การชักนำการตายแบบอะโพโทซิสและการหลั่งไซโตไคน์ของสารฟลาโวนอยด์จากพลูคาว ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

นายจตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INDUCTION OF APOPTOSIS AND CYTOKINES SECRETION OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB. FLAVONOIDS IN LEUKEMIC CELL LINES

Mr. Jaturawat Pawinwongchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Hematology Sciences
Department of Clinical Microscopy
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำการตายแบบอะโพโทซิสและการหลั่งไซโตไคน์ของสารฟลาโวนอยด์จากพลูคาวในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง
โดย	นายจตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……………………………………………….คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……………………………………………….ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์)

………………………………………..........อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ)

………………………………………..........กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา จารุจรณ)

……………………………………………….กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภคมน จิตประเสริฐ)

จตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย : การชักนำการตายแบบอะโพโทซิสและการหลั่งไซโตไคน์ของสารฟลาโวนอยด์จากพลูคาวในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง. (INDUCTION OF APOPTOSIS AND CYTOKINES SECRETION OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB. FLAVONOIDS IN LEUKEMIC CELL LINES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ, 118 หน้า.

มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นโรคมะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติทางกระบวนการในการสร้างเซลล์เม็ดเลือด และในการรักษาก่อให้เกิดผลข้างเคียงเกิดขึ้นมากมาย ด้วยเหตุนี้การรักษาด้วยสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น พลูคาวจัดเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการต้านการอักเสบ สารออกฤทธิ์ที่พบในพลูคาวมีหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งเคอร์เซติน เคอร์ซิติริน และไฮเปอริน เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในพลูคาว การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสกัดพลูคาวด้วยน้ำกลั่นและแอลกอฮอล์พบว่า การสกัดด้วยแอลกอฮอล์จะให้ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ คือ สารสกัดพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 224.90$\pm$2.80 mg QE/g dried *H.cordata* ในขณะที่สารสกัดพลูคาวด้วยน้ำมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 130.79$\pm$4.89 mg QE/g dried *H.cordata* โดยสารสกัดพลูคาว เคอร์เซติน เคอร์ซิติริน และไฮเปอริน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat และ U937 โดยการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิส ซึ่งจะได้ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 386.2-445.1 μg/ml ในสารสกัดพลูคาว และ 60.5-75.6 μg/ml ในสารฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ เมื่อทำการศึกษาไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องพบว่า สารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ และสารเคอร์เซติน จะให้ผลในการลดปริมาณของไซโตไคน์ที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด (IL-2, G-CSF และ GM-CSF) และการอักเสบ (IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN-γ, MIP-1β และ TNF-α) อย่างชัดเจน ดังนั้น พลูคาวอาจจะเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว

ภาควิชา จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..........................
ปีการศึกษา 2553

5277201137 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES

KEYWORDS: LEUKEMIA, HOUTTUYNIA CORDATA, FLAVONOIDS.

JATURAWAT PAWINWONGCHAI: INDUCTION OF APOPTOSIS AND CYTOKINES SECRETION OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB. FLAVONOIDS IN LEUKEMIC CELL LINES. ADVISOR: SUPANTITRA CHANPRASERT, Ph.D., 118 pp.

Leukemia is a hematopoietic cancer and the treatment has many side effects. For this reason, herbal therapy is an alternative treatment for leukemia to reduce the side effects. Plucao or *Houttuynia cordata* Thunb., medicinal herb, has anti-cancer and anti-inflammatory activities. It has many active components such as flavonoids and alkaloids. Quercetin, quercitrin and hyperin are flavonoids founded in Plucao. In this study, we extracted Plucao by distilled deionized water and alcohol and found that *H.cordata* ethanolic extract had total flavonoid content more than *H.cordata* water extract. Total flavonoid of *H.cordata* ethanolic extract was 224.90±2.80 mg QE/g dried *H.cordata* while total flavonoid of *H.cordata* water extract was 130.79±4.89 mg QE/g dried *H.cordata*. *H.cordata* extract, quercetin, quercitrin and hyperin could inhibit the proliferation of Jurkat and U937 leukemic cell lines. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of *H.cordata* extract and flavonoids were in the range of 386.2-445.1 μg/ml and 60.5-75.6 μg/ml, respectively. In addition, our cytokines study found that *H.cordata* extract and flavonoids especially *H.cordata* ethanolic extract and quercetin substantially reduced the hematopoietic and inflammatory cytokines. Therefore, we conclude that *H.cordata* may be one of alternative medicinal herbs for leukemic treatment.

