1001843629

ฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์และต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบจากมะรุม (*Moringa oleifera* Lam) ของไทยในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

Antioxidant and anti-cancer properties of Thai Horse radish tree (*Moringa oleifera* Lam) extract on K562 cell line

สุวรรณา เสมศรี

ทรงยศ อนุชปรีดา

วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2554

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์อิสยา จันทร์วิทยานุชิต คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ ที่กรุณาให้โอกาสและสนับสนุนงานวิจัยฉบับนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัย ขอขอบคุณ นายชัยวิชิต รัตนมะณี ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการกลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในขั้นตอนการสกัดสาร และท้ายสุดขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุวรรณา เสมศรี

ทรงยศ อนุชปรีดา

วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต

ชื่อเรื่อง ฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์และต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบจากมะรุม (*Moringa oleifera* Lam) ของไทยในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

ผู้วิจัย นางสาวสุวรรณา เสมศรี

ผศ. ดร.ทรงยศ อนุชปรีดา

ผศ. ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2557

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 84

คำสำคัญ มะรุม วิล์มทูเมอร์วัน ความเป็นพิษต่อเซลล์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวมุ่งสู่ทางเลือกใหม่โดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้ถูกศึกษาและพยายามที่จะรวบรวมความรู้ใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นที่น่าสนใจว่าการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามะรุมมีฤทธิ์ป้องและลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งโดยการเสริมสร้างสถานะของสารต้านอนุมูลอิสระและระดับของอาร์โอเอส อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของสารสกัดจากมะรุมกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวยังไม่เคยรายงาน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการศึกษาฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งของมะรุมไทยในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต้นแบบชนิด K562 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมถูกวัดโดยวิธีเอ็มทีที สารต้านอนุมูลอิสระถูกตรวจโดยวิธีดีพีพีเอช นอกจากนี้ยังตรวจระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยวิธีเวสเทิร์นบลอท ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดย One-way ANOVA จากโปรแกรม SPSS จากผลการทดลองพบว่าสาร

สกัดหยาบมะรุมส่วนใบมีความเป็นพิษกับเซลล์ K562 โดยมีระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) คือ 220 ± 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษ (IC_{20}) คือ 55 ± 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยวิธีดีพีพีเอช นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน หลังจากเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบในช่วงเวลาต่าง ๆ (24, 48 และ 72 ชั่วโมง) ลดลงร้อยละ 21, 37 และ 61 ตามลำดับ นอกจากนี้ในที่ 48 ชั่วโมง ของการบ่มเพาะที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (45, 55, และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถลดระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ร้อยละ 32, 48 และ 68 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบที่ระดับความเข้มข้น IC_{20} แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไม่ผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และที่สำคัญสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบไม่กระทบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PMBC) ฉะนั้นสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบน่าจะเกี่ยวข้องกับการคุมการแสดงออกที่ลดลงของของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์ K562 ระดับการแปลรหัส จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบมีแนวโน้มที่จะเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว และควรจะศึกษาต่อไปในอนาคต

Research Title	Antioxidant and anti-cancer properties of Thai Horse radish tree (*Moringa oleifera* Lam) extract on K562 cell line
Researcher(s)	Miss Suwanna Semsri Assist. Dr. Songyot Anuchapreeda Assist. Dr. Wicharn Janwitayanuchit
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2014
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	84
Keywords	*Moringa oleifera* Lam, Wilm's tumor 1, cytotoxicity
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

Currently, alternative leukemic treatments with natural products are being studied in an attempt to gather new information in the treatment of leukemia. Interestingly, previous studies have shown that *Moringa oleifera* mediates its chemopreventive effects by enhancing antioxidant status and quenching of ROS. However, the cytotoxicity of *Moringa oleifera* extract has never reported with leukemic cell lines. The purpose of this study was to study antioxidant and anti-cancer properties of Thai Horse radish tree (*Moringa oleifera* Lam) extract on K562 cell model. The cytotoxicity of crude *Moringa oleifera* extract was determined by MTT assay. The antioxidant was detected by DPPH assay. Moreover, the WT1 protein levels were examined by Western blot analysis. All data were analyzed the statistically significant by

one-way ANOVA from SPSS software. The result demonstrated that the crude *Moringa oleifera* leaves extract exhibited distinctly cytotoxic effect on K562 cells with the inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) valve of 220 ± 22 µg/mL and non-cytotoxic concentration (IC_{20}) valve of 55 ± 5 µg/mL. It also showed high antioxidant activity detected by DPPH assay. Moreover, the result showed that WT1 protein levels after crude *Moringa oleifera* leaves extract treatments in various time periods (24, 48, and 72 hours) were decreased by 21, 37, and 61 % respectively. In addition, at 48 hours of incubation with various concentrations (45, 55, and 65 µg/mL) could reduce WT1 protein levels by 32, 48, and 68% respectively. However, the crude *Moringa oleifera* leaves extract at IC_{20} dose clearly showed that it did not effect on cell morphology. Importantly, the crude *Moringa oleifera* leaves extract did not affect with PMBC. Conclusion, the crude *Moringa oleifera* leaves extract could inhibit cell proliferation and WT1 protein expression in a dose and time dependent manners. Therefore, it can be concluded that the crude *Moringa oleifera* leaves extract involved in down-regulation of translational process of WT1 protein expression in K562 cells. These results indicated that the *Moringa oleifera* leaves extract is a promising plant as an alternative choice for leukemia treatment and should be further investigated in the future.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
หลักการทฤษฎี เหตุผล และสมมุติฐาน	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	11
ขอบเขตของการวิจัย	11
นิยามศัพท์เฉพาะ	11
สมมติฐานของงานวิจัย	12
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	13
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
มะเร็ง	14
สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง	14
มะเร็งทำให้เกิดความผิดปกติในร่างกาย	15
มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย	16
การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	16

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
การระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	19
การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตาม FAB classification	21
การย้อมสารชีวเคมีในเซลล์	22
การตรวจโปรตีนบนผิวของเซลล์	26
การรักษา	27
ยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* (*Wilms' tumor 1* gene หรือ *WT1*)	28
มะรุม	32
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	35
การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562	35
การเตรียมสารสกัดหยาบมะรุม	35
การศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงชนิด K562	36
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะรุมต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562	36
การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ โดยวิธีดีพีพีเอช	38
การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดมะรุมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวปกติ (peripheral blood mononuclear cell; PBMC)	38
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562	40
การแปลผลการทดลองทั้งหมด	41

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562	42
การศึกษาผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต้นแบบชนิด K562	44
การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากมะรุมส่วนต่าง ๆ ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT)	46
การศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)	53
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อรูปร่างเซลล์และระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562	56
ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อรูปร่างเซลล์และระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562	60
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	64
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	68
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก	78

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
อาหารลี้ยงเซลล์และสารละลายล้างเซลล์	78
สารละลายสำหรับสกัดโปรตีน	79
สารละลายเพื่อใช้ในการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	79
สารละลายที่ใช้กับ Western blot analysis	82
สารละลายเพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์	83
ภาคผนวก ข	84
ประวัติย่อผู้วิจัย	84

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562	42
2. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562	44
3. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วยใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว คนปกติ (PBMC)	47
4. ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ โดยวิธี DPPH	53
5. ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝัก โดยวิธี DPPH	54
6. ร้อยละ 50 ของสารต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นที่เป็นพิษ (IC_{50}) ต่อเซลล์ มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก	55
7. ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อร้อยละของการแสดงออกของ โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน	57
8. ผลของสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน	61

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML	17
2. แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL	18
3. แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML	18
4. แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL	19
5. แสดงโครงสร้างของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน*	29
6. แสดงโครงสร้างของการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน	32
7. ต้นมะรุมไทย	33
8. การแยก PBMC ด้วย Ficoll hypaque	40
9. แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดเพาะเลี้ยงชนิด K562	43
10. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยวิธี MTT	45
11. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝักต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยวิธี MTT	45
12. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนเมล็ดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยวิธี MTT	46
13. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว คนปกติ (PBMC) รายที่ 1 โดยวิธี MTT	48
14. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว คนปกติ (PBMC) รายที่ 2 โดยวิธี MTT	49
15. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว คนปกติ (PBMC) รายที่ 3 โดยวิธี MTT	50

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพที่	หน้า
16. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวคนปกติ (PBMC) รายที่ 4 โดยวิธี MTT	51
17. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวคนปกติ (PBMC) รายที่ 5 โดยวิธี MTT	52
18. แสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH	54
19. แสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝักต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH	55
20. ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อระดับร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot	58
21. ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ต่อรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด K562	59
22. ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่วโมง ต่อระดับร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot	62
23. ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 หลังเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 48 ชั่วโมง	63

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในระดับประเทศและระดับโลก โดยในปี พ.ศ. 2548 (ค.ศ. 2005) องค์การอนามัยโลกได้รายงานว่า มีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั้งหมดประมาณ 7.6 ล้านคนหรือประมาณร้อยละ 13 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดประมาณ 58 ล้านคนทั่วโลก นอกจากนี้รายงานฉบับเดียวกันยังมีการคาดการณ์ว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นจาก 11.4 ล้านคนในปี พ.ศ. 2558 (ค.ศ. 2015) และเป็น 15 ล้านคนในปี พ.ศ. 2563 (ค.ศ. 2020) และจะเสียชีวิต 10 ล้านราย และจะเกิดขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนามากกว่า 7 ล้านคน เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง (องค์การอนามัยโลก. 2012 : ออนไลน์) ซึ่งจากการคาดการณ์นี้จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะเวลาแค่ 20 ปี จะมีผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 50 สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งถือว่าเป็นโรคที่สำคัญและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากที่สุด โดยจากการรายงานของสำนักปลัดกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2547 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดทั่วประเทศเป็นระยะเวลา 3 ปี ติดต่อกันตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึง พ.ศ. 2545 และแนวโน้มของการเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สถิติล่าสุดของการเกิดมะเร็งในประเทศไทยทั้งประเทศยังเป็นตัวเลขของปี พ.ศ. 2544-2546 ซึ่งรายงานในปี พ.ศ. 2553 ที่พบว่า คนไทยเป็นมะเร็งประมาณ 241,051 ราย ใน 3 ปี หรือเฉลี่ย 80,350 รายต่อปี ถ้าคิดเป็นต่อประชากรแสนคนจะพบว่า ผู้หญิงเป็นมะเร็ง 120 คน ส่วนผู้ชายเป็นมะเร็ง 140 คน ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับสถิติปี พ.ศ. 2541-2543 ที่คนไทยป่วยเป็นมะเร็ง 195,780 ราย หรือ 65,260 รายต่อปี ก็จะพบว่าคนไทยเป็นมะเร็งเพิ่มขึ้นร้อยละ 23 นอกจากนี้สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขยังได้สรุปสถิติการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งชนิดต่างๆ และพบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) มากเป็นอันดับ 3 ของโรคมะเร็งและเนื้องอกร้ายทั้งหมด โดยมีผู้เสียชีวิตในทุกช่วงอายุ คือตั้งแต่น้อยกว่า 5 ปี ไปจนถึงมากกว่า 85 ปี โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งได้มีการรายงานว่า อุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML พบในประชากรทั่วไป เท่ากับ 2-3 คนต่อประชากร 100,000 ราย จากการศึกษาพบว่า AML พบได้ประมาณร้อยละ 80 ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันที่พบในผู้ใหญ่ ในขณะที่ ALL พบได้ประมาณร้อยละ 80 ในเด็กที่ป่วยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (โอภาส เกียรติกุล และคณะ, 2545 : 54-70)

สาเหตุของโรคมะเร็งโดยทั่วไป เกิดจากความผิดปกติของระบบการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell growth) โดยอาจจะเกิดจากการสูญเสียการทำงานของยีนที่มีหน้าที่ชะลอและควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (tumor suppressor gene) หรืออาจจะเกิดจากการทำงานที่มากกว่าปกติของยีนที่กระตุ้นการแบ่งตัว (oncogene) โดยความผิดปกติของยีนเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดจะพบการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* (*Wilms' tumor1*; *WT1* gene) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11(11p13) (Call, et al., 1990 : 509-20) โดยปกติแล้วยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ในมะเร็งหลายชนิดทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้เกิดเซลล์ที่มีความผิดปกติหรือเรียกว่า tumor suppressor gene (Kikuchi, et al., 1992 : 781-6; Lewis, et al., 1988 : 25-31) แต่ในระยะหลังมีการศึกษาพบว่าวิล์มทูเมอร์วัน น่าจะทำหน้าที่เป็น oncogene ด้วย (Sugiyama, 2001 : 177-87) โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ประมาณ 1,000 ถึง 100,000 เท่าเมื่อเทียบกับ normal bone marrow และ normal peripheral blood ตามลำดับ (Inoue, et al., 1994 : 3071-9) ยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* นี้จะกำหนดการสร้างโปรตีนที่เรียกว่า วิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งโดยปกติแล้ววิล์มทูเมอร์วัน มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมไปถึงเซลล์เม็ดเลือดด้วย และสามารถตรวจพบโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ได้ทั้งในกระแสเลือดและไขกระดูกแต่ปริมาณน้อย ในขณะที่จะพบปริมาณที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด cell proliferation, cell differentiation รวมทั้งการเกิด cell apoptosis ขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Menke, et al., 1998 : 151-212; Menssen, et al., 1995 : 1060-7) ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงได้ศึกษาถึงการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวกันมากขึ้น และพบว่าสามารถนำการแสดงออกนี้มาใช้เป็น

ดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological marker) ในการทำนายความรุนแรงของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ รวมไปถึงในโรค minimal residual disease (MRD) อีกด้วย (Gue, et al., 1999 : 69-72; Sugiyama, 2001 : 177-87)

ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนิยมที่จะรักษาด้วยการให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งให้ผลดีมากในระยะแรกของการรักษา แต่เมื่อรักษาไปได้ระยะหนึ่งจะพบว่ายาเคมีบำบัดมักทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยและในบางครั้งส่งผลให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยมะเร็งด้วย ทำให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ได้ผลตามที่แพทย์ผู้รักษาต้องการ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยพยายามค้นคว้าและวิจัยหาสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษา โดยมีแนวความคิดว่าสารสกัดเหล่านี้ต้องมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาเคมีบำบัด ซึ่งการทดลองนี้ให้ความสนใจกับสารที่ได้มาจากอาหารที่บริโภคกันเป็นประจำ เช่น ขมิ้น มะรุม พริก ขิง พริกไทย และกระเทียม เป็นต้น

มะรุม มีชื่อสามัญว่า Horse radish tree มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. อยู่ในวงศ์ Moringaceae ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านที่มีทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งมีการเรียกชื่อแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น คำว่ามะรุมนี้ เป็นคำเรียกขานของคนภาคกลาง ในขณะที่ภาคอีสานเรียกว่า “ผักอีฮุม หรือ บักฮุ้ม” ส่วนภาคเหนือเรียกว่า “บะค้อนก้อม” และชาวกะเหรี่ยงแถบกาญจนบุรีเรียกว่า “กาแน้งเดิง” ด้านชายขอบจังหวัดแม่ฮ่องสอนให้ชื่อว่า “ผักเนื้อไก่” ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะรุม คือเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 3-4 เมตร ทรงต้นโปร่ง ใบเป็นแบบขนนกคล้ายกับใบมะขามออกเรียงแบบสลับ ผิวใบด้านล่างสีอ่อนกว่าด้านบน ดอกออกเป็นช่อสีขาว ดอกมี 5 กลีบ ฝักมีความยาว 20-50 เซนติเมตร ลักษณะเหมือนไม้ตีกลอง เป็นที่มาของชื่อต้นไม้ตีกลองในภาษาอังกฤษ (drumstick Tree) เปลือกฝักอ่อนสีเขียวมีส่วนคอดและส่วนมนเป็นระยะตามความยาวของฝัก เปลือกฝักแก่มีสีน้ำตาล เมล็ดมีเยื่อหุ้มลักษณะกลมมีสีน้ำตาล เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร เมล็ดแก่สามารถบีบน้ำมันออกมากินได้ (สรรพคุณของมะรุม. 2012 : ออนไลน์) สรรพคุณของมะรุมในตำรายาพื้นบ้านโดยใบมะรุมถูกใช้เป็นยาพอกแผลช่วยห้ามเลือด ทำให้นอนหลับ เป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ และช่วยแก้ไข้ ใช้ส่วนดอกและผลเป็นยาบำรุง ขับปัสสาวะ และแก้ไข้ ใช้ส่วนเมล็ดบดพอกแก้ปวดตามข้อ และแก้ไข้ นอกจากนี้สารสกัดน้ำและเอทานอลของใบมะรุม สารสกัดเอทานอลของผลและฝัก สารในกลุ่ม glycosides ในสารสกัดเมทานอลของ

ฝักแห้งและเมล็ด แสดงฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูแรท (มะรุม. 2002 : ออนไลน์) และจากการทดลองในหนูพบว่า หนูที่ได้รับฝักมะรุมเป็นโรคมะเร็งผิวหนังจากการกระตุ้นน้อยกว่ากลุ่มทดลอง และในกลุ่มที่กินมะรุมเกิดเนื้องอกบนผิวหนังน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (สรรพคุณของมะรุม. 2012 : ออนไลน์) นอกจากนี้งานวิจัยในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลองพบว่า มะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากมาย เช่น ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ต้านการเกิดเนื้องอก ต้านมะเร็ง (คือ สารที่ชะลอการแบ่งตัว หรือยับยั้งจนหยุดการโตของเซลล์มะเร็ง) ลดระดับคอเลสเตอรอล ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ป้องกันตับอักเสบ ต้านออกซิเดชัน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดระดับน้ำตาล และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นการศึกษาในระดับอณูชีวโมเลกุล โดยจะได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ ซึ่งรายละเอียดของการศึกษาในส่วนของมะเร็งนั้น พบว่ายังมีน้อยมากในปัจจุบัน

ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงได้สนใจในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากมะรุม นำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของพืชผักพื้นบ้าน และเป็นพื้นข้อมูลเบื้องต้นที่นำไปสู่การวิเคราะห์เพื่อหาสารสำคัญจากสารสกัดมะรุม และศึกษากลไกการทำงาน ซึ่งนำไปสู่การผลิตเป็นยาต้านมะเร็ง เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว

ที่มาของโครงการ

โรคมะเร็งไม่เพียงแต่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศทำให้เกิดการสูญเสียชีวิตของประชากรและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนมากเท่านั้น แต่โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลกด้วย การเจริญและการแพร่กระจาย (metastasis) ของโรคมะเร็งจนสุดท้ายทำให้เสียชีวิตนั้น เป็นผลมาจากเปลี่ยนแปลงที่สลับซับซ้อนในระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งเอง ซึ่งจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น ปัจจุบันนี้การใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) มีบทบาทสำคัญมากในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาต้านมะเร็งให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น แต่ปัญหาที่สำคัญที่ทำให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จ และไม่มีประสิทธิภาพคือเซลล์มะเร็ง

เกิดการดื้อยา (drug resistance) หลังจากที่ได้รับยาต้านมะเร็งอย่างต่อเนื่อง เซลล์มะเร็งที่ดื้อยาจะมีลักษณะที่สำคัญคือ มีการแสดงออกของยีน *MDR1* และพี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein) ที่สูง โดยที่พี-กลัยโคโปรตีนจะทำหน้าที่ในการขับยาออกจากเซลล์ทำให้มียาต้านมะเร็งสะสมในเซลล์น้อยลง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตสูงทั้ง ๆ ที่ได้รับยาต้านมะเร็ง ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิดด้วยกัน เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย (leukemia) เป็นกลุ่มของมะเร็งที่พบบ่อยที่สุด (ประมาณ ร้อยละ 30 ของมะเร็งที่พบ) โดยเฉพาะในเด็ก ประกอบด้วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) โดยเฉพาะ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีอุบัติการณ์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง acute lymphoblastic leukemia (ALL) ซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 3 ถึง 4 รายต่อเด็ก 100,000 คน หรือเท่ากับ 1 ใน 3 ของมะเร็งที่เกิดในเด็ก

จากการศึกษา cell proliferation ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน นั้นมีผลต่อการเกิดการแบ่งเซลล์จึงทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่สูงมากและสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้มะเร็ง (tumor maker) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้และบ่งบอกถึงความรุนแรงของมะเร็งโดยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ในการไปจับกับ DNA (DNA-binding)

