surangin C, and mammea E/BB by nuclear magnetic resonance (NMR). (A) Surangin A, (B) surangin C, and (C) mammea E/BB were obtained from the fractions using silica gel 60 column chromatography.

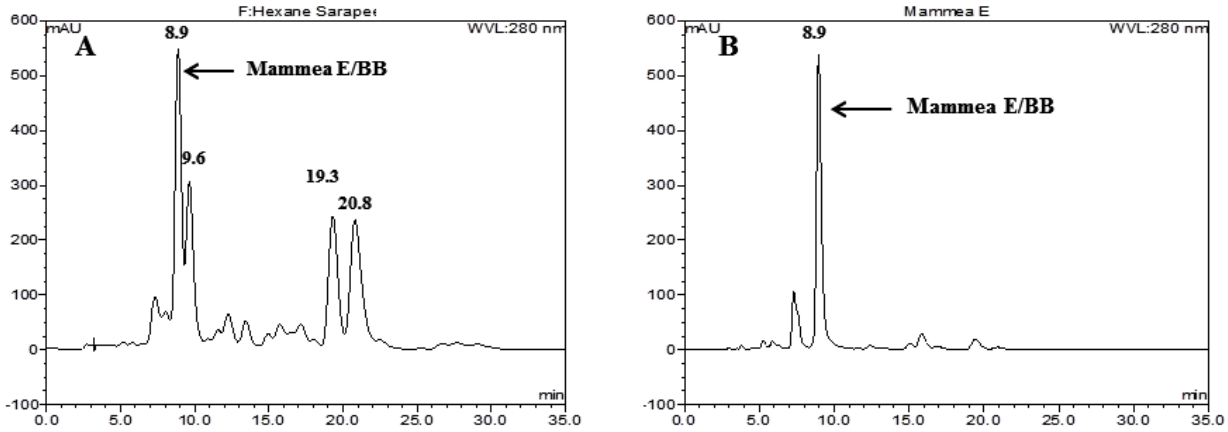


Figure S4. Chromatograms of HSS and mammea E/BB by high performance liquid chromatography and UV detection (HPLC-UV). (A) HSS and (B) mammea E/BB were obtained from the fractions after normal phase column chromatographic separation. Concentrations of HSS and mammea E/BB were 100 mg mL^{-1} and 0.5 mg mL^{-1}, respectively. Injection volume was 20 µL.

References

Anuchapreeda S, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P, Limtrakul P. 2006. Curcumin inhibits *WT1* gene expression in human leukemic K562 cells. Acta Pharmacol Sin. 27:360-366.

Joshi BS, Kamat VN, Govindachari TR, Ganguly AK. 1969. Isolation and structure of surangin A and surangin B, two new coumarins from *Mammea longifolia* (wight) Planch and Triana. Tetrahedron. 25:1453-1458.

Laphookhieo S, Maneerat W, Kiattansakul R. 2006. Phenolic compounds from *Mammea siamensis* seeds. Can J Chem. 84:1546-1549.

Yagi N, Ohkubo K, Okuno Y, Oda Y, Miyazawa M. 2006. Antimutagenic compound from Yellow batai (*Peltophorum dasyrachis*). J Oleo Sci. 55:173-180.