Department: Clinical Microscopy Student's Signature: …………………………...

Field of Study: Clinical Hematology Sciences Advisor's Signature: ………...………………...

Academic Year: 2010

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมไปถึงการให้วิชาความรู้ มุมมอง คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย อีกทั้งกำลังใจยามที่ท้อแท้สิ้นหวัง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา จารุจรณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภคมน จิตประเสริฐ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนค่าลงทะเบียนเรียน และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน

ขอขอบพระคุณศูนย์พัฒนาและวิจัยทางโลหิตวิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก และศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณทุกกำลังใจจากเพื่อน พี่ และน้อง ในคณะสหเวชศาสตร์ และยังช่วยแสดงความเห็นจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นสิ่งที่ดีและสวยงามที่สุดในโลก เป็นความรักบริสุทธิ์ที่หล่อเลี้ยงลูกให้แข็งแกร่งและผลักดันให้ลูกก้าวไปตามเส้นทางฝันเพื่อบรรลุเป้าหมายในชีวิต

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ฌ
สารบัญภาพ		ญ
บทที่		
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	ข้อจำกัดของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว	4
	พลูคาว	24
	ฟลาโวนอยด์	27
	ไซโตไคน์	35
3	วิธีดำเนินการวิจัย	41
	กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	41
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	42
	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	44
	วิธีการวิจัย	47
	การสกัดพลูคาว	47
	การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์	49
	การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง	51

บทที่		หน้า
	การเตรียมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์	52
	การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง	52
	การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์	55
	การวิเคราะห์ข้อมูล	58
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	59
	ผลการวิเคราะห์	59
	ผลการสกัดสารจากพลูคาว	59
	ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว	60
	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์	60
	ผลการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์	71
5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	87
	สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	87
	ข้อเสนอแนะ	89
รายการอ้างอิง		91
ภาคผนวก		105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์		118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความแตกต่างระหว่าง myeloblast และ lymphoblast..................................	9
2	ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามชนิดของเซลล์ที่เกิดโรค................................	16
3	โรค myeloid และ lymphoid neoplasms ตาม WHO classification..............	17
4	ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบ่งกลุ่มตาม WHO classification 2008............	23
5	องค์ประกอบของ essential oils ที่พบในพลูคาว...	26
6	องค์ประกอบของ bioactive components ที่พบในพลูคาว.............................	26
7	การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์..	28
8	ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric assay...	50
9	ปริมาณของสารสกัดจากพลูคาว..	59
10	ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว...	60
11	ค่า IC_{50} ของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ในเซลล์ Jurkat..................	66
12	ค่า IC_{50} ของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ในเซลล์ U937...................	66
13	ปริมาณ IL-2 ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat…..................................	73
14	ปริมาณ TNF-α ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat…..............................	74
15	ปริมาณ IL-6 ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937......................................	75
16	ปริมาณ TNF-α ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937.................................	76
17	ปริมาณของ hematopoietic cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat..	79
18	ปริมาณของ inflammatory cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat..	80
19	ปริมาณของ hematopoietic cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937..	83
20	ปริมาณของ inflammatory cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937..	84

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL	9
2	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML	10
3	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML	13
4	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL	14
5	ลักษณะของต้นพลูคาว	24
6	โครงสร้างทางเคมีของสาร alkaloids ที่พบในพลูคาว	25
7	การเกิด apoptosis จากการเหนี่ยวนำของสารสกัดพลูคาว	27
8	ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์	27
9	ลักษณะโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ	28
10	คุณสมบัติโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ในการต้านอนุมูลอิสระ	29
11	การต้านการอักเสบของสารฟลาโวนอยด์	30
12	การยับยั้ง JAK-STAT signaling pathway โดย quercetin	31
13	การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ของสารฟลาโวนอยด์	32
14	การกระตุ้นการเกิด apoptosis ของสารฟลาโวนอยด์	33
15	การยับยั้งกระบวนการก่อให้เกิดมะเร็งของสารฟลาโวนอยด์	33
16	โครงสร้างของสาร Quercetin	34
17	โครงสร้างของสาร Quercitrin	34
18	โครงสร้างของสาร Hyperin	34
19	การทำงานและการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างไซโตไคน์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดเลือด	36
20	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat	41
21	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937	41
22	ลักษณะของพลูคาวที่ผ่านการอบแห้ง	47
23	ลักษณะของสารสกัดพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ	48
24	ลักษณะของสารสกัดพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์	48
25	ลักษณะตารางของ hemocytometer	52
26	การ reduction XTT ด้วยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase	54