หลักการ ทฤษฎี เหตุผล และสมมุติฐาน

มะเร็ง คือ กลุ่มโรคที่เกิดจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติของดีเอนเอ (DNA) หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต แบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว และมากกว่าปกติ จึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ และในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง ถ้าเซลล์มะเร็งเหล่านี้ เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะ เรียกชื่อ มะเร็งตามอวัยวะนั้นเช่น มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม มะเร็งสมอง มะเร็งต่อมน้ำเหลืองและมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น โรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลก เป็นสาเหตุการตายประมาณร้อยละ 13 ของคนตาย ทั้งหมด ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 6 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2537 มีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 18 ล้านคนและมีผู้ป่วยใหม่

ประมาณ 9 ล้านคน ในทุก ๆ ปี ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดทั่วประเทศ จากสถิติที่ผ่านมาโรคมะเร็ง มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าร้อยละ 50 ทั้งนี้องค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่าในปี 2563 ทั่วโลก จะมีคนตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน และจะเกิดขึ้นในประเทศที่ กำลังพัฒนา (รวมทั้งประเทศไทย) มากกว่า 7 ล้านคน เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง

สาเหตุและปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดโรคมะเร็งมีอยู่ด้วยกันหลายประการ คือ เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือภายนอกร่างกาย ซึ่งปัจจุบันนี้เชื่อกันว่ามะเร็งส่วนใหญ่ เกิดจากสาเหตุได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น สารพิษจาก เชื้อราที่มีชื่อ อัลฟาทอกซิน (alfatoxin) สารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปิ้ง ย่าง พวกไฮโดคาร์บอน (hydrocarbon) สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร ชื่อไนโตรซามิน (nitosamine) สีผสมอาหารที่มาจากสีย้อมผ้า รังสีเอ็กซเรย์ อุลตราไวโอเลตจากแสงแดด เชื้อไวรัส ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสฮิวแมนแพบพิลโลมา (human papilloma virus) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ จากพฤติกรรมบางอย่าง เช่น การสูบบุหรี่และดื่มสุรา เป็นต้น นอกจากนี้ยังเกิดจากความผิดปกติภายในร่างกายหรือความผิดปกติทางด้านพันธุกรรมซึ่งมีเป็นส่วนน้อย เช่น เด็กที่มีความพิการมาแต่กำเนิดมีโอกาสเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น การมีภูมิคุ้มกันที่บกพร่องและภาวะทุพโภชนาการ เช่น การขาดไวตามินบางชนิด เช่น ไวตามินเอ และ ซี เป็นต้น จะเห็นว่า มะเร็งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้น มะเร็งก็น่าจะเป็นโรคที่สามารถ ป้องกัน ได้เช่นเดียวกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ (Tannock, 1987 : 53-6) ซึ่งสาเหตุและปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบการควบคุมการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ (cell growth) โดยอาจจะเกิดจากการสูญเสียการทำงานของยีนที่มีหน้าที่ชะลอและควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (tumor suppressor gene) หรืออาจจะเกิดจากการทำงานที่มากกว่าปกติของยีนที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (oncogene) เมื่อยีนเหล่านี้ได้รับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมจะผลิตโปรตีนออกมา 5 ชนิด ที่เกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต หรือ growth factor โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสารกระตุ้นการเจริญเติบโตอยู่ที่ผิวเซลล์หรือตัวรับ (receptor) โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น GTP-binding protein (G-protein) อยู่ใต้ผนังเซลล์ด้านในคอยรับสัญญาณจาก receptor โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ไคเนส (kinase) อยู่ภายในไซโตพลาสม

แบ่งเป็นเอ็นไซม์ tyrosine kinase และเอ็นไซม์ serine/threonine kinase โปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสหรือ nuclear protein ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน เช่น เป็นทราสคริบชั่นแฟกเตอร์ (transcription factor)

โดยความผิดปกติของยีนเหล่านี้จะมีมากขึ้นเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดจะพบการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* (*Wilms' tumor 1 gene* หรือ *WT1* gene) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 ตำแหน่ง 11p13 (Call, et al., 1990 : 509-20; Haber, et al., 1991 : 9618-22; Laity, et al., 2000 : 5341-8; Yang, et al., 2007 : 868-76) โดยจะสร้างโปรตีนที่เรียกว่าวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งมีลักษณะของโปรตีนเป็น zinc finger motif protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน ทั้งหมด 429 ตัว และมีส่วนสำคัญอยู่ 2 ส่วนได้แก่ ส่วนของ 4 zinc fingers ทางปลายด้าน carboxyl terminal ตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 307 ถึง 429 ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการจับกับ DNA (DNA binding domain) และอีกส่วนหนึ่งได้แก่ส่วนปลายด้าน amino terminal ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน proline และ glutamine อยู่มาก เป็นส่วนที่เรียกว่า transreguratory domain ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ ทราสคริปชั่น (transcription) ของเซลล์ นอกจากนี้ในบางส่วนของบริเวณระหว่างกรดอะมิโนที่ 226 ถึง 254 จะมีกรดอะมิโน leucine ซ้ำ ๆ กันเรียกว่า leucine zipper อาจทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein interaction) และยังพบว่ามีอีกหลายตำแหน่งที่ทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนตัวอื่น ในระยะแรกพบว่าแล้วยีนวิล์มทูเมอร์วัน มีความสำคัญมากในการควบคุมการเกิดมะเร็ง เรียกว่า ทูเมอร์ซัพเพรสเซอร์ (tumor suppressor gene) (Kikuchi, et al., 1992 : 781-6; Lewis, et al., 1988 : 25-31) คือเมื่อมีความผิดปกติของเซลล์เนื่องจากยีนที่ผิดปกติไป โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมีการแสดงออกที่สูงขึ้น เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมไม่ให้เซลล์ที่มีความผิดปกติแสดงออก และยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดวิล์มทูเมอร์วัน ด้วย ซึ่งพบในเด็ก มีชื่อเรียกว่า childhood kidney tumor เนื่องจากวิล์มทูเมอร์วันจะทำหน้าในการยับยั้งไม่ให้เกิดเซลล์มะเร็ง โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ดังนั้นเมื่อยีน*วิล์มทูเมอร์*เกิดการกลายพันธุ์ หรือทำงานผิดปกติไปทำให้ไม่สามารถควบคุมวัฏจักรเซลล์ได้ จึงทำให้เกิดวิล์มทูเมอร์ในที่สุด แต่ในระยะหลังพบว่าวิล์มทูเมอร์

วันเป็นโปรตีนที่เป็นยีนมะเร็งหรือออองโคยีน (oncogene) มากกว่า (Sugiyama, 1998 : 55-61; Sugiyama, 2000 : 155-61; Sugiyama, 2001 : 177-87; Sugiyama, 2002 : 223-37) ซึ่งพบว่ายีน*วิล์มทูเมอร์วัน*เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือที่เรียกว่าลิวคีเมีย (leukemia) และเป็น tumor marker ในลิวคีเมียอีกด้วย ในผู้ป่วยที่เป็นลิวคีเมีย พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันประมาณ 1,000-10,000 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ในไขกระดูกปกติ (normal bone marrow) และในเซลล์เม็ดเลือดปกติ (normal peripheral blood) (Gue, et al., 1999 : 69-72; Inoue, et al., 1998 : 2969-76; Steinbach, et al., 2006 : 2434-41; Sugiyama, 2001 : 177-87; Svedberg, et al., 1999 : 1057-62) โดยปกติแล้วโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการแก่ตัวโดยปกติในกระบวนการสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณปกติได้ในไขกระดูก และในต่อมน้ำเหลือง (lymph node) จากข้อมูลหลาย ๆ ข้อมูลพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน มีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาการของเซลล์ทั้งในสาย อิริทรอยด์ (erythroid), มัยอิลอยด์ (myeloid) และ ลิมฟอยด์ (lymphoid) การศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่าในส่วน downstream ของ signal transduction ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นักวิจัยพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ (cell proliferation) และการพัฒนาการของเซลล์ (cell differentiation) รวมทั้งการเกิดการตายของเซลล์ (cell apoptosis) ขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยที่การเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นภายในเซลล์นั้นจะพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่สูงมากภายในเซลล์ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่แสดงออกอย่างมากมายภายในเซลล์ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (non mutation gene) แต่อย่างใด เป็นโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่มีรูปร่างปกติรวมทั้งมียีนปกติด้วย ต่อมาได้มีการศึกษาโดยใช้ antisense oligonucleotide ของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ายีน*วิล์มทูเมอร์วัน*มีการแสดงออกที่น้อยลง และลดการเกิดการแบ่งตัวของเซลล์ของในผู้ป่วยลิวคีเมีย (Algar, et al., 1996 : 1005-14; Yamagami, et al., 1996 : 2878-84) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันทำหน้าที่เป็นออองโคยีน (oncogene) ไม่ใช่ tumor suppressor (Fu, et al., 2000 : 211-215; Im, et al., 1999 : 109-18; Miwa, et al., 1992 : 405-9; Siehl, et al., 2004 : 745-50; Smith, et al., 1998 : 764-73; Wu, et al., 1998 : 16-9; Wu, et al.,

1998 : 46-8) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์สนใจที่จะศึกษาถึงการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในมะเร็งเม็ดเลือดขาวกันมากขึ้น โดยพบว่าสามารถใช้การแสดงออกนี้มาเป็นดัชนีบ่งชี้ (marker) สำหรับการทำนายความรุนแรงของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ รวมไปถึงการตรวจหาสภาวะ minimal residual disease (MRD) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวอีกด้วย (Gue, et al., 1999 : 69-72; Inoue, et al., 1994 : 3071-9; Liu Yin, 2002 : 119-35; Menke, et al., 1998 : 151-212; Menssen, et al., 1995 : 1060-7)

การรักษาในผู้ป่วยและมะเร็งแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกัน โดยหลักการการรักษาคือระยะแรกจะควบคุมโรคให้สงบ (remission) หลังจากนั้นจะป้องกันการกลับเป็นซ้ำ (relapse) โดยในการรักษาจะใช้ยาเคมีบำบัด (chemotherapeutic drug) รังสีรักษา (radiotherapy) การปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) โดยการให้เคมีบำบัดขนาดสูงร่วมกับรังสี หรือการสร้างภูมิคุ้มกัน biological therapy โดยการใช้ interferon กับเซลล์มะเร็งได้บางชนิด ซึ่งมีผลข้างเคียงของการรักษาคือ หลักการให้เคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นทำลายเซลล์มะเร็งซึ่งมีการแบ่งตัวเร็วแต่ในขณะเดียวกันเคมีบำบัดก็ทำลายเซลล์ปกติด้วย ส่วนการรักษาด้วยรังสีรักษา (radiotherapy) มีผลข้างเคียงทำให้ขนหรือผมจะร่วง ผิวบริเวณดังกล่าวจะแห้งและคัน ส่วนการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) ผู้ป่วยจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยมีความพยายามและมุ่งมั่นค้นคว้า และศึกษาหาสารสกัดจากธรรมชาติหรือพืชผักสมุนไพรเพื่อนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็งกันมากขึ้น โดยมีแนวความคิดว่าพืชสมุนไพร หรือสารสกัดที่ได้จากพืชนั้นน่าจะมีความเป็นพิษน้อย เนื่องจากมีการนำมาบริโภคกันในชีวิตประจำวันกันอยู่แล้วโดยเฉพาะพืชผักสมุนไพรพื้นบ้านเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ทั้งนี้เพราะสารสกัดจากพืชผักสมุนไพรมีผลในการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยาสังเคราะห์อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าด้วย ดังนั้นจึงมีพืชผักสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง ได้แก่ พืชผักสมุนไพรที่นำมาใช้บริโภคเป็นอาหาร เช่น มะรุมพริก พริกไทย ขิง ข่า ตะไคร้ ใบมะกรูด ขมิ้น และกระเทียม เป็นต้น ซึ่งในพืชผักสมุนไพรเหล่าจะมีสารที่เรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งในปริมาณที่แตกต่างกัน

สารต้านอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของโมเลกุลสารอื่น ๆ ได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวเนื่องกับการแลกเปลี่ยน อิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับ สารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ อาทิ ไธออล กรดแอสคอร์บิก และโพลีฟีนอล ส่วนสารต้านมะเร็ง คือสารชะลอการแบ่งตัวจนหยุดการโตของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่ามะรุมเป็นแหล่งของ natural antioxidant ที่ดี (Anwarand Ashraf, 2005 : 45-51; Makkar and Becker, 1996 : 211-228) ต่อมา Atawodi และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของมะรุม มีค่า antioxidant ต่อ radical scavenging ที่สูงซึ่งบ่งชี้ว่ามีความสามารถในการเป็นสมุนไพรป้องกันมะเร็ง (cancer chemopreventive) ที่ได้จากการวัดปริมาณ antioxidant ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของสารสกัดจากส่วนราก ใบ และเปลือกลำต้น ของมะรุม โดยใช้ตัวสกัดคือเมทธานอล (methanol) พบว่าค่า 50% inhibitory concentration ของ antioxidant คือ 16, 30 และ 38 ไมโครลิตร ที่ได้จาก ราก ใบ และเปลือกลำต้น ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการวัดค่า radical scavenging โดยมีค่าเท่ากับ 40, 58 และ 72 ไมโครลิตร ของ ใบ ลำต้น และราก ตามลำดับ (Atawodi, et al., 2010 : 710-6) นอกจากนี้ Bharali และคณะ รายงานว่าสารสกัดมะรุม (Moringa oliefera) น่าจะสามารถเป็นสารชนิด chemopreventive ต่อสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งได้ (chemical carcinogenesis) โดยพบว่ากลุ่มหนู mice ที่เป็น skin papillomagenesis โดยการเหนี่ยวนำของสาร 7,12-dimethylbenz(a) anthracene *(DMBA)* ที่ได้รับสาร hydro-alcohlic ที่ได้จากสกัดมะรุม มีอัตราการเป็นมะเร็งดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Bharali, et al., 2003 : 131-9) Sreelatha และคณะ รายงานว่าสารสกัดมะรุมมีฤทธิ์เป็น antiproliferation โดยเหนี่ยวนำทำให้เกิดการตายแบบ apotosis ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด human tumor (KB) (Sreelathaand Padma, 2011 : 1359-68) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า niaziminin และ thiocarbamte จากใบมะรุม มีฤทธิ์เป็น anticancer เนื่องจากสามารถยับยั้งการส่งเสริมการเกิดมะเร็งโดยเชื้อไวรัสชนิด Epstein-Barr virus

(Anwar, et al., 2007 : 17-25; Murakami, et al., 1998 : 319-23) อย่างไรก็ตามในการศึกษาผลของสารสกัดจากมะรุมต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นยังไม่พบรายงานในปัจจุบันนี้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นที่น่าสนใจในด้านของการศึกษาความสัมพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระกับสารต้านมะเร็งในกลุ่มมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้เซลล์ K562 เป็นเซลล์ต้นแบบ และทำการศึกษาในเชิงอณูชีวโมเลกุลด้านการของการลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ซึ่งเป็น biological maker ที่สำคัญในมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งข้อมูลจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของการพัฒนาสารสกัดจากมะรุมซึ่งได้จากธรรมชาติมาเป็นยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้เคมีบำบัดในการรักษา และยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของพืชผักพื้นบ้าน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. วัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากมะรุม
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากมะรุมต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 และเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวปกติจากมนุษย์ (PBMC)
3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากมะรุมต่อระดับการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

นิยามศัพท์เฉพาะ

สารสกัดหยาบ (crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำไปทำผลิตภัณฑ์

ความเป็นพิษของสารที่ร้อยละ 50% (inhibitory concentration at 50%; IC_{50}) หมายถึง ระดับความเข้มข้นสารสกัด ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไปร้อยละ 50

ความเป็นพิษของสารที่ร้อยละ 20% (inhibitory concentration at 20%; IC_{20}) หมายถึง ระดับความเข้มข้นสารสกัด ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไปร้อยละ 20

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML

เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้จากการเจาะเก็บเลือดคนปกติ และการปั่นแยกเก็บเม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวด้วย ficoll hypaque

มะรุมมีชื่อสามัญว่า Horse radish tree มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. อยู่ในวงศ์ Moringaceae เป็นพืชกำเนิดแถบใต้เชิงเขาหิมาลัย เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางที่ถูกปลูกไว้ในบริเวณบ้านไทยมาแต่โบราณ กินได้หลายส่วน ทั้งยอด ดอก และฝักเขียว แต่ใครๆ ก็นิยมกินฝักมากกว่าส่วนอื่นๆ ต้นมะรุมพบได้ทุกภาคในประเทศไทย ทางอีสานเรียก “ผักอีฮุม หรือผักอีฮีม” ภาคเหนือเรียก “มะค้อมก้อน” ชาวกะเหรี่ยงแถบกาญจนบุรีเรียก “กาแน้งเดิง” ส่วนชานฉานแถบแม่ฮ่องสอนเรียก “ผักเนื้อไก่”

สมมติฐานของการวิจัย

1. สารสกัดหยาบจากมะรุมมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562
2. สารสกัดหยาบจากมะรุมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดปกติ
3. สารสกัดหยาบจากมะรุมมีฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ
4. สารสกัดหยาบจากมะรุมมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษากลุ่มของสารออกฤทธิ์สำคัญในการทำลายมะเร็งเลือดขาวต่อไป
2. เป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชผักพื้นบ้าน เพื่อใช้เป็นยาต้านมะเร็ง
3. เป็นข้อมูลที่ใช้ศึกษาต่อไปในระดับอณูชีวโมเลกุลเพื่อใช้เป็นยาต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไป

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็ง (cancer)

มะเร็ง คือ เซลล์เนื้อร้ายที่เจริญเติบโตผิดปกติแผ่แทรกซึม เบียดเข้าไปในเซลล์เนื้อเยื่อปกติที่อยู่โดยรอบ แบ่งตัวเร็วกว่าเซลล์ปกติหลายเท่า อยู่นอกเหนืออำนาจการควบคุมของร่างกาย สามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นของร่างกายที่ห่างไกลออกไปและไม่ติดต่อกับก้อนมะเร็งเดิม โดยแพร่เข้าไปในหลอดโลหิตและน้ำเหลือง มะเร็งสามารถเกิดจากเซลล์ทุกชนิดในร่างกาย ยกเว้น ขน ผม เล็บ ที่งอกออกมาแล้วเท่านั้น หากเป็นมะเร็งที่อวัยวะสำคัญ เช่น ปอด ตับ สมอง มักทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว ในประเทศไทยเราพบว่า เพศชายมักเป็นมะเร็งอายุระหว่าง 50-70 ปี และในเพศหญิงตั้งแต่อายุ 35-70 ปี กระบวนการของการเกิดมะเร็งอาจแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

1. เริ่มจากมีตัวกระตุ้น (initiator) เป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง หรือทำลายยีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ตามปกติเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งใช้เวลาหลายปี

2. ตัวกระตุ้นเสริม (promoter) เมื่อเซลล์ปกติที่เกิดการกลายพันธุ์ได้รับสิ่งกระตุ้นเสริมเข้าไปบ่อยๆ ทำให้เกิดการเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งขึ้น ตัวกระตุ้นและตัวกระตุ้นเสริมมีอยู่หลายสาเหตุร่วมกันก่อให้เกิดโรคมะเร็งโดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการดำเนินชีวิต การทานอาหาร ความเครียด ได้รับสารเคมีจากสิ่งแวดล้อม

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง แบ่งออกเป็น 2 ประเภทที่สำคัญ คือ

1. เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย ซึ่งปัจจุบันเชื่อกันว่ามะเร็งส่วนใหญ่ เกิดจากสารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น สารพิษจาก เชื้อรา ที่มีชื่อ อัฟฟลาทอกซิน (aflatoxin) สารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปิ้ง ย่าง ซึ่งก็คือพวกไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สารเคมีที่ใช้ใน

ขบวนการถนอมอาหาร ชื่อไนโตรซามิน (nitrosamine) สีผสมอาหารที่มาจากสีย้อมผ้า รังสีเอ็กซเรย์ อุลตราไวโอเลตจากแสงแดด เชื้อไวรัส เช่น ไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis virus B) ไวรัสฮิวแมน แพบพิลโลมา (human papiloma virus) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ จากพฤติกรรมบางอย่าง เช่น การสูบบุหรี่และดื่มสุรา เป็นต้น