ภาพที่		หน้า
27	การรีดิวซ์สาร XTT ให้กลายเป็น formazan..	54
28	ลักษณะของสารสกัดแห้งจากพลูคาว..	59
29	กราฟระหว่างสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์กับ % cell viability ของ Jurkat...	63
30	กราฟระหว่างสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์กับ % cell viability ของ U937..	65
31	ลักษณะของเซลล์ Jurkat ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) ข. รับสาร vincristine (positive control)..	67
32	ลักษณะของเซลล์ Jurkat ก. รับสาร quercetin 100 μg/ml ข. รับสาร quercetin 10 μg/ml..	67
33	ลักษณะของเซลล์ Jurkat ก. รับสาร quercitrin 100 μg/ml ข. รับสาร quercitrin 10 μg/ml...	68
34	ลักษณะของเซลล์ Jurkat ก. รับสาร hyperin 100 μg/ml ข. รับสาร hyperin 10 μg/ml..	68
35	ลักษณะของเซลล์ Jurkat ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 100 μg/ml...	68
36	ลักษณะของเซลล์ Jurkat ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 100 μg/ml......................	69
37	ลักษณะของเซลล์ U937 ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) ข. รับสาร vincristine (positive control)..	69
38	ลักษณะของเซลล์ U937 ก. รับสาร quercetin 100 μg/ml ข. รับสาร quercetin 10 μg/ml..	69
39	ลักษณะของเซลล์ U937 ก. รับสาร quercitrin 100 μg/ml ข. รับสาร quercitrin 10 μg/ml..	70
40	ลักษณะของเซลล์ U937 ก. รับสาร hyperin 100 μg/ml ข. รับสาร hyperin 10 μg/ml..	70

ภาพที่		หน้า
41	ลักษณะของเซลล์ U937 ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 100 μg/ml	70
42	ลักษณะของเซลล์ U937 ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 100 μg/ml	71
43	กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat วิธี ELISA	77
44	กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 วิธี ELISA	78
45	กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat วิธี Bio-Plex	82
46	กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 วิธี Bio-Plex	86
47	กราฟมาตรฐานของ quercetin	108
48	กราฟมาตรฐานของ IL-2 วิธี ELISA	109
49	กราฟมาตรฐานของ IL-6 วิธี ELISA	109
50	กราฟมาตรฐานของ TNF-α วิธี ELISA	110
51	กราฟมาตรฐานของ IL-1β วิธี Bio-Plex	110
52	กราฟมาตรฐานของ IL-2 วิธี Bio-Plex	111
53	กราฟมาตรฐานของ IL-4 วิธี Bio-Plex	111
54	กราฟมาตรฐานของ IL-6 วิธี Bio-Plex	112
55	กราฟมาตรฐานของ IL-8 วิธี Bio-Plex	112
56	กราฟมาตรฐานของ IL-10 วิธี Bio-Plex	113
57	กราฟมาตรฐานของ IL-12 วิธี Bio-Plex	113
58	กราฟมาตรฐานของ IL-13 วิธี Bio-Plex	114
59	กราฟมาตรฐานของ IL-17 วิธี Bio-Plex	114
60	กราฟมาตรฐานของ G-CSF วิธี Bio-Plex	115
61	กราฟมาตรฐานของ GM-CSF วิธี Bio-Plex	115
62	กราฟมาตรฐานของ IFN-γ วิธี Bio-Plex	116
63	กราฟมาตรฐานของ MCP-1 วิธี Bio-Plex	116
64	กราฟมาตรฐานของ MIP-1β วิธี Bio-Plex	117
65	กราฟมาตรฐานของ TNF-α วิธี Bio-Plex	117

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) เป็นโรคมะเร็งที่พบได้ในประชากรทุกเพศ ทุกวัย ในประเทศไทย เช่นเดียวกับในหลายประเทศทั่วโลก และเป็นโรคที่พบบ่อย 10 อันดับแรกของโรคมะเร็งที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ [1] และโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่ต้องได้รับการรักษาเป็นระยะเวลานาน ในด้านการรักษาจะแตกต่างกันไปตามชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว และสภาพของผู้ป่วย โดยมีเป้าหมายในการรักษาเพื่อควบคุมให้โรคสงบ (Remission) และป้องกันการกลับมาเป็นใหม่ (Relapse) ในวิธีการรักษานั้น วิธีที่ได้ผลมากที่สุดวิธีหนึ่ง คือ การใช้เคมีบำบัด (Chemotherapy) [2] ซึ่งปัจจุบันมียาหลายชนิดที่นำมาใช้ แต่ก็ได้ผลดีกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด และยาเคมีบำบัดไม่สามารถกระจายไปได้ถึงอวัยวะบางส่วน เช่น สมองและน้ำไขสันหลัง ซึ่งเป็นอวัยวะที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถแพร่กระจายไปได้ จึงทำให้ต้องมีการใช้รังสีรักษา (Radiotherapy) [2] ร่วมกับยาเคมีบำบัด ในการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและรังสีรักษาจะมีผลข้างเคียงกับคนไข้ และอาจทำให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ภายหลังจากโรคสงบและหยุดยา โดยยาเคมีบำบัดมุ่งที่จะทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีการเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว แต่ก็จะมีการทำลายเซลล์ปกติของคนไข้เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็ง อีกทั้งยังทำให้ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร และการใช้รังสีรักษาก็มีผลข้างเคียง คือ บริเวณที่ได้รับการฉายแสงจะมีอาการแห้ง ขนหรือผมบริเวณนั้นร่วง ส่งผลกระทบต่อสภาพจิตใจของผู้ป่วย นอกจากนี้อาจทำการปลูกถ่ายไขกระดูก (Bone marrow transplantation) รวมถึงการรักษาโดยการใช้การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell transplantation) ร่วมกับการรักษา เพื่อให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดมากขึ้น แต่การปลูกถ่ายไขกระดูกค่อนข้างยุ่งยาก ต้องใช้ไขกระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความเข้ากันได้กับผู้ป่วย และมีผลข้างเคียงในการรักษา คือ มีโอกาสเกิดโรคแทรกซ้อนสูง จึงได้มีการพัฒนาการรักษาเกิดขึ้นอีกหลาย ๆ วิธี จนกระทั่งในปัจจุบันมีการนำการรักษาทางเลือก (Alternative medicine) มาร่วมในการรักษาผู้ป่วย ซึ่งหนึ่งในวิธีการรักษาทางเลือกนั่นก็คือ การนำสมุนไพร (Herbal therapy) มาร่วมใช้ในการรักษา เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมีการหายขาดของโรคดียิ่งขึ้น และเนื่องจากสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ จึงทำให้ผู้ป่วยรู้สึกว่าได้รับผลข้างเคียงจากยาลดลง [3, 4]

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหาฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของมะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดจากพลูคาว โดยมุ่งเน้นในด้านการลดการเจริญเติบโต และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว รวมไปถึงการแสดงออกของไซโตไคน์สำคัญ ในการเพิ่ม

จำนวนของเซลล์ที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจะหลั่งออกมา [5-10] เช่น Interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, Interferon (IFN)-γ, Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Macrophage inflammatory protein (MIP)-1β และ Tumor Necrosis Factor (TNF)-α หากการวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ จะทำให้ทราบถึงบทบาทของพลูคาวที่มีต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์

2. เพื่อศึกษากลไกในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดการตาย

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพลูคาว และฟลาโวนอยด์ที่มีการรายงานว่าพบในพลูคาว 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง โดยจะประเมินจากการวัดจากการลดปริมาณของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง และการหลั่งไซโตไคน์ เช่น IL-1β, IL-2, IL-6 และ TNF-α ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ Jurkat และ U937 ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *In vitro* model