2. เกิดจากความผิดปกติภายในร่างกาย ซึ่งมีเป็นส่วนน้อย เช่น เด็กที่มีความพิการมาแต่กำเนิด มีโอกาสที่จะเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น การมีภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง และภาวะทุโภชนาการ เช่น การขาดไวตามินบางชนิด เช่น ไวตามินเอ ซี เป็นต้น

มะเร็งทำให้เกิดความผิดปกติในร่างกายได้ดังนี้

1. แย่งอาหารไปอย่างมากเพื่อนำไปใช้ในการแบ่งตัวเติบโต ใช้อาหารประมาณ 3-4 เท่าของเซลล์ปกติ ทำให้ร่างกายผ่ายผอม

2. เปลี่ยนให้เกิดสภาพกรดเพื่อให้เหมาะกับการอยู่รอดของตัวเองสาเหตุที่ทำให้ร่างกายเป็นกรดนอกจากเซลล์มะเร็งแล้วมีสาเหตุจากการดื่มน้ำน้อย ทานอาหารหวาน คาร์โบไฮเดรตมาก ไขมันสูง รวมทั้งทานโปรตีนสัตว์มากเกินไป

3. ก้อนมะเร็งจะสร้างสารคัดหลั่งออกมามีมากมายหลายชนิด รวมทั้งปล่อยของเสียออกมามากมาย ทำให้ร่างกายอ่อนแอ เบื่ออาหาร เกิดความดันเลือดสูง บางรายทำให้เกิดการละลายของแคลเซียมในกระดูก ทำให้มีผลต่อสมองลักษณะต่างๆ

4. คุณสมบัติที่ก้อนเนื้อเยื่อมะเร็งโตมากและเร็ว บริเวณก้อนตรงกลางจึงมักขาดสารอาหาร ทำให้เกิดการตายของเนื้อมะเร็งเกิดขึ้น ผลที่ตามต่อมาก็คือเกิดการติดเชื้อได้ง่าย เพราะเนื้อตายก็ดี น้ำเลือดน้ำเหลืองก็ดี ล้วนแต่เป็นอาหารชั้นเลิศของเชื้อโรค ในคนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งมักจะมีกลิ่นเน่าเหม็นปนออกมา ถ้าไม่ได้รับการดูแลแก้ไขที่ถูกต้อง การอักเสบติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดและเสียชีวิตในที่สุด

5. มะเร็งทำให้ร่างกายขาดออกซิเจน เพราะแย่งออกซิเจนไปใช้ในการแบ่งตัว

6. ทำให้เม็ดเลือดขาวทำงานมากขึ้น คอยกำจัดเซลล์มะเร็งแล้วตัวเองตายไป จนทำให้ภูมิต้านทานลดลง

7. ทำให้อวัยวะที่เป็นมะเร็งสูญเสียการทำงาน

8. ผลจากการขยายตัวทำให้ไปกดเบียดอวัยวะข้างเคียงให้เสียหาย

9. มะเร็งสร้างสารที่เรียก "แองจิโอเจนเนซิส" มีผลให้มีเส้นท่อเลือดมาเลี้ยงก้อนมะเร็งเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้พอเพียงกับการเจริญแบ่งตัวของเนื้อเยื่อมะเร็งแต่เส้นเลือดเหล่านี้เป็นเส้นเลือดที่ไม่สมบูรณ์ มีความเปราะบางเพราะถูกเร่งรีบสร้างมากเกินไป

สถิติการเสียชีวิตจากมะเร็งชนิดต่าง ๆ ของประชากรไทยพบว่า ผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมียมากเป็นอันดับ 3 ของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งทั้งหมด

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย (Leukemia) (พรเทพ เทียนสิวากุล และคณะ., 2547: 45-56; สาคร พรประเสริฐ., 2542 : 30-55)

คือโรคมะเร็งเม็ดเลือด มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน ที่ไม่สามารถเจริญไปเป็นตัวแก่ได้ ในไขกระดูกจะพบ neoplastic หรือ leukemic cells จำนวนมากเข้าไปเบียดบังเซลล์ปกติ (normal cells) ทำให้มีการสร้างเซลล์ปกติออกมาใช้งานได้น้อยกว่าปกติ จึงไม่เพียงพอต่อการดำรงสภาวะสมดุลของเลือดได้ พบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นกลุ่มใหญ่ของโรคที่มีความรุนแรงของอาการ และเซลล์ต้นกำเนิดที่เป็นมะเร็งและการตอบสนองต่อการรักษาจะแตกต่างไปแล้วแต่ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

สามารถแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ยุทธนา หมั่นดี., 2549 : 39-46) คือ

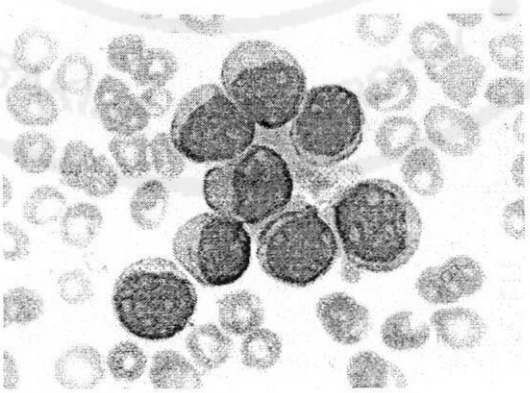
Acute leukemias หรือกลุ่มที่มีอาการรวดเร็ว รุนแรง ในไขกระดูกพบการเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็งอย่างต่อเนื่อง (progressive proliferation) และมีการสะสมของเซลล์ตัวอ่อนที่เป็น immature precursor cells (blasts) และมีเซลล์ปกติน้อยในกระแสเลือด (peripheral blood)

พบปริมาณการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มากขึ้น (leukocytosis) แต่บางรายก็ไม่พบ แต่จะมีเซลล์ที่ไม่มีการพัฒนาการไปเป็นเซลล์ตัวแก่ (undifferential) จำนวนมาก และอาจพบภาวะโลหิตจาง และซีดได้ (anemia) มีจำนวนเกล็ดเลือด (platelet count) อาจต่ำหรือปกติก็ได้ ไม่ค่อยพบ อวัยวะที่โตผิดปกติ (organomegaly)

Chronic leukemias หรือกลุ่มที่มีการดำเนินโรคช้า ทำให้กว่าจะตรวจพบมักจะใช้เวลานาน ในไขกระดูกจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนและ เซลล์ที่มีการพัฒนาการไปเป็นเซลล์ตัวแก่แล้ว (differentiated cells) จำนวนมาก ในกระแสเลือด และพบเซลล์ได้ทุกระดับอายุ ตั้งแต่เซลล์ตัวอ่อน (blasts) จนถึงเซลล์ตัวแก่ (mature cells) มีจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC count) สูงถึงสูงมาก อาจไม่พบ เซลล์ตัวอ่อนก็ได้ พบภาวะโลหิตจางเล็กน้อย จำนวนเกล็ดเลือดส่วนมากปกติ พบการแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็งได้ ในอวัยวะอื่นได้บ่อย เช่น ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง ทำให้เกิด organomegaly เนื่องจากอวัยวะทำงานมากผิดปกติ

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

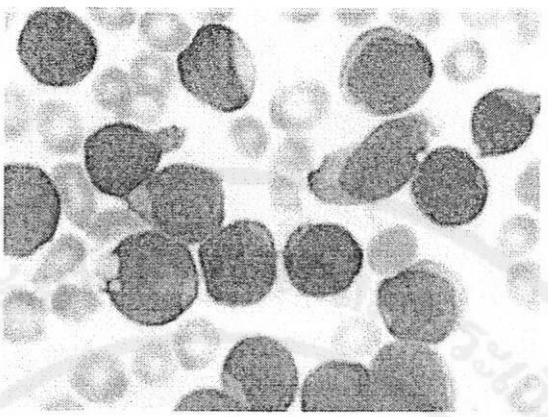
1. Acute myeloblastic leukemias (AML) มี leukemic cells เป็นเซลล์ในสาย myeloid มีการดำเนินโรคเร็ว



รูปภาพที่ 1 แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML

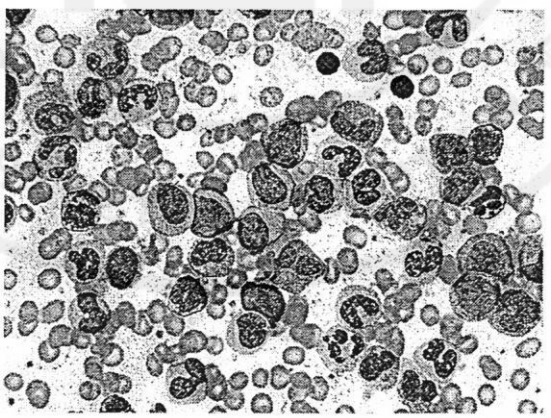
ที่มา: https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTUFtXltJW74FgXAncNEYK2oRONJId14d224xVzmq0N-F-mHHi

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



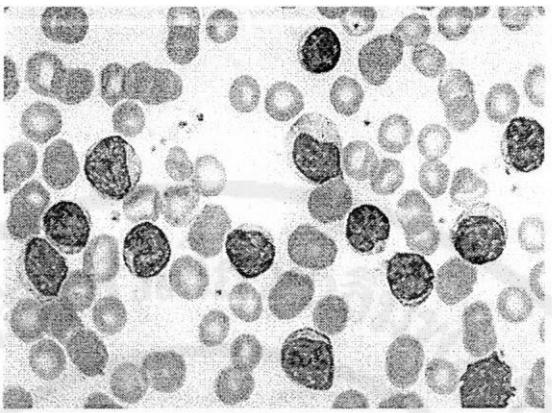
รูปภาพที่ 2 แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ที่มา: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0e/Acute_leukemia-ALL.jpg/230px-Acute_leukemia-ALL.jpg

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



รูปภาพที่ 3 แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML ที่มา: http://www.mt.mahidol.ac.th/e-learning/BasicTechniquesInHematology/images/image%202/wbc%20picture /CML1.jpg

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



รูปภาพที่ 4 แสดงลักษณะสเมียร์เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL

ที่มา: http://www.health-news-blog.com/images/blogs/1-2011/chronic-lymphoid-leukemia.jpg

การระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

จากการศึกษาระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวพบมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ใหญ่มากกว่าเด็กประมาณ 10 เท่า และพบในชายมากกว่าในหญิงประมาณ 2 เท่า พบได้ในทุกกลุ่มอายุ แต่ ALL พบมากในเด็ก ส่วน AML พบมากในผู้ใหญ่ CML และ CLL พบมากในผู้ใหญ่วัยกลางคนถึงวัยสูงอายุ มักไม่พบในเด็ก โดย CLL จะพบน้อยมากในคนไทย พบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 8-10 รายต่อปี ในประชากร 100,000 คน และเป็นเฉียบพลัน (acute) และ เรื้อรัง (chronic) เท่า ๆ กัน

สาเหตุการเกิดโรค

สาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจแบ่งออกได้เป็น 2 สาเหตุดังนี้

1. **ปัจจัยภายนอก (Environmental factor)** ได้แก่

1.1 การได้รับสารรังสี โดยเฉพาะ ionizing radiation จะทำให้มีโอกาสการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้มากกว่าคนปกติโดยทั่วไป

1.2 การได้รับสารเคมีบางชนิด เช่น benzene, organic solvent ชนิดต่างๆ หรือยา เช่น chroramphenecal, phenylbutazone, cytotoxic drugs จำพวก alkylating agents เป็นต้น

1.3 การติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น human lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) อาจก่อโรค T-cell leukemia/lymphoma ตามมา, HTLV-II อาจก่อโรค Hairy-cell leukemia ตามมา และ Epstein-Barr virus อาจก่อโรค Burkitt's lymphoma ตามมา

2. **ปัจจัยภายใน (host factor) ได้แก่**

2.1 เชื้อชาติ (race) ในชนเชื้อชาติต่างกัน มักจะมีโอกาสการเป็นมะเร็งต่างชนิดกัน และอัตราที่ต่างกันด้วย พบว่าชนผิวขาว (caucasian) มีอัตราการเป็น มะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงกว่าชนผิวสี

2.2 พันธุกรรม (genetic) พบว่าญาติพี่น้องที่ใกล้ชิดในสายเลือดเดียวกัน มักมีโอกาสการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้ใกล้เคียงกัน ทั้งที่โรคนี้มิได้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

2.3 การมีโครโมโซมผิดปกติ เช่น การสลับที่ (translocation), การขาดหายไป (deletion), การกลับหัวท้าย (inversion), การเพิ่มจำนวน (extra chromosome) ฯลฯ เหล่านี้ทำให้มีโอกาสการเป็นมะเร็งได้มากกว่าคนปกติทั่วไป

2.4 การมีภูมิคุ้มกันเสื่อมหรือบกพร่อง (immunodeficiency) ก็มีโอกาสการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้มากกว่าคนปกติทั่วไป เนื่องจากกลไกการกำจัด leukemic cells บกพร่อง

2.5 การมีไขกระดูกเสื่อมเรื้อรัง (chronic marrow dysfunction) เช่น myelodysplastic syndrome (MDS), myeloproriferiferative disorder (MPD), aplastic anemia (AA), paroxymal nocturnal hemoglobinuria (PNH) ฯลฯ อาจนำไปสู่การเป็นมะเร็งเม็ดเลือดได้ในอนาคต

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตาม FAB classification (ยุทธนา หมั่นดี., 2549 : 1-5)

เนื่องจาก acute leukemia นั้น แบ่งเป็นชนิดย่อย ๆ หลากหลายชนิดตามชนิดของ leukemic cells ที่ predominate จึงทำให้มีความยุ่งยากในการแบ่งชนิด ในปี 1976 FAB classification ที่กลุ่มแพทย์ชาวฝรั่งเศส อเมริกัน และอังกฤษ นำเสนอ เป็นการจำแนกชนิดและเรียกชื่อของ acute leukemia โดยอาศัยพื้นฐานจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (cell morphology) ของ leukemic cells ในสเมียร์เลือดและไขกระดูก ที่ย้อมด้วยสี Romanosky ประกอบกับการย้อม cytochemistry และ immunophenotyping แต่ต้องเป็นผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา เนื่องจากการรักษาจะทำให้ลักษณะทาง morphology เปลี่ยนแปลงไป

1. <u>Acute myeloblastic leukemias (AML)</u>

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

2. Acute lymphoblastic leukemias (ALL)

L1 Lymphoblastic leukemia with homogeneity

L2 Lymphoblastic leukemia with heterogeneity

L3 Burkitt's type lymphoblastic leukemia

การย้อมสารชีวเคมีในเซลล์ (Cytochemistry stains)

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

Myeloperoxidase (MPO)

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

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

Sudan black B (SBB)

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

หลักการ เป็นการย้อมสีโดยตรงต่อ phospholipid ที่เป็น passive biochemical และคงตัวอยู่ได้นาน

Oil red O (ORO)

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

หลักการ เป็นการย้อมสีโดยตรงต่อ neutral fat ที่เป็น passive biochemical ที่ตงตัวอยู่ได้นาน

Specific esterase (SE) หรือ chloroacetate esterase

เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม lysosomal enzyme ที่พบใน azuophilic granules ของ myeloblasts ที่ค่อนข้างจะแก่แล้ว ขึ้นไป และอาจพบได้ใน erythroblasts ของโรค erythroleukemia หรือ erythremic-myelosis หรือ Di Guglielmo's syndrome (M6) พบว่า SE คือ isoenzyme ที่ 1, 2, 7, 8 และ 9 ของ esterases ซึ่งใน myeloblasts จะพบเพียง isoenzymes ที่ 2, 7 และ 9 เท่านั้น ใช้แยก myeloblasts ที่ติดสี ออกจาก monoblasts ที่ไม่ติดสี ในM4 และ M5

หลักการ คือ ES ทำปฏิกิริยากับ napthol AS-D chloroacetate (NASDCA) ที่ pH 7.4-7.6 ได้ halogenated naphthol ester แล้วทำปฏิกิริยากับ diazonium salt ได้ตะกอนสีแดงสด ถ้า ใช้ pararosaniline เป็น chromogen เห็นชัดเจนเมื่อ counter stain ด้วย methyl green ถ้าใช้ fast blue

BB แทน จะได้ตะกอนสีน้ำเงิน เห็นชัดเจนเมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin ข้อควรระวัง คือ SE ถูก inhibit ด้วย ปรอท กรด ความร้อน และ ไอโอดีน

Non-specific esterase (NSE)

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

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

Periodic acid shiff (PAS)

เป็นการย้อมสีโดยตรงกับ glycogen, mucoprotein, glycoprotein, glycolipid และ polysaccharide

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

Pussian blue stain (PB)

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

หลักการ คือ hemosiderin ทำปฏิกิริยากับ ferocyanide ได้ ferric-ferocyanide สีน้ำเงิน เห็นชัดเจนเมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin พบว่า hemosiderin เป็น passive biochemical ที่คงตัวอยู่ได้นาน

Acid phosphatise (ACP)

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

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

Leukocyte alkaline phosphatase (LAP)

เป็นเอนไซม์ที่พบใน granule ของ PMN อาจพบได้ตั้งแต่ระยะ promyelocyte ขึ้นมาจนถึง PMN แต่จะไม่พบในเซลล์ ของ series อื่น ๆ

หลักการ คือ LAP สามารถตัด naphthol ออกจาก naphthol-phosphate ที่ใช้เป็น substrate แล้วนำไปรวมกับ diazonium salt ได้ azo dye สีน้ำเงินดำ ที่ไม่ละลายน้ำ และมอง

เห็นชัดเมื่อ counter stain ด้วย neutral red หรือ safranin การอ่านผลให้ดู PMN จำนวน 100 ตัว ดูว่าแต่ละตัวติดสีมากน้อยเพียงใด ให้คะแนนจาก 0 (ไม่ติดสี) และ 1+, 2+ , 3+ ถึง 4+ ตามความเข้มของสีน้ำเงิน แล้วรวมคะแนนทั้งหมด LAP score ที่ต่ำกว่า 20 ใช้ยืนยัน CML แยกออกจาก leukemoid reaction (infection) ที่จะมี LAP score สูงกว่านั้นมาก คือ มากกว่า 150 โดยในคนปกติจะมี LAP score ประมาณ 50-150 คะแนน

การตรวจโปรตีนบนผิวของเซลล์ (Immunophenotyping)

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

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

การรักษา

1. การใช้ยาเคมีบำบัด คือการรักษาด้วยยากำจัดมะเร็ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

- Anti-metabolite ส่วนใหญ่เป็น purine หรือ pyrimidine antagonists ที่ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอนเอ จึงสามารถลดระดับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้

- Alkylating เป็นยาที่มี alkyl group ที่สามารถฆ่าเซลล์ได้ทั้ง resting และ proliferation stage ของทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์ปกติ

- Nucleotide analogue เป็นยาที่เกาะกับดีเอนเอ หรือ อาร์เอนเอ ได้ และมีการรบกวนการสังเคราะห์ทำให้ยับยั้งการแบ่งตัวได้

ในปัจจุบันนิยมการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันที่เรียกว่า multi-drug combination

2. การฉายแสงรังสี เป็นการใช้แสงรังสีเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะในไขกระดูก นิยมใช้ร่วมกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด

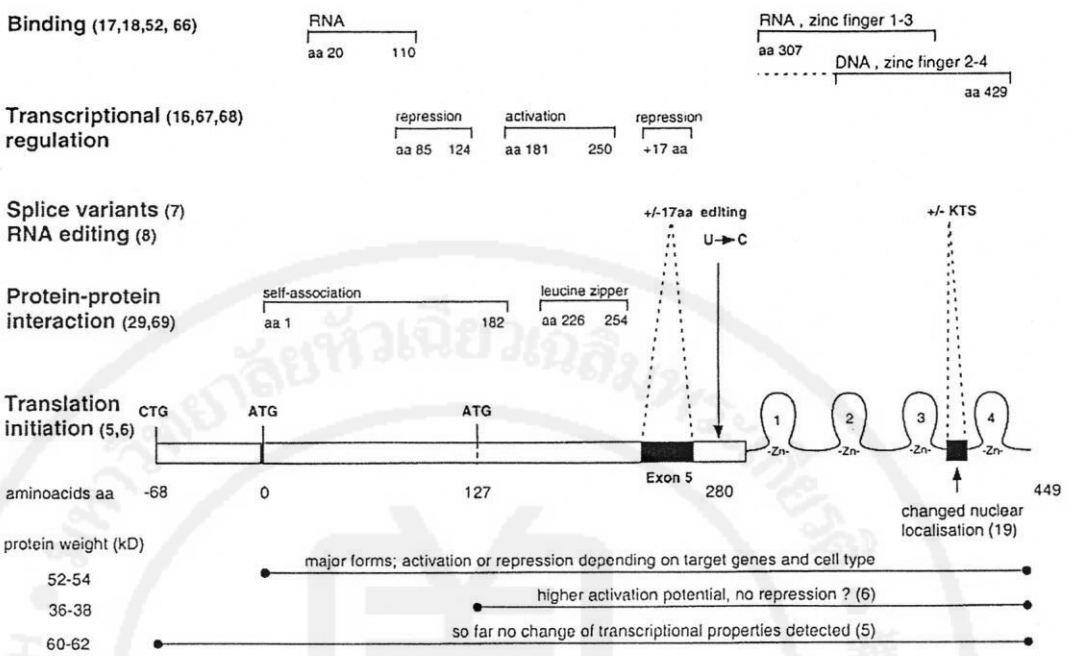
3. การปลูกถ่ายไขกระดูก สามารทำได้ทั้งแบบ autologous transplantation คือ การนำเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ของผู้ป่วยเองในขณะที่มี complete remission ออกมาทำการกำจัดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ให้เหลือน้อยที่สุด (minimal residual disease; MRD) แล้วจึงนำกลับเข้าไปเติมให้ผู้ป่วย ที่ผ่านการได้รับเคมีบำบัดและรังสีบำบัดอย่างรุแรงมาแล้ว เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ได้มากที่สุด หรืออาจทำแบบ allergic transplantation คือการนำเซลล์ต้นกำเนิด ของผู้บริจาคที่มี histocompatibility หรือ human leukocyte antigen (HLA) เหมือนกันกับผู้ป่วยมากที่สุด เพื่อที่จะได้มี graft rejection หรือ graft versus host น้อยที่สุด แหล่งที่จะเซลล์ต้นกำเนิดได้แก่ bone marrow, peripheral blood หรือ cord blood ก็ได้

4. Supportive treatment คือการรักษาตามอาการแบบประคับประคองอาการให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยเฉพาะในระยะท้าย ๆ ที่พยากรณ์โรคไม่ค่อยดีแล้ว

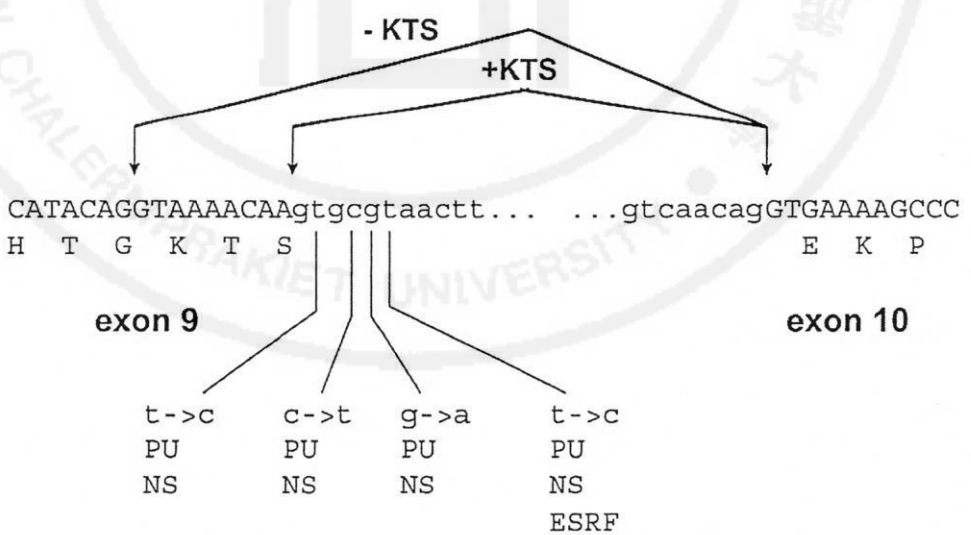
ยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1* gene หรือ *WT1*)

เป็นยีนที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี คศ. 1899 โดย Max Wilms ซึ่งในช่วงแรกได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งของไตในเด็กที่เรียกว่า Wilms' tumor หรือ nephroblastoma ต่อมา Call และคณะ (Call, et al., 1990 : 509-20) รวมทั้ง Gessler และคณะ (Gessler, et al., 1990 : 774-8) ได้ทำการศึกษาและพบว่ายีนวิล์มทูเมอร์วันนั้นมีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 และมีความยาวประมาณ 50 kb ซึ่งยีนนี้ประกอบไปด้วยส่วน exon ทั้งหมด 10 exons เมื่อเกิดกระบวนการ transcription จะได้ mRNA ที่มีขนาดประมาณ 3 kb และเมื่อเกิดกระบวนการ translation จะได้โปรตีนที่เรียกว่าวิล์มทูเมอร์วัน (Wilms' tumor 1;WT1) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 48 ถึง 55 kDa ขึ้นอยู่กับกระบวนการ RNA alternative splicing (Algar, et al., 1995 : 221-7; Haber, et al., 1991 : 9618-22; Laity, et al., 2000 : 5341-8), RNA editing (Sharma, et al., 1994: 720-31) และ translation initiation (Brueningand Pelletier, 1996: 8646-54) ที่เกิดขึ้น ซึ่งจากกระบวนการเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการมีหรือไม่มีส่วนของ exon ที่ 5 ซึ่ง เป็นส่วนที่ถอดรหัส ให้ได้กรดอะมิโน 17 ตัว (± 17 amino acids) และกรดอะมิโน 3 ตัวได้แก่ lysine, threonine และ serine (± KTS) ตรงบริเวณ exon ที่ 9 ระหว่าง zinc fingers ที่ 3 และ 4 (รูปภาพที่ 5) จากกระบวนการข้างต้นส่งผลให้ได้โปรตีนทั้งหมด 4 ชนิด (isoforms) ได้แก่ โปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่มีกรดอะมิโนครบทั้งหมดเป็น WT1(+/+) isoform หรือ wild type, วิล์มทูเมอร์วัน ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 3 ตัว (KTS) เป็น WT1 (+/-) isoform, วิล์มทูเมอร์วัน ที่ไม่มีกรดอะมิโน 17 ตัวเป็น WT1 (-/+) isoform และ วิล์มทูเมอร์วัน ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้ง 17 ตัว และ KTS เป็น WT1 (-/-) isoform โดยจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ด้วยวิธี Western blot จะพบแถบของโปรตีน 2 แถบด้วยกัน แถบด้านบนจะเป็นแถบของ WT1 (+/+) และ WT1 (+/-) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 ถึง 55 kDa ส่วนแถบด้านล่างเป็นแถบของ WT1 (-/+) และ WT1 (-/-) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 ถึง 49 kDa

ก



ข



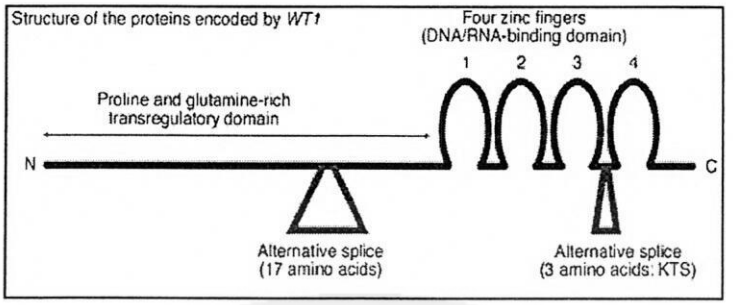
รูปภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* (ก) ในระดับ ดีเอนเอ, เอ็มอาร์เอนเอ และ (ข) โปรตีน

ที่มา: http://www.nature.com/leu/journal/v21/n5/images/2404624f1.jpg

จากการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ พบว่ายีนนี้ทำหน้าที่เป็นทูเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีน (tumor suppressor gene) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นพบว่ามีการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ที่สูงมากในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกลุ่มของ myeloid และ lymphoid cells (Inoue, et al., 1997 : 1405-12; Inoue, et al., 1994 : 3071-9; Inoue, et al., 1998 : 2969-76; Miwa, et al., 1992 : 405-9; Miyagi, et al., 1993 : 970-7) และจากการศึกษายังพบอีกว่าระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน นั้นแปรผกผันกับการทำนายอาการ (prognosis) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Bergmann, et al., 1997 : 435-43; Bergmann, et al., 1997 : 1217-25) รวมทั้งพบการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน*ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นโรคอีกครั้ง (relapse) (Inoue, et al., 1998 : 2969-76) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Yamagami และคณะ (Yamagami, et al., 1996 : 2878-84) ยังพบว่าการใช้ WT1 anti-sense สามารถที่จะลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Menssen และคณะ (Menssen, et al., 1995 : 1060-7) ได้กล่าวถึงถึงเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มต่าง ๆ พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloblastic leukemia (AML), pre B-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ T-cell acute lymphoblastic leukemia คือร้อยละ 93, 86, 80 และ 74 ตามลำดับ ซึ่งจากความรู้ทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นทำหน้าที่เป็นอองโคยีน (oncogene) มากกว่าทูเมอร์ซับเพลสเซอร์ยีน โดยการศึกษาการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* นั้นทำได้หลายวิธีด้วยกันเช่น การใช้ Western blot analysis (Miwa, et al., 1992 : 405-9; Miyagi, et al., 1993 : 970-7), Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Dumur, et al., 2002 : 127-36; Faderl, et al., 1999 : 207-19; Gaiger, et al., 1998 : 1886-94; Inoueand Sugiyama, 1995 : 552-8; Inoue, et al., 1994 : 3071-9) เป็นต้น โดยการศึกษาทั้งหมด พบว่าการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* เพิ่มขึ้น

อย่างชัดเจนในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ในขณะเดียวกันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน พบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน นั้นทำหน้าที่เป็น transcription factor ให้กับยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเช่น Egr-1, PDGF-A, Bcl-2 และ c-Myc เป็นต้น (Han, et al., 2004 : 6933-41) ซึ่งส่งผลให้กลไกในการควบคุมการเกิดเซลล์มะเร็งเสียไป ดังนั้นจากผลการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วทำให้สามารถใช้การแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เป็นดัชนีบ่งชี้ (marker) สำหรับตรวจหาความรุนแรง (severity) และพยากรณ์โรค (prognosis) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวรวมไปถึงสภาวะที่เกี่ยวข้องเช่น minimal residual disease (MRD) ได้ (Bader, et al., 2004 : 25-8; Fu, et al., 2000 : 211-215; Gomez, et al., 2005 : 315-24; Gu, et al., 2004 : 728-31)

Ye และคณะ (Ye, et al., 1996 : 5606-15) พบว่าการเกิด phosphorylation ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่ PKC และ PKA บริเวณ C-terminal domain ของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* มีผลยับยั้งการทำงานของ protein-DNA binding ในการทำหน้าที่เป็น tumor suppressor นอกจากนี้ Bentov และคณะ (Bentov, et al., 2003 : 4276-9) พบว่า insulin-like growth factor I หรือ IGF-I สามารถลดการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ในกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยการส่งสัญญาณผ่านทางด้าน MAPK pathway ต่อมา Ito และคณะ (Ito, et al., 2006 : 4217-29) ได้ทำการศึกษาหน้าที่ของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ชนิด 17AA(+) ในการยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งชนิด K562 พบว่าในการทำงานของยีน ต้องอาศัยส่วนของ DNA-binding zinc-finger ในการทำหน้าที่ดังกล่าวด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ายีน*วิล์มทูเมอร์วัน* ชนิด 17AA(+)KTS(-) สามารถยับยั้งการทำงานของ proapoptotic Bax ในส่วน upstream mitochondria ของกระบวนการ intrinsic pathway



รูปภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างของการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน

ที่มา: http://dc476.4shared.com/doc/bSoSTzqw/preview_html_m47a42da4.png

มะรุม

มะรุม มีชื่อสามัญว่า Horse radish tree มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. อยู่ในวงศ์ Moringaceae ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านที่มีทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งมีการเรียกชื่อแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น คำว่ามะรุมนี้ เป็นคำเรียกขานของคนภาคกลาง ในขณะที่ภาคอีสานเรียกว่า "ผักอีฮุม หรือ บักฮุ้ม" ส่วนภาคเหนือเรียกว่า "บะค้อนก้อม" และชาวกะเหรี่ยงแถบกาญจนบุรีเรียกว่า "กาแน้งเดิง" ด้านชายขอบจังหวัดแม่ฮ่องสอนให้ชื่อว่า "ผักเนื้อไก่" ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะรุม คือเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 3-4 เมตร ทรงต้นโปร่ง ใบเป็นแบบขนนกคล้ายกับใบมะขามออกเรียงแบบสลับ ผิวใบด้านล่างสีอ่อนกว่าด้านบน ดอกออกเป็น ช่อสีขาว ดอกมี 5 กลีบ ฝักมีความยาว 20-50 เซนติเมตร ลักษณะเหมือนไม้ตีกลอง เป็นที่มาของชื่อต้นไม้ตีกลองในภาษาอังกฤษ (drumstick Tree) เปลือกฝักอ่อนสีเขียวมีส่วนคอดและส่วนมนเป็นระยะตามความยาวของฝัก เปลือกฝักแก่มีสีน้ำตาล เมล็ดมีเยื่อหุ้มลักษณะกลมมีสีน้ำตาล เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร

รูปภาพที่ 7 ต้นมะรุมไทย

ที่มา: http://cdn.gotoknow.org/assets/media/files/000/664/234/large_CIMG37511.JPG?1293198973

มะรุมกันคนไทยมีสัมพันธ์กันยาวนาน โดยสมัยก่อนมะรุมถูกนำมาใช้ในตำรายาพื้นบ้าน สรรพคุณของมะรุมในตำรายาพื้นบ้านโดยใบมะรุมถูกใช้เป็นยาพอกแผลช่วยห้ามเลือด ทำให้นอนหลับ เป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ และช่วยแก้ไข้ ใช้ส่วนดอกและผลเป็นยาบำรุง ขับปัสสาวะ และแก้ไข้ ใช้ส่วนเมล็ดบดพอกแก้ปวดตามข้อ และแก้ไข้ นอกจากนี้สารสกัดน้ำและเอทานอลของใบมะรุม สารสกัดเอทานอลของผลและฝัก สารในกลุ่ม glycosides ในสารสกัดเมทานอลของฝักแห้งและเมล็ด แสดงฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูแรท (มะรุม. 2012 : ออนไลน์) และจากการทดลองในหนูพบว่า หนูที่ได้รับฝักมะรุมเป็นโรคมะเร็งผิวหนังจากการกระตุ้นน้อยกว่ากลุ่มทดลอง และในกลุ่มที่กินมะรุมเกิดเนื้องอกบนผิวหนังน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (สรรพคุณของมะรุม. 2012 : ออนไลน์)นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดน้ำและเอทานอลของใบมะรุมสามารถลดความดันโลหิต และควบคุมระดับน้ำตาล (antidiabetic) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ต้านการติดเชื้อ (anti-infection), และ ลดไขมัน (antihyperlipidemic) (Chumark, et al., 2008 : 439-46; Ndong, et al., 2007 : 229-33; Ouedraogo, et al., 2013 : 335-9; Singh, et al., 2009 : 1109-16; Verma, et al., 2009 : 2196-201) นอกจากนี้ใบมะรุมยังอุดมไปด้วย เบต้าแคโรทีน โปรตีน ไวตามินซี แคลเซียม และ โปรแตสเซียม

นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย เช่น กรดแอสคอบิก, ฟลาโวนอยส์, ฟีนอลิค และ คาโรทีนอยด์เมล็ดแก่สามารถบีบน้ำมันออกมากินได้ (สรรพคุณของมะรุม. 2012 : ออนไลน์) นอกจากนี้งานวิจัยในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลองพบว่า มะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากมาย เช่น ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ต้านการเกิดเนื้องอก ต้านมะเร็ง (คือ สารที่ชะลอการแบ่งตัว หรือยับยั้งจนหยุดการโตของเซลล์มะเร็ง) ลดระดับคอเลสเตอรอล ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ป้องกันตับอักเสบ ต้านออกซิเดชัน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดระดับน้ำตาล และฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยังมีรายงานว่าสารประกอบที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิดใหญ่ คือ Crypto-chlorogenic acid, isoquercetin, and astragalin (Vongsak, et al., 2013 : 1-10) โดย Chlorogenic acid และอนุพันธ์ของมัน สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ลดระดับการสะสมไขมันในตับ ลดความอ้วน และยับยั้งการอักเสบของปอดแบบเฉียบพลัน (Cho, et al., 2010 : 937-43; Nakatani, et al., 2000 : 5512-6; Rodriguez de Sotilloand Hadley, 2002 : 717-726; Zhang, et al., 2010 : 746-52) ส่วน isoquercetin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ Astragalin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบทางด้านผิวหนัง (Kotani, et al., 2000 : 159-66; Soromou, et al., 2012 : 256-61)

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยพยายามค้นคว้าและวิจัยหาสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษามะเร็ง โดยมีแนวความคิดว่าสารสกัดจากธรรมชาติจะมีความปลอดภัย และลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยเคมีบำบัดซึ่งมีผลข้างเคียงกันเซลล์ปกติคนไข้เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติเป็นพืช ผักสมุนไพร ที่รับประทานหรือเป็นองค์ประกอบในอาหารซึ่งรับประทานในชีวิตประจำวัน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีความสนใจสารสกัดที่ได้มาจากอาหารที่บริโภคกันเป็นประจำ เช่น ขมิ้น มะรุม พริก ขิง พริกไทย และกระเทียม เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์แอนติออกซิเดนและต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบมะรุมต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ซึ่งรายละเอียดของการศึกษาในส่วนของมะเร็งนั้นยังมีน้อยมากในปัจจุบัน โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดในการหาโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและนำไปสู่องค์ความรู้ในศึกษากลไกการทำงาน และสู่การผลิตเป็นยาต้านมะเร็ง ซึ่งจะเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชผักพื้นบ้าน

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สารเคมี

สารเคมีและน้ำยาที่ถูกใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ถูกระบุไว้ในภาคผนวก

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ซึ่งงานวิจัยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ฉายสุรีย์ ศุภวิไล สถานบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Invitrogen, USA) ที่มี fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% FBS), HEPES (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, 1 มิลลิโมลาร์ ของ L-glutamine (Invitrogen, USA) 100 ยูนิต/มิลลิลิตร ของ penicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ streptomycin (Invitrogen, USA) และมี pH 7.2–7.4 โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (5%CO_2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) และความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 95

3.3 การเตรียมสารสกัดหยาบมะรุม

นำมะรุมส่วนใบ เมล็ด และฝัก มาอบแห้ง ด้วยตู้อบโดยใช้อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95% ethanol) โดยใช้วิธีการหมัก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเพื่อแยกเอากากออก แล้วนำสารละลายที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้น และทำการกำจัดตัวทำละลายบางส่วนโดยการระเหย (evaporation) ด้วยเครื่อง evaporator จะได้ส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบ (crude extraction) ออกมา นำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% FBS), HEPES ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, 1 มิลลิโมลาร์ ของ L-glutamine, 100 ยูนิต/มิลลิลิตร ของ penicillin, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ streptomycin และมี pH 7.2–7.4 โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 95 ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ให้ได้ปริมาณร้อยละ 80 จากนั้นปั่นล้างเซลล์ทั้งหมดด้วย sterile PBS ด้วยความเร็วรอบ 300xg เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer โดยคำนวณ จากสูตรดังนี้คือ

ปริมาตรเซลล์ = N x Cv x Cd (เซลล์ต่อไมโครลิตร)

โดยที่ N คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้

Cv คือ ค่า correction factor ของปริมาตร

Cd คือ ค่า correction factor ของ dilution

โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24 -well plate) จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อหลุม ทำการเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 95 หลังจากนั้นเก็บเซลล์มานับหลุมละวัน เป็นเวลานาน 10 วัน

การทดลองที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะรุมต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% FBS), HEPES ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, 1 มิลลิโมลาร์ ของ L-glutamine, 100 ยูนิต/มิลลิลิตร ของ penicillin, 100 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร ของ streptomycin และมี pH 7.2–7.4 โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 95 ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ให้ได้ปริมาณร้อยละ 80 ของ confluence จากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์ทั้งหมดด้วย sterile PBS ด้วยความเร็วรอบ 300xg เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer โดยคำนวณ จากสูตรดังการทดลองที่ 1 หลังจากนั้นปรับปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ให้ได้เท่ากับ 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 95 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมสารสกัดมะรุม ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเจือจาง ให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารทั้งหมดเท่ากับ 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำมาเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเป็น 1,000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ตามลำดับ และนำไปบ่มที่ตู้ซึ่งมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่อยู่ในจานเลี้ยงเซลล์ ออกทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย MTT ลงไปทุกหลุม ๆ ละ 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อในตู้อบที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการคว่ำจานเลี้ยงเซลล์ เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์และสารละลาย MTT ส่วนเกิน ที่อยู่ในหลุมออกให้หมดและให้เหลือแต่เพียงผลึก formazan ที่ก้นหลุมเท่านั้น จากนั้นเติม DMSO ลงไปทุกหลุม ๆ ละ 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 620 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาทำการคำนวณหาร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Cell viability) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\text{Cell viability} = \frac{\text{OD ของหลุมทดสอบ} \times 100}{\text{OD ของหลุม vehicle control}}$$

ทำการหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ ในสารที่ทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำมาสร้างเป็นเส้นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ กับปริมาณความเข้มข้นของสาร แล้วทำการวัดค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ร้อยละ 50 (inhibitory concentration หรือ IC_{50}) (Anuchapreeda, et al., 2006 : 360-6; Semsri, et al., 2011 : 2235-42)

การทดลองที่ 3 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่างๆ โดยวิธี ดีพีพีเอช (DPPH)

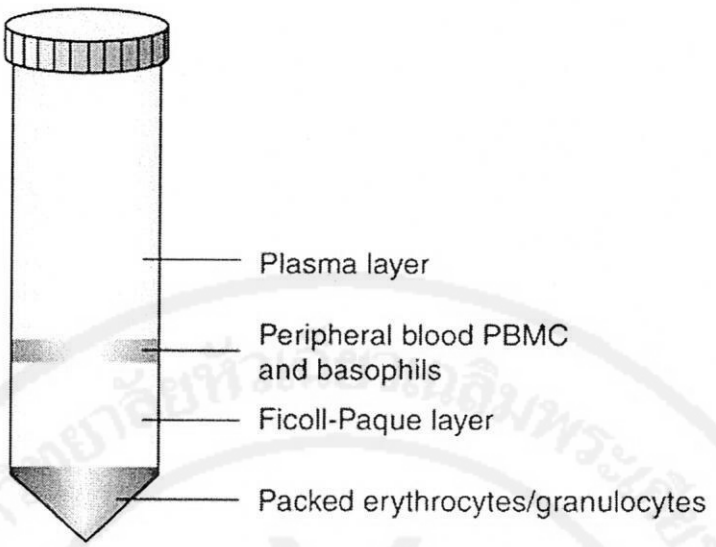
ทำการวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระในสารสกัดมะรุมส่วนใบ เมล็ด และฝัก ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA) โดยทำการเตรียมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ในเอทานอล จากนั้นเตรียมสารสกัดมะรุมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการเจือจางเป็น 2 เท่า ลงมาเรื่อยๆ ทั้งหมด 15 ระดับ จากนั้นเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 หลุม จำนวนหลุมละ 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH working solution) จำนวน 180 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นรอให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบรูณ์ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่า (ELISA) คำนวณหาค่า %Inhibition จากค่า absorbance ที่ได้ จากสูตรดังนี้

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\text{ABS control} - \text{ABS sample})}{\text{ABS control}} \times 100$$

หลังจากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่า %Inhibition กับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง และหาค่า IC_{50} จากกราฟของสารละลายตัวอย่าง

การทดลองที่ 4 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดมะรุมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวปกติ (peripheral blood mononuclear cell หรือ PBMC) ได้รับจริยธรรมการวิจัยเลขที่ อ. 075/2554

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดมะรุมที่สกัดได้จากห้องปฏิบัติการคือ เอทานอล ต่อเซลล์ PBMC การเตรียม PBMC เตรียมโดยการเจาะเลือดจากอาสาสมัครผู้มีสุขภาพดีปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาแยก PBMC โดยใช้ Ficoll-Hypaque โดยเลือดปกติที่ใช้ต้องทำการเติม heparin (5,000 ไอ.ยู. (i.u.)/มิลลิลิตร) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ต่อเลือด 10 มิลลิลิตร (final conc. = 100 i.u.) เพื่อกันการแข็งตัวของเลือด หลังจากนั้นทำการเติม PBS, pH 7.3 เพื่อลดความหนืดของเลือด ในอัตราส่วนของเลือดต่อ PBS เท่ากับ 1:1 หลังจากนั้นทำการ under layer ด้วย Ficoll-Hypaque ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทำการปั่นที่ความเร็ว 140xg เป็นระยะเวลา 30 นาที จะได้ชั้นที่เป็น PBMC แยกออกมา (รูปภาพที่ 8) ให้ทำการดูดเซลล์ของชั้นนั้นมาทำการล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 100xg รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด และกำจัดเกล็ดเลือด เมื่อได้เซลล์มาแล้ว ให้เริ่มต้นจากการเตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้น 1.0 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะได้ปริมาณเซลล์สุดท้ายเท่ากับ 1.0 x 10^5 เซลล์ต่อหลุม ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 คืน หลังจากทำการเติมสารสกัดหยาบมะรุม ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์ dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) เท่ากับความเข้มข้นสุดสูงของชุดทดสอบ ลงไปในหลุมของชุดควบคุม (vehicle control) หรือหลุมที่ไม่มีสารทดสอบผสมอยู่ โดยร้อยละของ DMSO ไม่ควรเกินร้อยละ 2 หลังจากนั้นบ่มเซลล์ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT (Sigma-Aldrich) ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มเซลล์ต่อในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการคว่ำจานเลี้ยงเซลล์ เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์และสารละลาย MTT ส่วนเกิน ที่อยู่ในหลุมออกให้หมดและให้เหลือแต่เพียงผลึก formazan ที่ก้นหลุมเท่านั้น หลังจากนั้นเติม DMSO ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อทำการละลายผลึก formazan นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และใช้ 620 นาโนเมตร เป็นตัวอ้างอิง ด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่า (ELISA) คำนวณร้อยละอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยเทียบกับหลุมที่เป็นชุดควบคุมโดยกำหนดให้หลุมที่เป็นชุดควบคุมมีร้อยละของการมีชีวิตเป็นร้อยละ ดังสมการในการทดลองที่ 2



รูปภาพที่ 8 การแยก PBMC ด้วย Ficoll hypaque

ที่มา: http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n6/full/nprot.2006.340.html

การทดลองที่ 5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทู-เมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.8 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุม หลังจากนั้นทำการสกัดโปรตีนด้วยน้ำยาสกัดโปรตีน RIPA จากนั้นทำการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ ด้วยวิธี Folin-Lowry ต่อมาจึงนำโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละการทดสอบปริมาณ 50 ไมโครกรัม มาทำการศึกษาโดยวิธี Western blot (แยกโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose จะถูก block nonspecific binding site ด้วยร้อยละ 5 nonfat dry milk) ซึ่งตรวจสอบโดยใช้ rabbit polyclonal anti-WT1 antibody (Santa Cruz Biotechnolygy, USA) และ goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Promega, USA) ตามลำดับ จากนั้นทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal® West Pico Trial Kit (PIERCE, USA) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray (PIERCE, USA) ผลที่ได้นำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้เครื่อง scanning densitometer นอกจากนี้ยังทำการควบคุมปริมาณของโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง

ได้ใช้ rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnolygy, USA) และ goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Promega, USA) ตามลำดับ เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน GAPDH ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมปริมาณโปรตีนในการทดลองนี้ จากการทดลองนี้จะได้แถบโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และ GAPDH ที่มีขนาดเท่ากับ 48 ถึง 52 กิโลดาลตัน (kDa) และ 37 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

การแปลผลการทดลองทั้งหมด

1. ผลจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยประเมินจากค่า IC_{50} เปรียบเทียบชุดควบคุม
2. การประเมินปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบมะรุม
3. ทำการประเมินผลของสารสกัดหยาบมะรุมต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน
4. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อบ่งบอกความแตกต่างของข้อมูล จากการศึกษาผลการทดลองที่ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (3 time independent study) โดยค่า mean ± SEM ที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p<0.05$

บทที่ 4

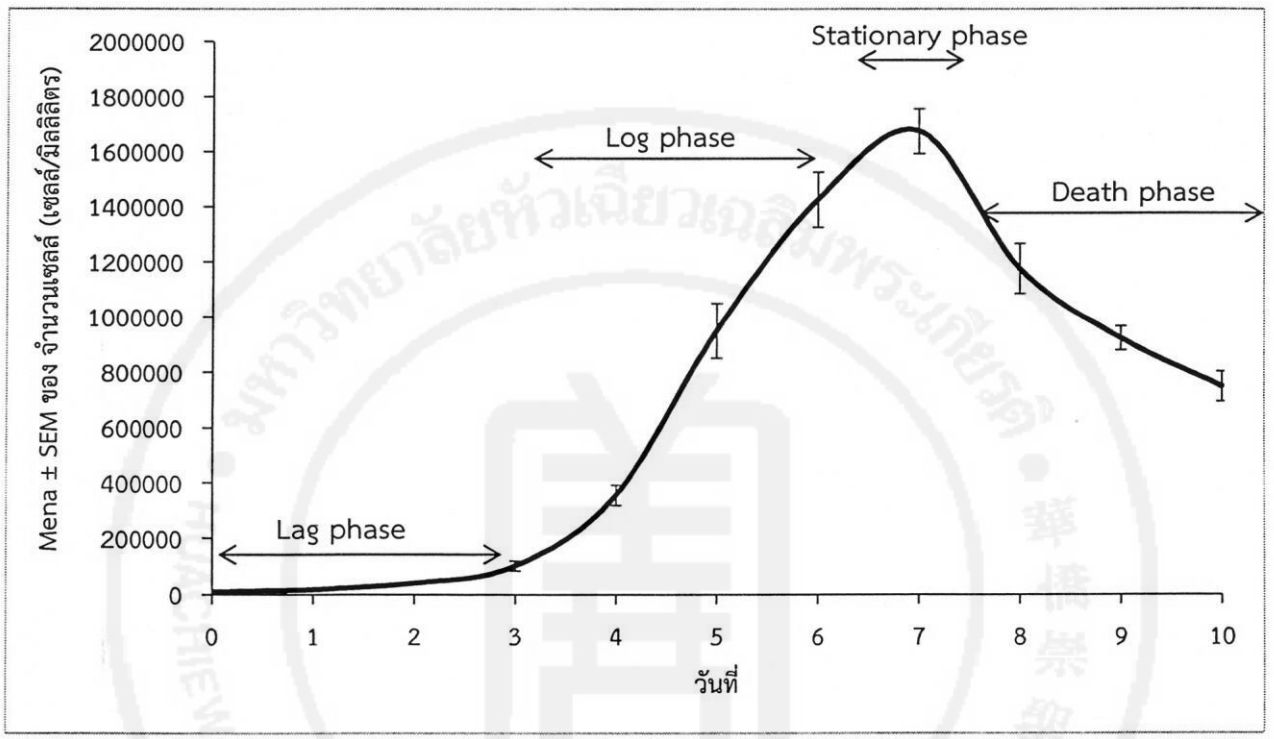
ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

ศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์นาน 10 วัน นับจำนวนเซลล์แต่ละวันด้วยวิธี Trypan blue exclusion แสดงจำนวนของเซลล์ในแต่ละวันตามที่แสดงดังตารางที่ 1 และรูปภาพที่ 9 ทั้งนี้ใช้ค่าการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นจุดเริ่มต้นของการเตรียมเซลล์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่เหมาะสมเพื่อใช้ในทำการทดลอง พบว่าจำนวนเซลล์ที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไปคือช่วงจำนวนเซลล์ที่อยู่ใน log phase คือช่วงวันที่ 3 ถึงวันที่ 6 ดังแสดงในรูปภาพที่ 9

ตารางที่ 1. แสดงจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ในระยะเวลา 10 วัน

วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	1	2	3	Mean ± SEM
0	10000	10000	10000	10000 ± 0
1	17778	18000	13000	16259 ± 1998
2	41111	45000	50000	45370 ± 3151
3	101111	110000	150000	120370 ± 18417
4	355000	360000	450000	388333 ± 37810
5	950000	970000	1200000	1040000 ± 98249
6	1425000	1500000	1700000	1541667 ± 100535
7	1675000	1720000	1500000	1631667 ± 82196
8	1175000	1250000	1000000	1141667 ± 90728
9	925000	900000	810000	878333 ± 42775
10	750000	700000	600000	683333 ± 54014



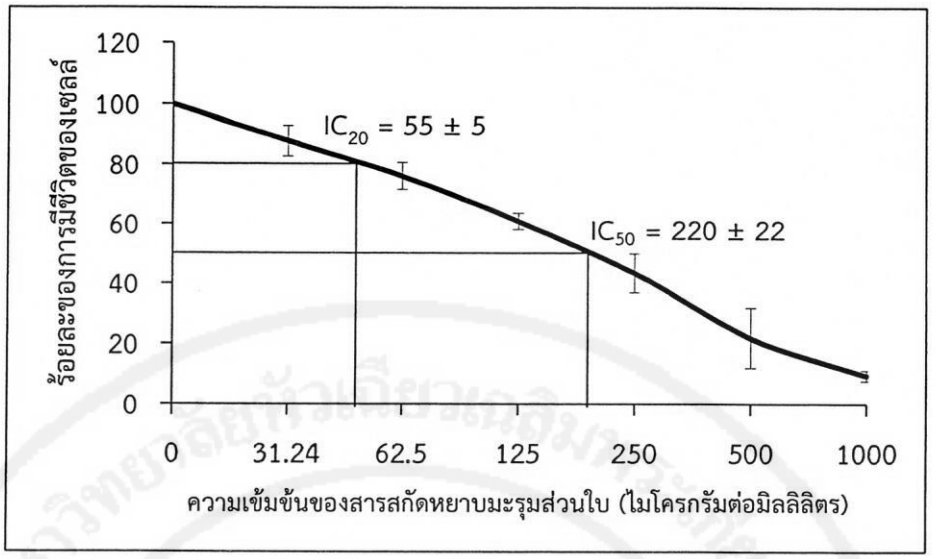
รูปภาพที่ 9 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ในระยะเวลา 10 วัน

4.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ต่อของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

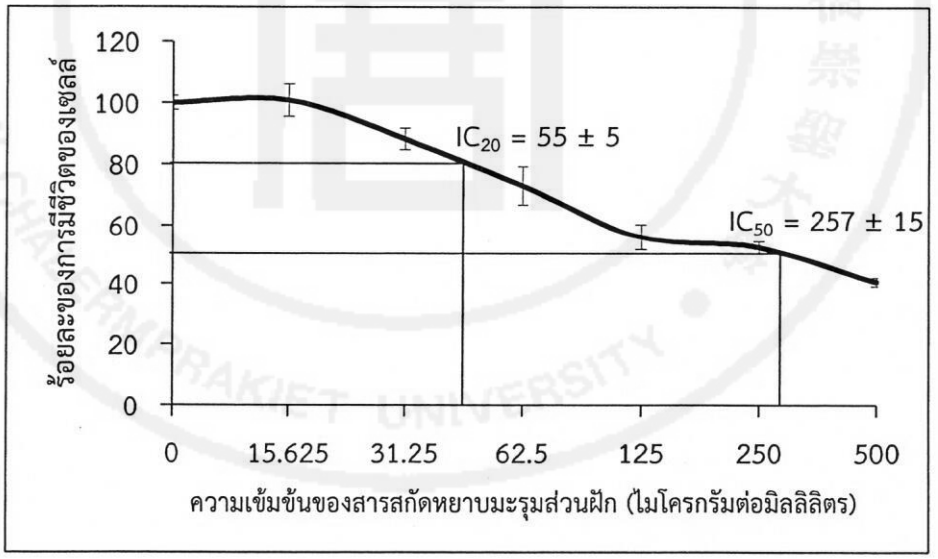
ศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมจากต่าง ๆ (ใบ เมล็ด และ ฝัก) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยวิธีเอ็มทีที (MTT) จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมที่ความเข้มข้น 55 ± 5 (ค่าเฉลี่ย ± SEM) ทั้งในส่วนใบและฝัก ในขณะที่สารสกัดหยาบมะรุมส่วนเมล็ดใช้ความเข้มข้น 686 ± 10 สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 มีชีวิตรอดได้ร้อยละ 80 (IC_{20}) ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบที่ 220 ± 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝักที่ 257 ± 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยสามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 มีชีวิตรอดได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบมะรุมส่วนเมล็ดต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงจะสามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 มีชีวิตรอดได้ร้อยละ 50 ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปภาพที่ 10 ถึง รูปภาพที่ 12 ดังนั้นสารสกัดหยาบมะรุมส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 คือ สารสกัดหยาบมะรุมส่วนที่ได้จากใบและฝัก

ตารางที่ 2 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมจากส่วนใบ เมล็ด และฝัก ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

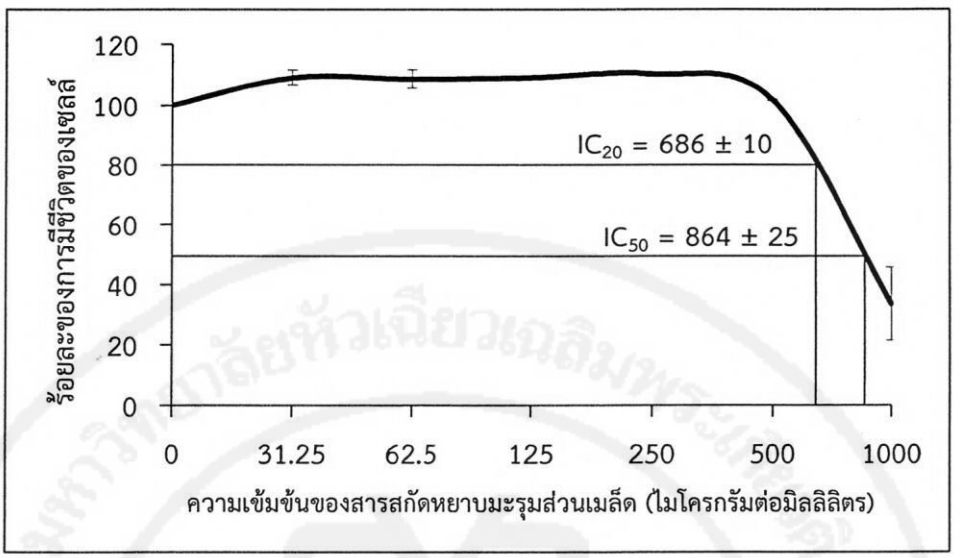
สารสกัดมะรุมจากส่วน	ความเข้มข้นของสารกสัดหยาบมะรุมที่มีความเป็นพิษต่อของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	20 (IC_{20})	50 (IC_{50})
	Mean ± SEM	Mean ± SEM
ใบ	55 ± 5	220 ± 22
เมล็ด	686 ± 10	864 ± 25
ฝัก	55 ± 5	257 ± 15



รูปภาพที่ 10 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี MTT



รูปภาพที่ 11 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝักต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี MTT



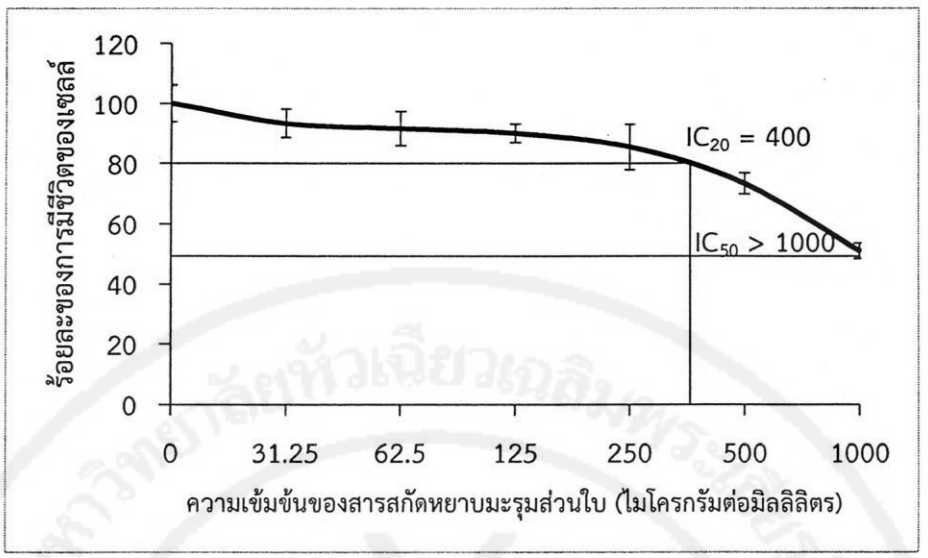
รูปภาพที่ 12 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนเมล็ดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี MTT

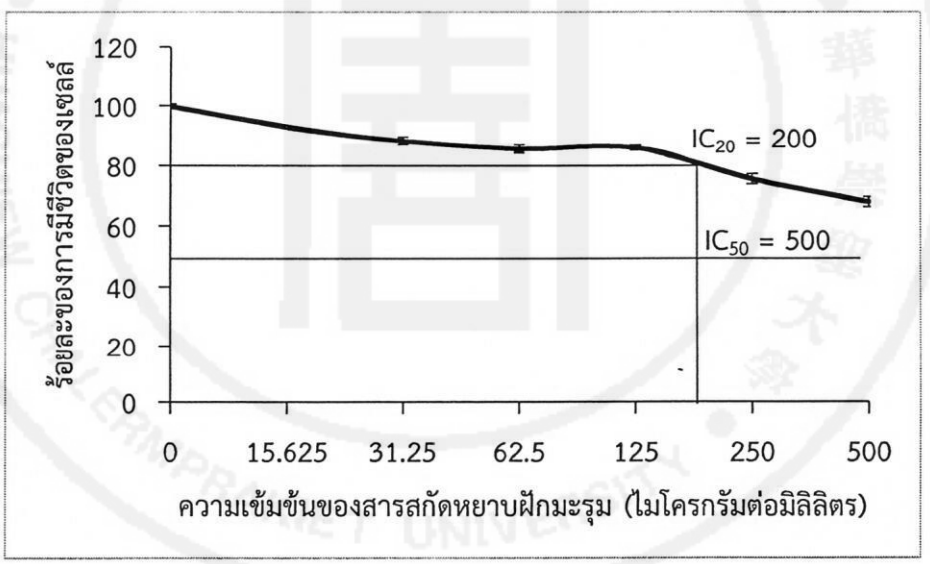
4.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) ด้วยวิธี MTT

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 พบว่า สารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝักมีความฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562 ดีที่สุด เมื่อนำสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดมะรุมส่วนใบ และฝักที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562 นั้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติทั้ง 5 ราย ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปภาพที่ 13 ถึงรูปภาพที่ 17

ตารางที่ 3 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC)

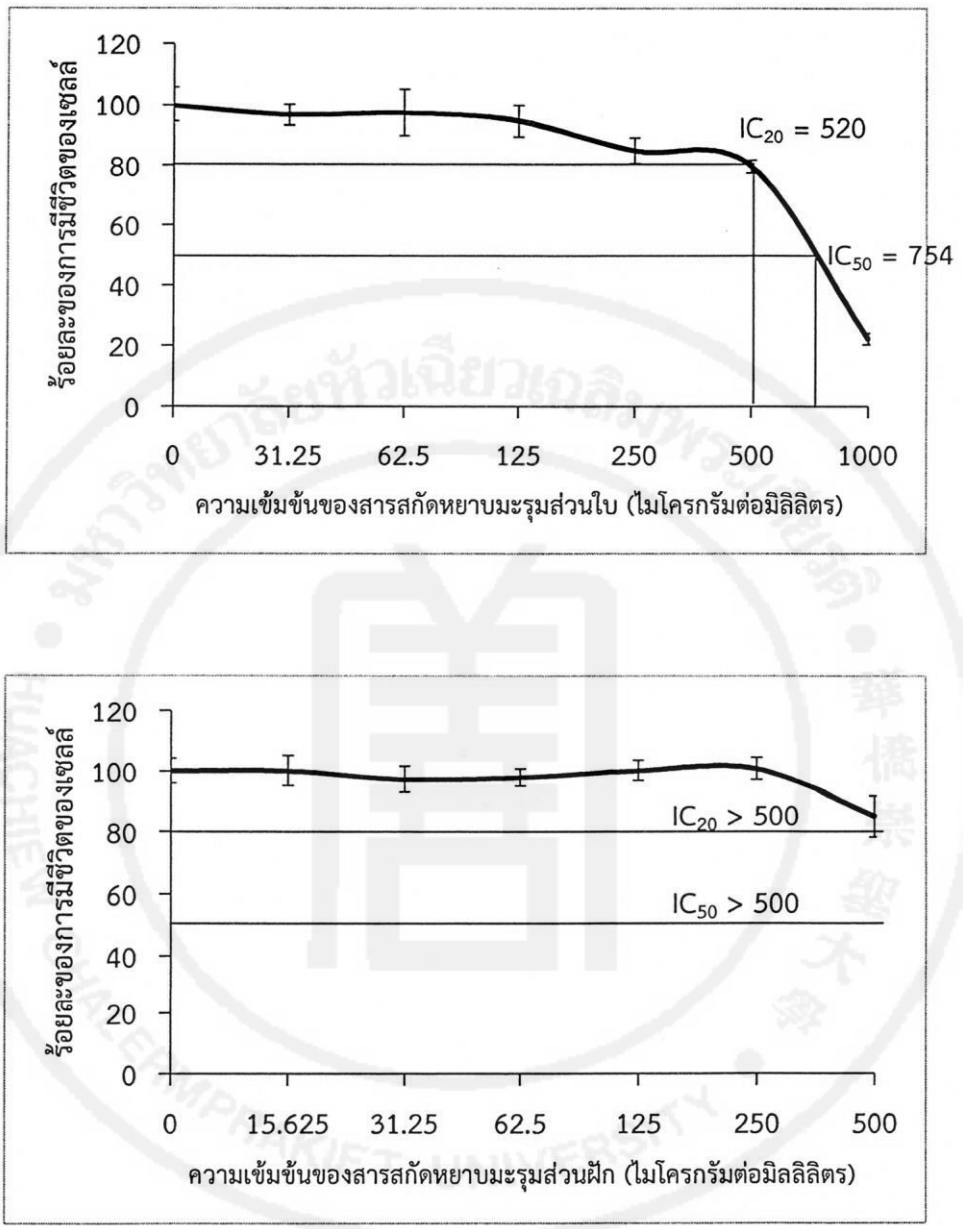
การทดลอง	PBMC 1		PBMC 2		PBMC 3		PBMC 4		PBMC 5	
	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}
ใบมะรุม	400	>1000	520	754	470	780	440	>1000	610	>1000
ฝักมะรุม	200	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500





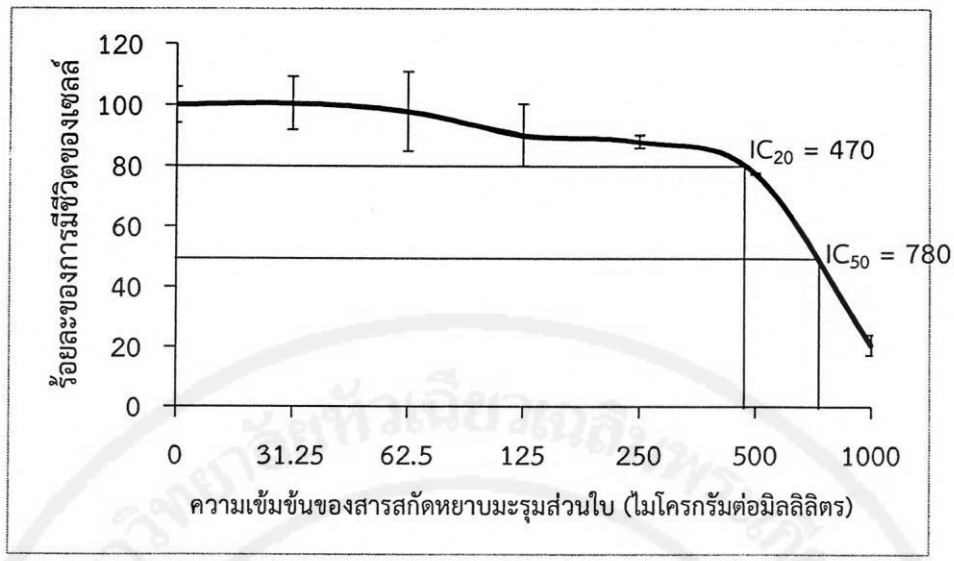
รูปภาพที่ 13 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวคนนิวเคลียสเดี่ยวปกติ (PBMC) รายที่ 1 โดยวิธี MTT

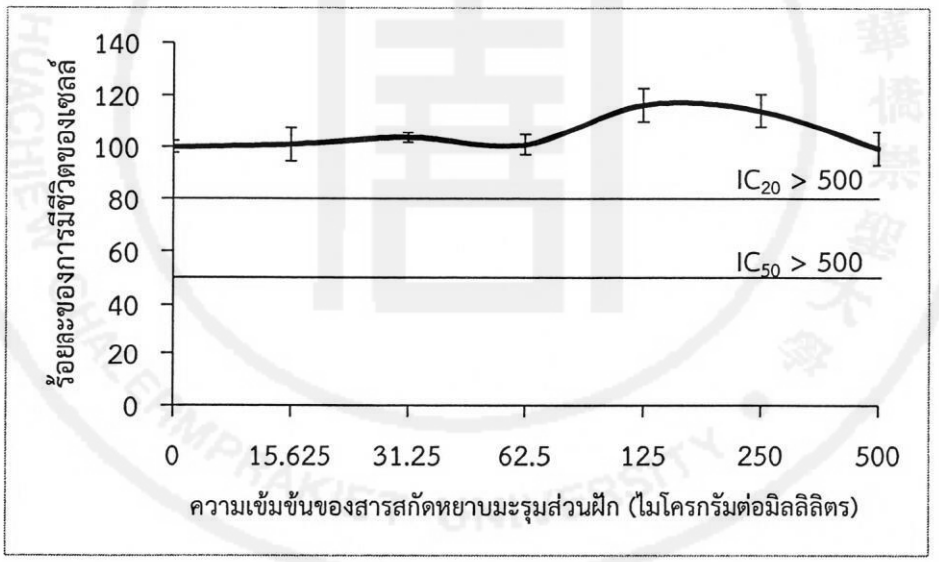
ศูนย์บรรณสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ



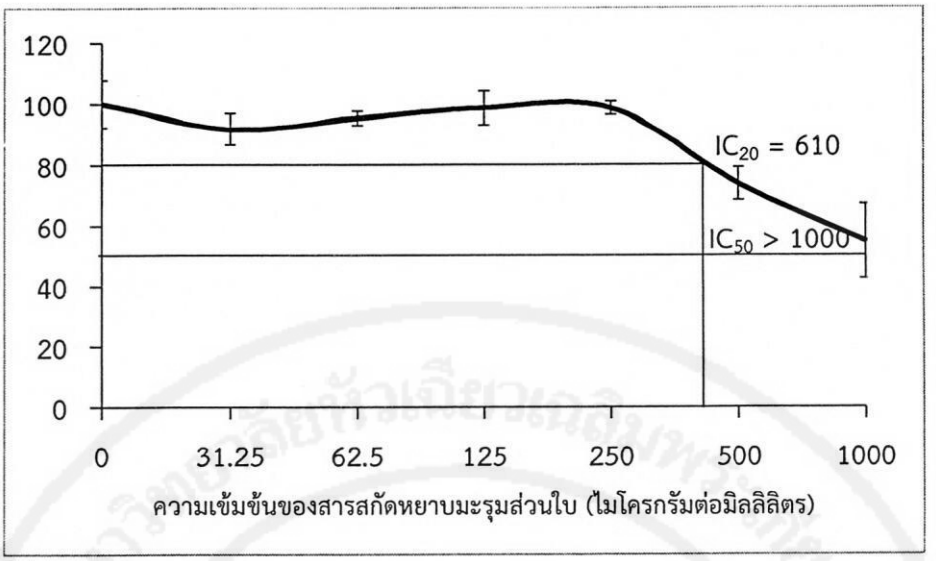
รูปภาพที่ 14 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วน และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) รายที่ 2 โดยวิธี MTT

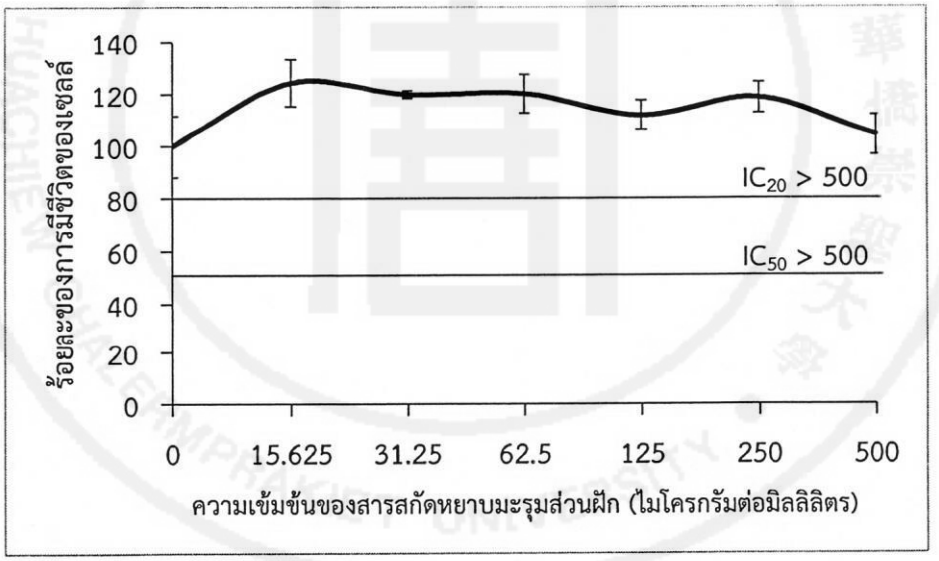
มฉก
ก๑
ส๔๖๓ก
๒๕๕๖



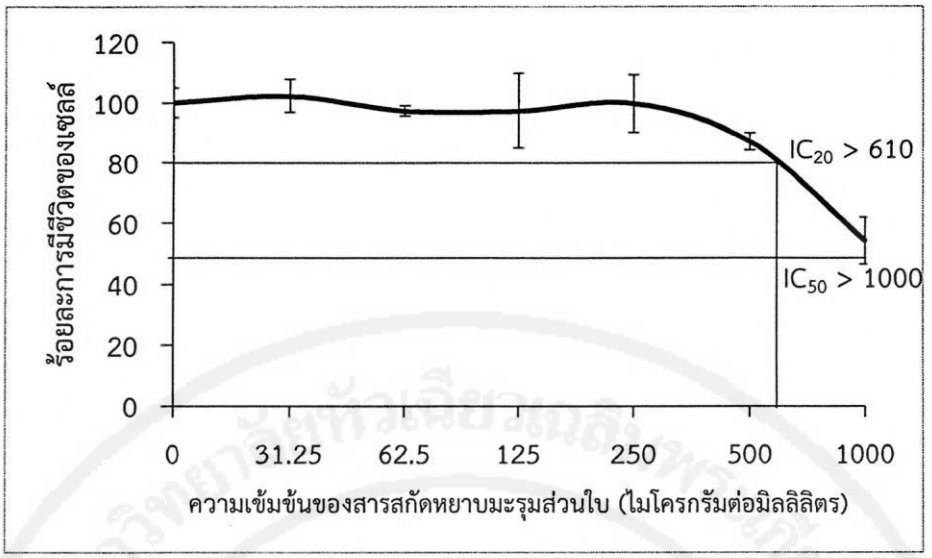


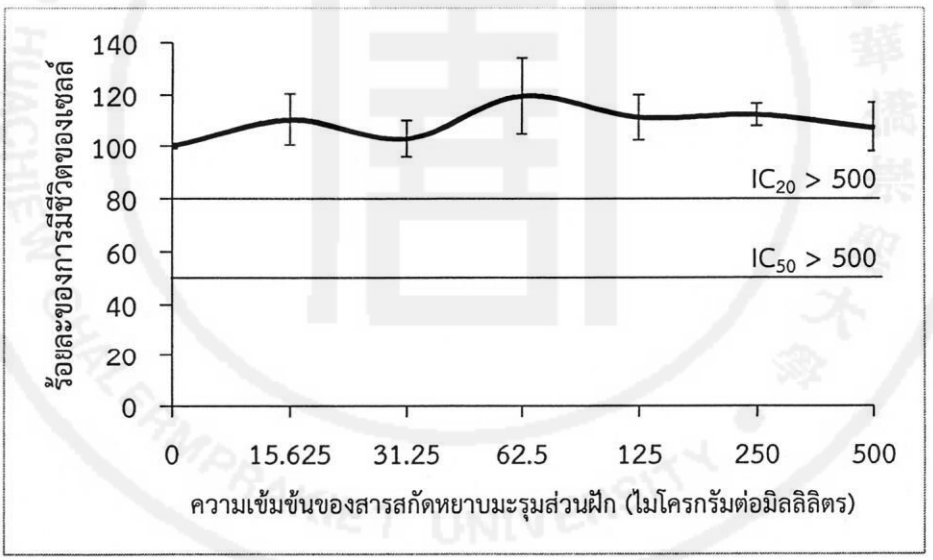
รูปภาพที่ 15 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) รายที่ 3 โดยวิธี MTT





รูปภาพที่ 16 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) รายที่ 4 โดยวิธี MTT





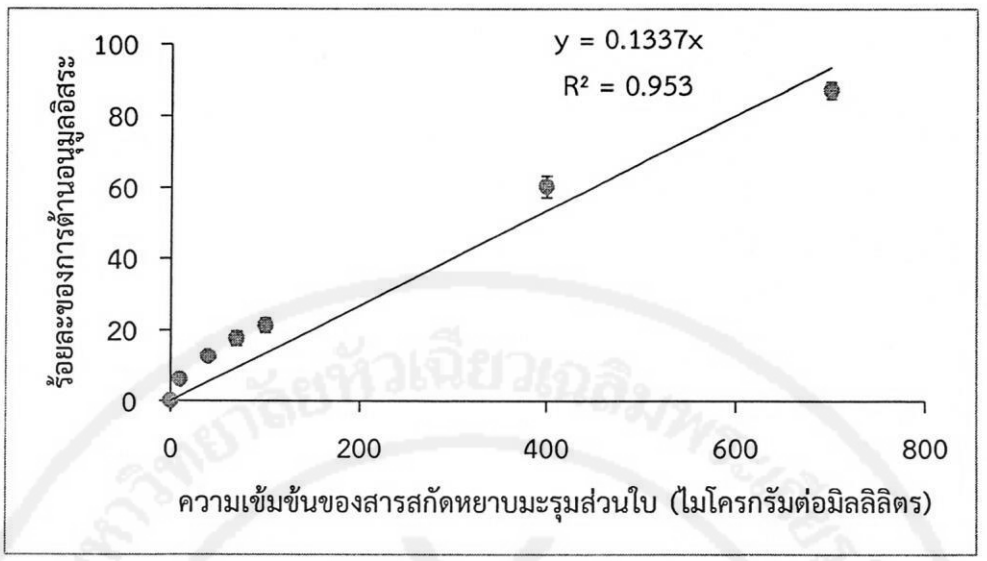
รูปภาพที่ 17 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) รายที่ 5 โดยวิธี MTT

4.4 การศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)

ศึกษาถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก โดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปภาพที่ 18 และ ตารางที่ 5 และรูปภาพที่ 19 โดยพบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และฝัก มีฤทธิ์ร้อยละ 50 ในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 374 ± 13 และ 668 ± 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ โดยวิธี DPPH

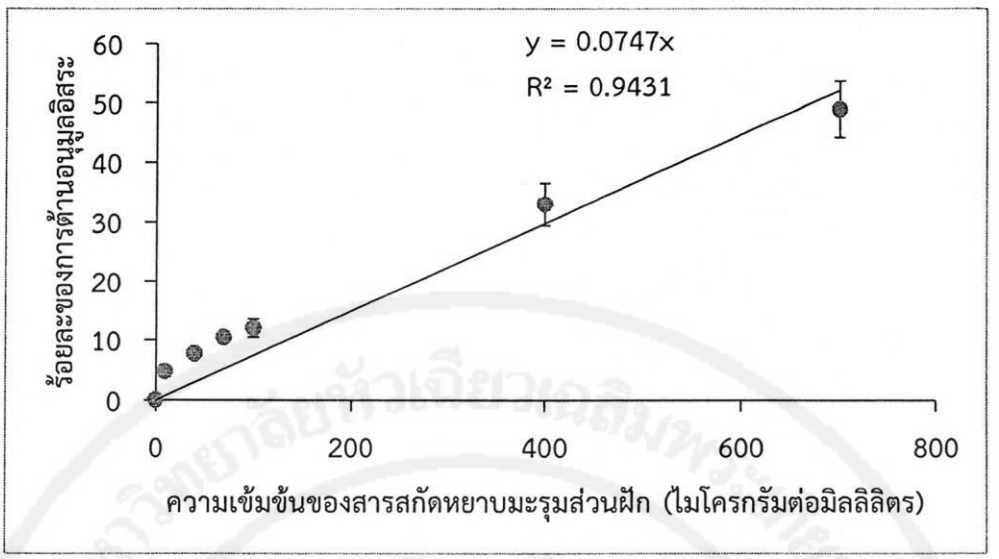
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	SEM
0	0	0	0	0	0.00
10	6	6	6	6	0.20
40	12	12	14	13	0.62
70	16	15	22	18	2.04
100	19	20	25	21	2.02
400	59	56	66	60	3.00
700	88	83	91	87	2.31



รูปภาพที่ 18 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

ตารางที่ 5 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝัก โดยวิธี DPPH

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบฝักมะรุม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	SEM
0	0	0	0	0	0.00
10	5	5	4	5	0.22
40	8	9	7	8	0.57
70	11	12	9	10	0.99
100	12	14	9	12	1.56
400	30	35	33	33	3.55
700	48	50	49	49	4.79



รูปภาพที่ 19 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝักต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

ตารางที่ 6 ร้อยละ 50 ของสารต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นที่เป็นพิษ (IC_{50}) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเพาะเลี้ยงชนิด K562 ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ และส่วนฝัก

สารสกัดหยาบมะรุมจากส่วน	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุม ((ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Mean ± SEM)		
	การต้านอนุมูลอิสระ ร้อยละ 50	ความเป็นพิษต่อ	
		เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ร้อยละ 50	เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ ร้อยละ 50
ใบ	374 ± 13	220 ± 22	878 ± 7
ฝัก	668 ± 13	257 ± 15	> 500
เมล็ด	> 1000	> 1000	-

4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อรูปร่างเซลล์และระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562

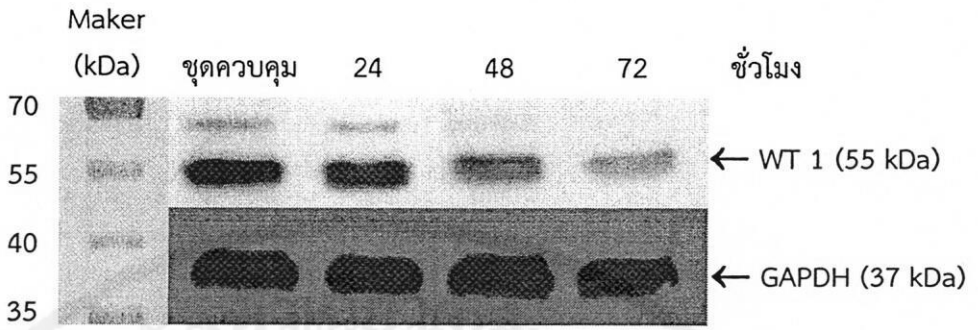
จากการศึกษาความพิษของสารสกัดหยาบมะรุมจากส่วนต่าง ๆ พบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยมีค่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ IC_{20} และ IC_{50} คือ 55 ± 5 และ 220 ± 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝัก และเมล็ด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) คือ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาศึกษาผลต่อการลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทู-เมอร์วัน ในช่วงระยะ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Western blot จากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ได้ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันหลังทำการปรับเทียบค่ากับโปรตีน GAPDH มีการแสดงออกโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันร้อยละ 79, 63 และ 39 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยระยะเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ผลในการลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปภาพที่ 20 นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้สรุปว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ตามระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกัน แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ดังแสดงในรูปภาพที่ 21

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (mean ± SEM) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

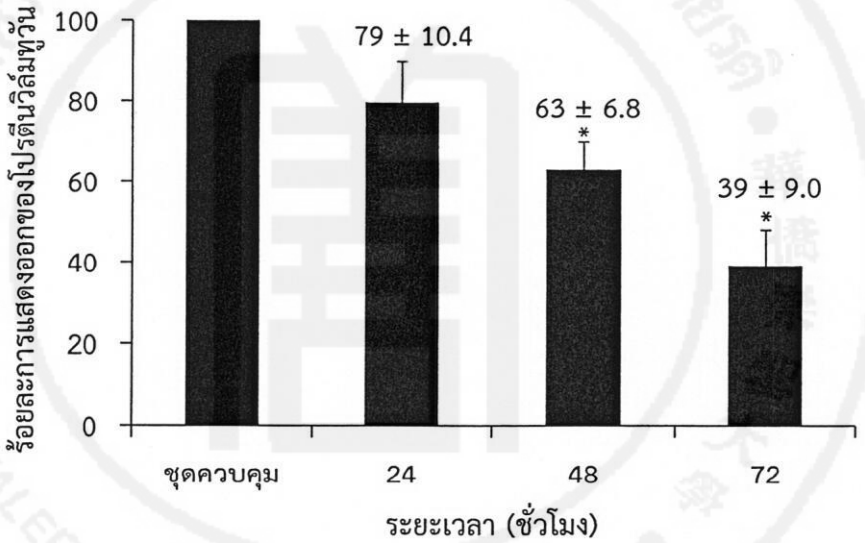
การทดลอง	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean ± SEM
ชุดควบคุม	100	100	100	100 ± 0
24 ชั่วโมง	100	72	66	79 ± 10.4
48 ชั่วโมง	74	64	51	63 ± 6.8*
72 ชั่วโมง	47	49	21	39 ± 9.0*

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

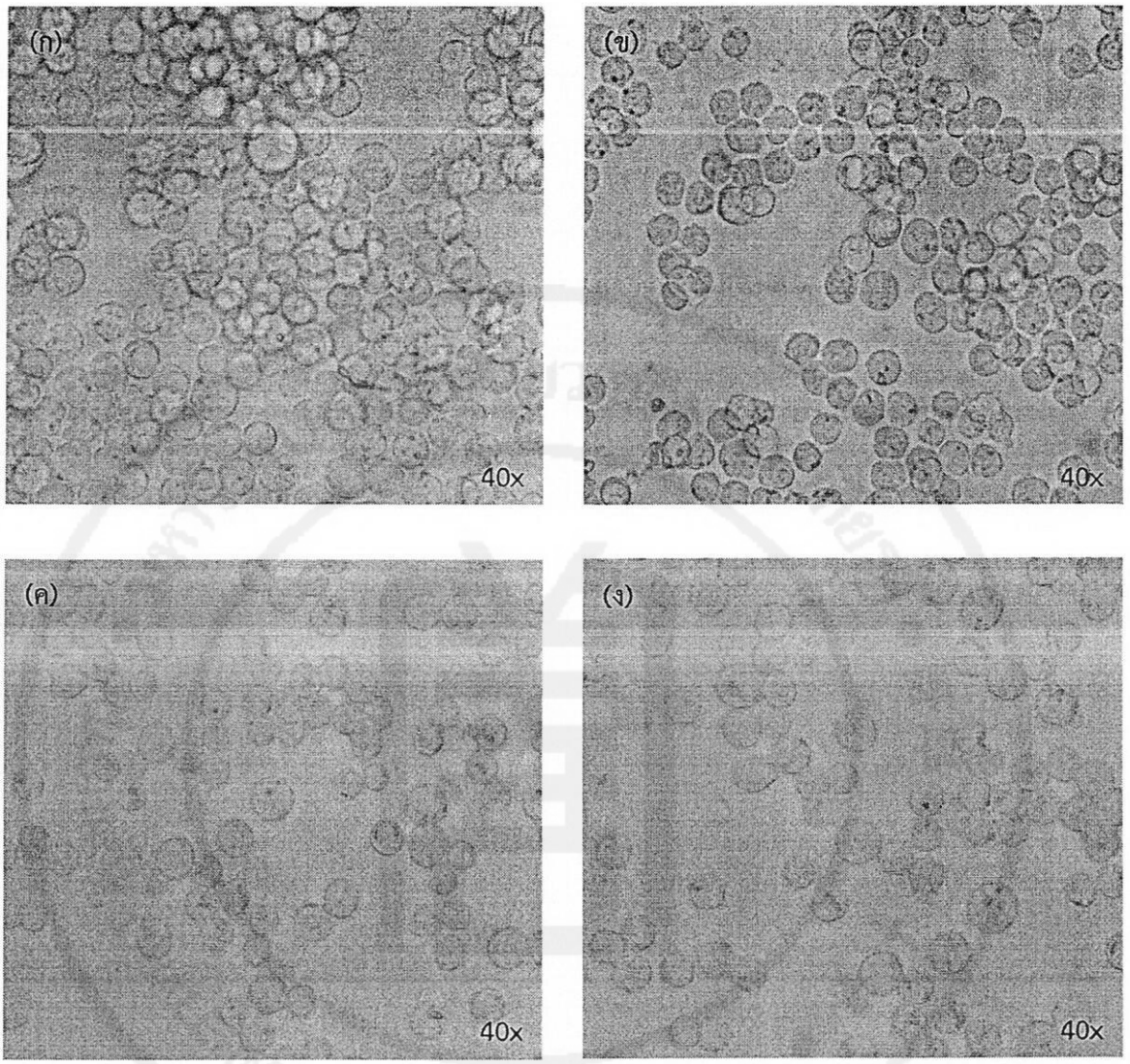
(ก)



(ข)



รูปภาพที่ 20 ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อระดับร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot (ก) แผ่นฟิล์มแสดงแถบโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และ GAPDH หลังจากเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ข) กราฟแสดงผลการปรับเทียบร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันหลังจากเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)



รูปภาพที่ 21 ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ต่อรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด K562 เมื่อเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยรูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดทดสอบ: เลี้ยงร่วมกันนาน 24 ชั่วโมง (ค) ชุดทดสอบ: เลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่วโมง (ง) ชุดทดสอบ: เลี้ยงร่วมกันนาน 72 ชั่วโมง

4.6 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อรูปร่างเซลล์และระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

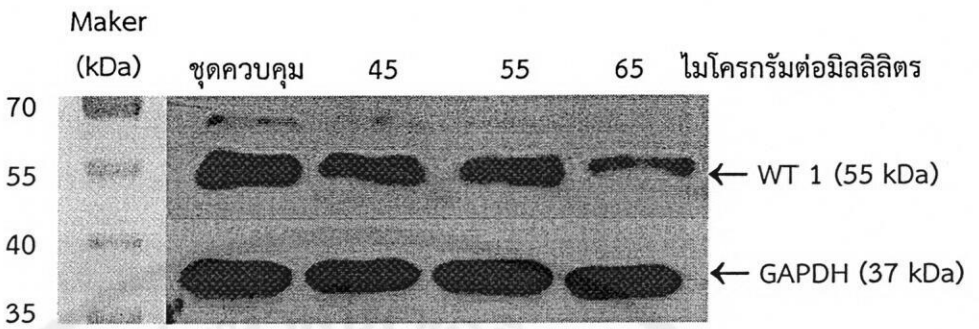
จากการศึกษาความพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนต่าง ๆ พบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 โดยมีค่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบที่ IC_{20} และ IC_{50} คือ 55 ± 5 และ 220 ± 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝัก และเมล็ด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบในระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) คือ 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการเลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ด้วยวิธี Western blot พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกของโปรตีนวิล์ทูเมอร์วันหลังทำการปรับเทียบค่ากับโปรตีน GAPDH คือร้อยละ 68, 52 และ 31 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทั้ง 3 ความเข้มข้น (45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 8 และ รูปภาพที่ 22 นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ตามความเข้มข้นที่เลี้ยงร่วมกัน แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ดังแสดงในรูปภาพที่ 23

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (mean ± SEM) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เมื่อเลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่วโมง

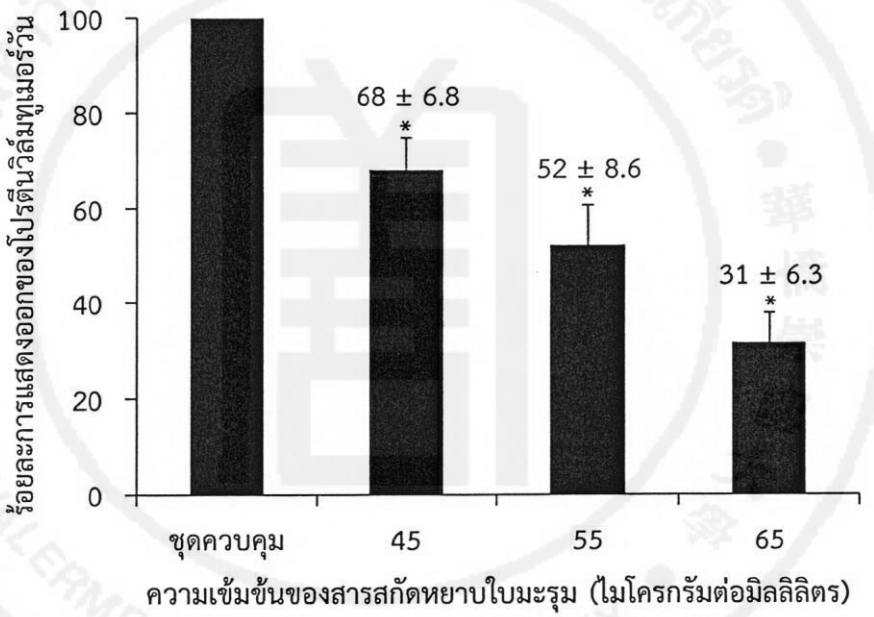
การทดลอง	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean ± SEM
ชุดควบคุม	100	100	100	100 ± 0
ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	65	58	81	68 ± 6.8*
ความเข้มข้น 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	46	41	69	52 ± 8.6*
ความเข้มข้น 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	24	26	44	31 ± 6.3*

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

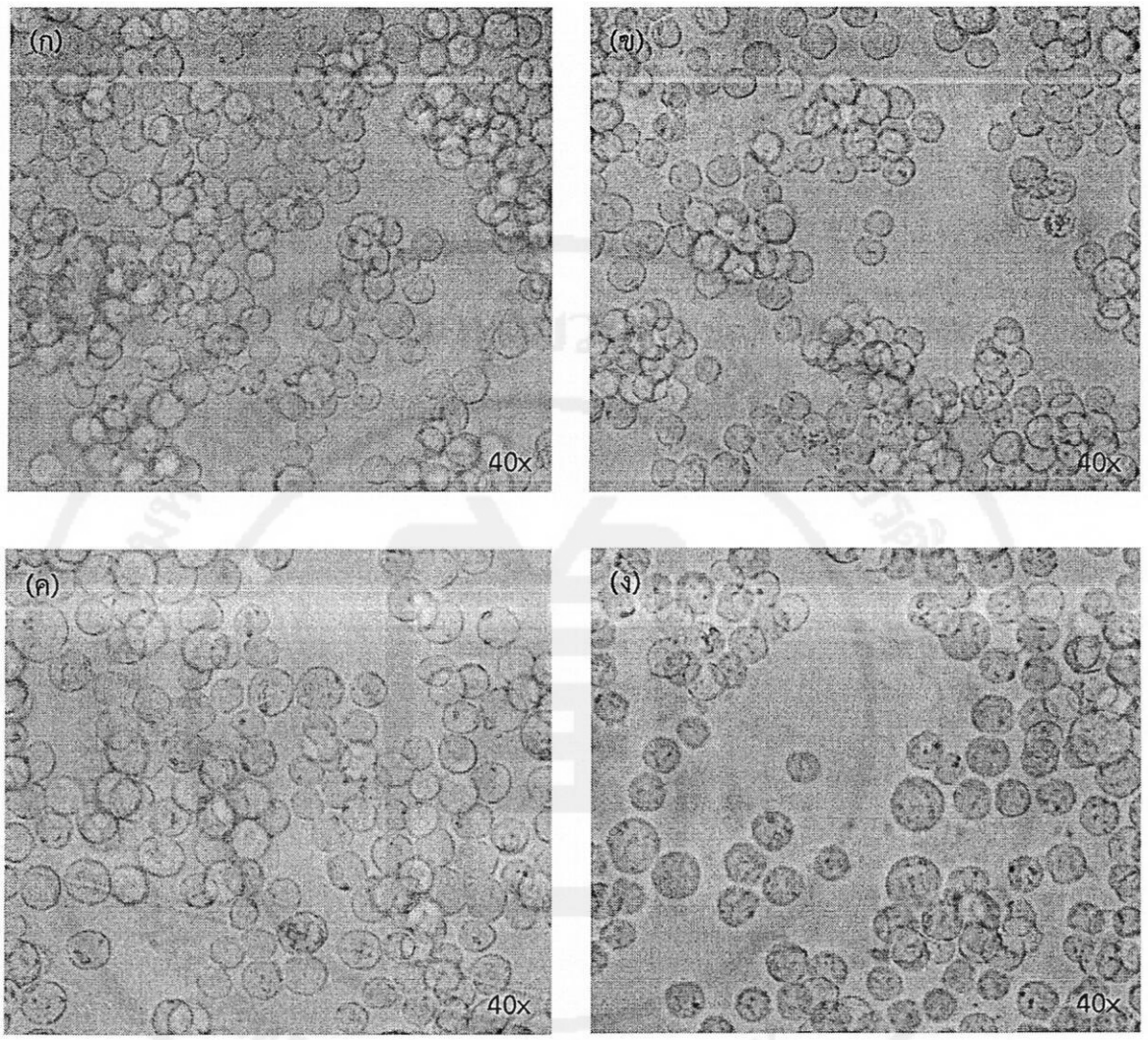
(ก)



(ข)



รูปภาพที่ 22 ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่วโมง ต่อระดับร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยวิธี Western blot (ก) แผ่นฟิล์มแสดงแถบโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และ GAPDH หลังจากเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง (ข) กราฟแสดงผลการปรับเทียบร้อยละการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันหลังจากเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ ระยะเวลาแตกต่างกัน (3 times independent study)



รูปภาพที่ 23 ผลของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 หลังเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 48 ชั่วโมง (ก) เลี้ยงร่วมกับร้อยละ 0.026 ของ DMSO (ข) เลี้ยงร่วมกับ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ (ค) เลี้ยงร่วมกับ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ (ง) เลี้ยงร่วมกับ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์และต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ฝัก และเมล็ด ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่ได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันสูงกว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt4 ซึ่งได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ทั้งนี้ในการการวิจัยนี้เลือดของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เนื่องจากเมื่อทำการทดลองเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจะได้เห็นผลการของสารสกัดหยาบมะรุมต่อการลดระดับการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ที่ชัดเจน (สิงห์คำ ธิมา., 2006 : 117)

จากการสกัดหยาบของมะรุมส่วนต่าง ๆ คือ ส่วนใบ ฝัก และเมล็ด ด้วยตัวทำลายร้อยละ 95 เอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้ดีที่สุด โดยวิธี MTT และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ฝัก และเมล็ด ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 พบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ได้ดีกว่า สารสกัดหยาบมะรุมส่วนฝัก และเมล็ด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยแสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ฝัก และเมล็ด ที่เป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ที่ร้อยละ 50 คือ 220 ± 22, 257 ± 15 และ มากว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปภาพที่ 12 ถึง 16 โดยทำการศึกษากับเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติ จำนวน 5 ราย นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

DPPH โดยแสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ฝัก และเมล็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 คือ 374 ± 13, 668 ± 13 และ มากกว่า 1000 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้มีผลสอดคล้องกับการรายงานว่ามะรุมมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีกรดแอสคอบิก , ฟลาโวนอยส์, ฟีนอลิค และ คาโรทีนอยด์ นอกจากนี้ยังมีรายว่าใบมะรุมมีสารประกอบที่สำคัญอยู่ 3 ชนิดใหญ่ คือ Crypto-chlorogenic acid, isoquercetin, and astragalin (Vongsak, et al., 2013 : 1-10) โดย Chlorogenic acid และอนุพันธ์ของมัน สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ลดระดับการสะสมไขมันในตับ ลดความอ้วน และยับยั้งการอักเสบของปอดแบบเฉียบพลัน (Cho, et al., 2010 : 937-43; Nakatani, et al., 2000 : 5512-6; Rodriguez de Sotilloand Hadley, 2002 : 717-726; Zhang, et al., 2010 : 746-52) ส่วน isoquercetin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ Astragalin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบทางด้านผิวหนัง (Kotani, et al., 2000 : 159-66; Soromou, et al., 2012 : 256-61)

หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ซึ่งมีความเป็นพิษเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ดีที่สุด ต่อการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน เนื่องจากโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันเป็นดัชนีบ่งชี้มะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้ มีรายงานว่ามีผลโดยตรงกับการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) นอกจากนี้โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในในผู้ป่วยที่เป็นลิวคีเมียพบว่ามีการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วัน ประมาณ 1,000-10,000 เท่า เมื่อเทียบกับไขกระดูกปกติ และ เซลล์เม็ดเลือดปกติ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาว่าสารสกัดหยาบมะรุมสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้หรือไม่ ด้วยวิธี Western blot analysis ซึ่งได้เลือกสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ มาทำการศึกษาต่อเนื่องจากเป็นส่วนที่ให้ฤทธิ์ความเป็นต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) เพื่อไม่ให้กลไกของการตายเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแปลผลการทดลอง ซึ่งเป็นข้อดีของการศึกษาที่เลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติเพื่อลดผลข้างเคียงที่สามารถเกิดขึ้นกับผู้ป่วยมะเร็งได้เป็นอย่างดี โดยฤทธิ์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์นี้จะส่งผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* แล้วทำให้การแบ่งตัวเพิ่มปริมาณของเซลล์นั้นลดลงหรือไม่มีเลยก็เป็นไปได้คือระดับความเข้มข้นที่ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการศึกษาว่าที่ความเข้มข้น

ที่ไม่เป็นพิษสามารถฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบต่อการลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทู-เมอร์วันในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ คือ 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบสามารถยับยั้งการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้แบบตามระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกัน (time dependent manner) ดังตารางที่ 7 รูปภาพที่ 19 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ด้วยด้วยการดูและสังเกตรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาพบว่ารูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ถูกเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง รูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับรูปร่างของเซลล์ชุดควบคุม ในทุกช่วงเวลาของการเลี้ยงร่วมกัน ดังรูปภาพที่ 21 นอกจากยังทำการศึกษาต่อถึงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ ที่ 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่งโมง จากผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น (dose dependent manner) ดังตารางที่ 8 และ รูปภาพที่ 22 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ด้วยด้วยการดูและสังเกตรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาพบว่ารูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ถูกเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมะรุมส่วนใบ 45, 55 และ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง รูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับรูปร่างของเซลล์ชุดควบคุม ในทุกความเข้มข้นของการศึกษา ดังรูปภาพที่ 23

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้เป็นน่าสนใจอย่างมากถึงฤทธิ์การเป็นสารต้านมะเร็งของใบมะรุม ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความสามารถในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและสามารถยับยั้งการแสดงออกโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรก นอกจากนี้การศึกษานี้ยังแสดงให้อย่างเด่นชัดว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบมะรุมที่สามารถลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ

อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไปควรทำการศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีน*วิล์มทูเมอร์วัน* วิธีการทาง quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) หรือ semiquantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการสกัดตัวอย่าง อาร์เอ็นเอรวม (total RNA) แล้วทำการเปลี่ยนให้เป็นซีดีเอ็นเอ (cDNA) หลังจากนั้นทำการ amplify ด้วยวิธี PCR หลังจากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณ product ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาการแสดงออกของยีน ดังนั้นในการทดลองต่อไป ได้วางแผนการทดลองในการศึกษาตัวทำลายที่จะสกัดสารต้านมะเร็งที่อยู่ในใบมะรุม และวิเคราะห์ถึงสารสำคัญที่อยู่ในส่วนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งจากสารสกัดแยกส่วนใบมะรุม

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์และต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบจากมะรุม (Moringa oleifera Lam) ของไทยในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด K562 สามารถสรุปได้ว่าการศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนซ์ จากสารสกัดหยาบมะรุมนั้น ส่วนที่พบมากที่สุดคือส่วนที่เป็นใบ ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีสุด โดยมีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากใบมะรุมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (PBMC) นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากใบมะรุมยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ทั้งตามความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นและตามระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกัน (dose and time dependent manner) โดยการลดระดับการแสดงอออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่าการลดระดับการแสดงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันซึ่งเป็นตัวบ่งชี้และติดตามการรักษาในผู้ป่วยมะเร็ง โดยเฉพาะผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้น สำหรับการศึกษาในครั้งนี้จุดที่น่าสนใจคือสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีสารในกลุ่มใดที่ทำหน้าที่ในการเป็นสารต้านมะเร็ง และตัวทำลายชนิดใดที่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีที่สุด ดังนั้นข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ที่ได้จากศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะถูกนำไปต่อยอดในการวิจัยถึงการหาสารสำคัญ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งและศึกษาโครงสารของสารดังกล่าว ซึ่งจุดสำคัญของการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลการศึกษาถึงกลไกพื้นฐานที่อาจจะถูกนำไปสู่การผลิตยาหรือกลยุทธ์ของการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไป

บรรณานุกรม

พรเทพ เทียนสิวากุล และคณะ. (2547) **โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง.**กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มะรุม. (2002) [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.medplant.mahidol.ac.th/document/moringa.asp. (27 มีนาคม 2556)

สรรพคุณของมะรุม. (2012) [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.needssale.com/บทความน่ารู้สรรพคุณของมะรุม.html. (30 มกราคม 2556)

สาคร พรประเสริฐ. (2542) **มะเร็งเม็ดเลือดขาว.** เชียงใหม่ : ส.การพิมพ์.

สิงห์คำ ธิมา. (2006) ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการ แสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคนิคการแพทย์) เชียงใหม่ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

หมั่นดี ยุทธนา. (2549) **การตรวจวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาว.** เชียงใหม่: คณะเทคนิคการแพทย์.

องค์การอนามัยโลก. (2012) "สถิติเกี่ยวกับการเกิดมะเร็ง" [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en/. (18 ธันวาคม 2555)

โอภาส เกียรติกุล และคณะ. (2545) **พยาธิวิทยาคลินิก clinical pathology.** กรุงเทพมหานคร : เรือนแก้ว.

Algar, E. M., et al. (1995) "Homozygous intragenic deletion in the wt1 gene in a sporadic wilms' tumour associated with high levels of expression of a truncated transcript" **Hum Mutat.** 5(3) page 221-7.

Algar, E. M., et al. (1996) "A wt1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines" **Oncogene.** 12(5) page 1005-14.

Anuchapreeda, S., et al. (2006) "Curcumin inhibits wt1 gene expression in human leukemic k562 cells" **Acta Pharmacol Sin.** 27(3) page 360-6.

Anwar, FandAshraf, M. (2005) "Interprovenance variation in the composition of moringa oleifera oilseeds from pakistan" **J Am oil Chem Soc.** 82 page 45-51.

Anwar, F., et al. (2007) "Moringa oleifera: A food plant with multiple medicinal uses" **Phytother Res.** 21(1) page 17-25.

Atawodi, S. E., et al. "Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks of moringa oleifera lam" **J Med Food.** 13(3) page 710-6.

Bader, P., et al. (2004) "Wt1 gene expression: Useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia?" **Eur J Haematol.** 73(1) page 25-8.

Bentov, I., et al. (2003) "The wt1 wilms' tumor suppressor gene: A novel target for insulin-like growth factor-i action" **Endocrinology.** 144(10) page 4276-9.

Bergmann, L., et al. (1997) "Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias" **Leuk Lymphoma.** 25(5-6) page 435-43.

Bergmann, L., et al. (1997) "High levels of wilms' tumor gene (wt1) mrna in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome" **Blood.** 90(3) page 1217-25.

Bharali, R., et al. (2003) "Chemomodulatory effect of moringa oleifera, lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice" **Asian Pac J Cancer Prev.** 4(2) page 131-9.

Bruening, W.andPelletier, J. (1996) "A non-aug translational initiation event generates novel wt1 isoforms" **J Biol Chem.** 271(15) page 8646-54.

Call, K. M., et al. (1990) "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 wilms' tumor locus" **Cell.** 60(3) page 509-20.

Cho, A. S., et al. (2010) "Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice" **Food Chem Toxicol.** 48(3) page 937-43.

Chumark, P., et al. (2008) "The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of moringa oleifera lam. Leaves" **J Ethnopharmacol.** 116(3) page 439-46.

Dumur, C. I., et al. (2002) "Analytical validation of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction quantitation of different transcripts of the wilms' tumor suppressor gene (wt1)".**Anal Biochem.** 309(1) page 127-36.

Faderl, S., et al. (1999) "Chronic myelogenous leukemia: Biology and therapy" **Ann Intern Med.** 131(3) page 207-19.

Fu, J., et al. (2000) "[expression of the wilms' tumor gene wt1 and detection of minimal residual disease in acute leukemia]" **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.** 8(3) page 211-215.

Gaiger, A., et al. (1998) "Detection of the wt1 transcript by rt-pcr in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia" **Leukemia.** 12(12) page 1886-94.

Gessler, M., et al. (1990) "Homozygous deletion in wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping" **Nature.** 343(6260) page 774-8.

Gomez, A., et al. (2005) "[detection mutations in the DNA mismatch repair genes of hmlh1 and hmsh2 genes in colombian families with suspicion of hereditary

non-polyposis colorectal carcinoma (lynch syndrome)]" **Biomedica.** 25(3) page 315-24.

Gu, W. Y., et al. (2004) "[detection of wt1 expression in bone marrow of acute leukemia patients with real-time quantitative rt-pcr.]" **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.** 25(12) page 728-31.

Gue, X, et al. (1999) "Wt1 gene expression in leukemia patients and its correction with prognosis and mutidrug resistance" **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.** 20 page 69-72.

Haber, D. A., et al. (1991) "Alternative splicing and genomic structure of the wilms tumor gene wt1" **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88(21) page 9618-22.

Han, Y., et al. (2004) "Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by wt1 protein" **Oncogene.** 23(41) page 6933-41.

Im, H. J., et al. (1999) "Expression of wilms tumor gene (wt1) in children with acute leukemia" **Pediatr Hematol Oncol.** 16(2) page 109-18.

Inoue, K., et al. (1997) "Aberrant overexpression of the wilms tumor gene (wt1) in human leukemia" **Blood.** 89(4) page 1405-12.

Inoue, K.andSugiyama, H. (1995) "[wt 1 and leukemia]" **Rinsho Ketsueki.** 36(6) page 552-8.

Inoue, K., et al. (1994) "Wt1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia" **Blood.** 84(9) page 3071-9.

Inoue, K., et al. (1998) "Wilms' tumor gene (wt1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells" **Blood.** 91(8) page 2969-76.

Ito, K., et al. (2006) "Antiapoptotic function of 17aa(+)wt1 (wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway" **Oncogene.** 25(30) page 4217-29.

Kikuchi, H., et al. (1992) "Genomic changes in the wt-gene (wt1) in wilms' tumors and their correlation with histology" **Am J Pathol.** 140(4) page 781-6.

Kotani, M., et al. (2000) "Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and ige elevation in nc/nga mice" **J Allergy Clin Immunol.** 106(1 Pt 1) page 159-66.

Laity, J. H., et al. (2000) "Alternative splicing of wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes" **Biochemistry.** 39(18) page 5341-8.

Lewis, W. H., et al. (1988) "Homozygous deletion of a DNA marker from chromosome 11p13 in sporadic wilms tumor" **Genomics.** 3(1) page 25-31.

Liu Yin, J. A. (2002) "Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia" **Best Pract Res Clin Haematol.** 15(1) page 119-35.

Makkar, HPS and Becker, K. (1996) "Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted moringa oleifera leaves" **63.** page 211-228.

Menke, A. L., et al. (1998) "The wilms' tumor 1 gene: Oncogene or tumor suppressor gene?" **Int Rev Cytol.** 181 page 151-212.

Menssen, H. D., et al. (1995) "Presence of wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the wt1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias" **Leukemia.** 9(6) page 1060-7.

Miwa, H., et al. (1992) "Expression of the wilms' tumor gene (wt1) in human leukemias" **Leukemia.** 6(5) page 405-9.

Miyagi, T., et al. (1993) "Expression of the candidate wilm's tumor gene, wt1, in human leukemia cells" **Leukemia.** 7(7) page 970-7.

Murakami, A., et al. (1998) "Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of moringa oleifera, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced epstein-barr virus activation" **Planta Med.** 64(4) page 319-23.

Nakatani, N., et al. (2000) "Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (prunus domestica l.)" **J Agric Food Chem.** 48(11) page 5512-6.

Ndong, M., et al. (2007) "Effects of oral administration of moringa oleifera lam on glucose tolerance in goto-kakizaki and wistar rats" **J Clin Biochem Nutr.** 40(3) page 229-33.

Ouedraogo, M., et al. (2013) "Protective effect of moringa oleifera leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits" **Exp Toxicol Pathol.** 65(3) page 335-9.

Rodriguez de Sotillo, D. V.andHadley, M. (2002) "Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: Cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) zucker rats" **J Nutr Biochem.** 13(12) page 717-726.

Semsri, S., et al. (2011) "Inhibitory mechanism of pure curcumin on wilms' tumor 1 (wt1) gene expression through the pkcalpha signaling pathway in leukemic k562 cells" **FEBS Lett.** 585(14) page 2235-42.

Sharma, P. M., et al. (1994) "Rna editing in the wilms' tumor susceptibility gene, wt1" **Genes Dev.** 8(6) page 720-31.

Siehl, J. M., et al. (2004) "Expression of wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants" **Ann Hematol.** 83(12) page 745-50.

Singh, B. N., et al. (2009) "Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of moringa oleifera" **Food Chem Toxicol.** 47(6) page 1109-16.

Smith, S. I., et al. (1998) "Expression of the wilms' tumor suppressor gene, wt1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in m1 leukemic cells" **Blood.** 91(3) page 764-73.

Soromou, L. W., et al. (2012) "Astragalin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating nf-kappab signaling pathway" **Biochem Biophys Res Commun.** 419(2) page 256-61.

Sreelatha, S.andPadma, P. R. (2011) "Modulatory effects of moringa oleifera extracts against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative damage" **Hum Exp Toxicol.** 30(9) page 1359-68.

Steinbach, D., et al. (2006) "Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia" **Clin Cancer Res.** 12(8) page 2434-41.

Sugiyama, H. (1998) "Wilms tumor gene (wt1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia" **Leuk Lymphoma.** 30(1-2) page 55-61.

Sugiyama, H. (2000) "[genetic diagnosis of leukemia: Diagnosis of relapse and complete remission, and prediction of leukemia onset]" **Rinsho Byori.** 48(2) page 155-61.

Sugiyama, H. (2001) "Wilms' tumor gene wt1: Its oncogenic function and clinical application" **Int J Hematol.** 73(2) page 177-87.

Sugiyama, H. (2002) "Wilms tumor gene wt1 as a tumor marker for leukemic blast cells and its role in leukemogenesis" **Methods Mol Med.** 68 page 223-37.

Svedberg, H., et al. (1999) "Downregulation of wilms' tumor gene (wt1) is not a prerequisite for erythroid or megakaryocytic differentiation of the leukemic cell line k562" **Exp Hematol.** 27(6) page 1057-62.

Tannock, I. F. (1987) "Toxicity of 5-fluorouracil for aerobic and hypoxic cells in two murine tumours" **Cancer Chemother Pharmacol.** 19(1) page 53-6.

Verma, A. R., et al. (2009) "In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of moringa oleifera leaves" **Food Chem Toxicol.** 47(9) page 2196-201.

Vongsak, B., et al. (2013) "Simultaneous hplc quantitative analysis of active compounds in leaves of moringa oleifera lam" **J Chromatogr Sci.** page 1-10.

Wu, X., et al. (1998) "[expression of wilms' tumor gene (wt1) in leukemias and its clinical implication]" **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.** 19(1) page 16-9.

Wu, X., et al. (1998) "[expression of wt1 gene in leukemia and its significance]" **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.** 19(1) page 46-8.

Yamagami, T., et al. (1996) "Growth inhibition of human leukemic cells by wt1 (wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of wt1 in leukemogenesis" **Blood.** 87(7) page 2878-84.

Yang, L., et al. (2007) "A tumor suppressor and oncogene: The wt1 story" **Leukemia.** 21(5) page 868-76.

Ye, Y., et al. (1996) "Regulation of wt1 by phosphorylation: Inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation" **Embo J.** 15(20) page 5606-15.

Zhang, X., et al. (2010) "Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury" **Injury.** 41(7) page 746-52.

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ภาคผนวก ก

อาหารลี้ยงเซลล์และสารละลายล้างเซลล์

1. Incomplete RPMI 1640 medium

RPMI powder (GIBCO BRL)	10.4	กรัม (1 ซอง)
HEPES	3.57	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
0.34% 2-mercaptoethanal	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุ	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 โดยใช้ 1N HCl แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask เป็น 1000 มิลลิลิตร กรองด้วย suction filter โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. Complete RPMI 1640 medium

Incomplete RPMI 1640 medium	88.5	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	10.0	มิลลิลิตร
L-glutamine	0.5	มิลลิลิตร
Pen/Strep	1.0	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.2% (w/v) trypan blue

Trypan blue	0.2	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

กรองด้วยกระกรอง Whatman No.1 และเก็บสารละลายที่กรองได้ที่อุณหภูมิห้อง

4. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

KH_2PO_4	0.24	กรัม
Na_2HPO_4	1.44	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุ	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl หรือ NaOH หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ครบ 1000 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อด้วยการ autoclave หลังจากนั้นเก็บสารละลายอุณหภูมิห้อง

สารละลายสำหรับสกัดโปรตีน

5. RIPA buffer

50 mM Tris	3.03	กรัม
10% SDS (Final = 0.1%)	5	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Final =1%)	5	มิลลิลิตร
150 mM NaCl	4.38	กรัม
0.5 mM EDTA	0.093	กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ไม่มีประจุ	400	มิลลิลิตร

นำสารละลายที่เตรียมได้ มาปรับค่า pH ให้ได้ 7.5 โดยใช้ Conc.HCl จากนั้นเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ไม่มีประจุ ให้ครบ 500 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายเพื่อใช้ในการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

6. 10x running buffer

Tris base	30.3	กรัม
Glycine	188	กรัม
SDS	10	กรัม

น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. 1x running buffer

10x running buffer	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. 1% bromphenol blue

Bromphenol blue	0.1	กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	10	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 5x non-reducing buffer

1.5 M Tris-base HCl, pH 6.8	5.2	มิลลิลิตร
SDS	2.4	กรัม
87% Glycerol	13.8	มิลลิลิตร
1% Bromphenol blue	0.240	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	6	มิลลิลิตร

นำสารละลายที่เตรียมได้ เก็บไว้ใน เก็บไว้ในหลอดขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube) โดยใส่สารที่เตรียมได้ลงไป ปริมาตรเพียง 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. 5x reducing buffer

2.5 M Tris-base HCl, pH 6.8	5	มิลลิลิตร
SDS	2.4	กรัม
87% Glycerol	13.8	มิลลิลิตร
2-mercaptoehtanol	6	มิลลิลิตร

1% Bromphenol blue	0.240	มิลลิลิตร

นำสารละลายที่เตรียมได้ เก็บไว้ในหลอดขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร โดยใส่สารที่เตรียมได้ลงไป ปริมาตรเพียง 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11. 2.5 M Tris-base HCl, pH 6.8

Tris-base	30.285	กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุ	60	มิลลิลิตร

นำสารละลายที่เตรียมไว้มาปรับค่า pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้ Conc.HCl หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. Separating gel 12%

30% acrylamide	2	มิลลิลิตร
1.5 M Tris, pH 8.8 + SDS	1.25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุ	1.75	มิลลิลิตร
10% APS	25	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

13. Stacking gel 4%

30% acrylamide	325	ไมโครลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 + SDS	625	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุ	1.52	มิลลิลิตร
10% APS	2.5	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายที่ใช้กับ Western blot analysis

14. 10x transfer buffer

Tris base	30.3	กรัม
Glycine	144	กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

15. 1x transfer buffer

10x transfer buffer	100	มิลลิลิตร
Methanol	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

16. 10x Tris buffer saline (TBS)

Tris base	30	กรัม
NaCl	80	กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุ	700	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.6 โดยใช้ Conc.HCl แล้วเติม Tween 20 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั่นเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

17. 1x Tris buffer saline กับ 0.1% Tween 20 (TBST)

10x TBST	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดไม่มีประจุให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

18. Blocking solution (5% skim milk)

Skim milk	0.5	กรัม
PBS	10	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายเพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์

19. MTT stock dye solution

MTT dye	0.050	กรัม
1x PBS	10	มิลลิลิตร

เอาสารละลายที่ได้ไปกรอง โดยให้กระดาษกรองมีรูขนาด 0.2 ไมครอน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายสำหรับเก็บเซลล์เพาะเลี้ยง (Freezing solution)

20. 10% DMSO ใน fetal bovine serum

Fetal bovine serum	9	มิลลิลิตร
DMSO	1	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่เตรียมได้ ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวสุวรรณา เสมศรี

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
วท.ม. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วท.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-3126300 ต่อ 1221

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปร.ด. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สถานที่ติดต่อ แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-945066

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต

ประวัติการศึกษา ภ.บ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภ.ม. (เภสัชเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.ด. (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-3126300 ต่อ 1494