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

2. ปริมาณของสารสกัดที่ได้ อาจจะแตกต่างกันไปตามวิธีการสกัด

3. ผลของสารสกัดพลูคาวที่ได้จากการทดสอบนั้น เป็นผลที่ได้จากพลูคาวที่ทำการเก็บ ณ สถานที่เดียว และในช่วงเวลาเดียว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำพลูคาวไปร่วมใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว

2. ทราบถึงบทบาทของพลูคาวในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

3. องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัยในอนาคต

4. สามารถนำความรู้ไปพัฒนาและส่งเสริมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เพื่อลดการนำเข้ายาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [2, 11, 12]

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นโรคมะเร็งระบบโลหิตที่ได้รับการค้นพบมายาวนานนับร้อยปี โดยในปี ค.ศ.1827 ได้รายงานผู้ป่วยรายแรก โดย Armand Velpeau ศัลยแพทย์ชาวฝรั่งเศส โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการในการสร้างเซลล์เม็ดเลือด (hematopoiesis) ในไขกระดูก ทำให้มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดผิดปกติออกมามาก จนไปรบกวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดปกติ ทำให้เกิดความผิดปกติของปริมาณและการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ในร่างกาย และสามารถเกิดขึ้นได้กับเซลล์ในหลายระดับ ตั้งแต่เซลล์ต้นกำเนิด (pluripotent hematopoietic stem cell) เซลล์ต้นกำเนิดเฉพาะสาย (myeloid stem cell or lymphoid stem cell) เซลล์ต้นกำเนิดเฉพาะบางประเภท (committed progenitor) จนไปถึงเซลล์ที่มีลักษณะที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature cell) โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้น จะมีความสามารถในการเจริญเติบโต และการไม่ตายตามกลไกธรรมชาติ (apoptosis) เมื่อมีการดำเนินของโรค จะทำให้เซลล์เม็ดเลือดที่มีความผิดปกติเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือด และกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ

ประเภทของมะเร็งเม็ดเลือดขาว [2, 13, 14]

ในการจำแนกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว สามารถจำแนกได้ตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีอาการ อาการทางคลินิก และการดำเนินของโรค ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) [1, 14]

โดยเกิดจากมีการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดสูงขึ้น หรือมีการแบ่งตัวที่ไม่สามารถหยุดลงได้ หรือมีการหยุดของการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์ ก็จะเกิดการเสียสมดุลของการผลิตเซลล์เม็ดเลือด เซลล์ที่แบ่งตัวไม่ยอมหยุดนี้จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนมากกว่าเซลล์ชนิดอื่นในไขกระดูก และเมื่อมีการพัฒนาของเซลล์หยุดลง เซลล์ตัวอ่อนก็จะมีปริมาณมาก จึงเรียกว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน

2. มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) [1, 14]

มะเร็งของเซลล์เม็ดเลือดบางประเภทที่ทำให้เกิดการสร้างเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน (blast cells) และเซลล์เม็ดเลือดตัวแก่ (mature cells) เป็นจำนวนมาก โดยที่สัดส่วนของ blast cells ในไขกระดูกไม่ได้มากผิดปกติ จะเรียกว่า มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง

ในการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง ยังสามารถแบ่งได้ตามชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่

Lymphocytic leukemia คือ มีการพบเซลล์ผิดปกติในสาย lymphoid ได้แก่ Lymphocytes และ plasma cells เป็นจำนวนมากในกระแสเลือด

Myelocytic leukemia คือ มีการพบเซลล์ผิดปกติในสาย myeloid ได้แก่ neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) และเกล็ดเลือด (platelets) เพิ่มมากขึ้นในกระแสเลือด

กล่าวโดยสรุป โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะสามารถจำแนกชนิดได้เป็นประเภท ๆ ดังต่อไปนี้

- Acute myelogenous leukemia (AML)
- Acute lymphocytic leukemia (ALL)
- Chronic myelogenous leukemia (CML)
- Chronic lymphocytic leukemia (CLL)

สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาว [1, 2, 11, 15-18]

สาเหตุของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้น มักจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยจะทำให้เกิดการทำลาย DNA ของ cells ทั้งการเกิด chromosome translocation หรือ เกิดการ mutation โดยที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง อาจจะเกิดความผิดปกติของพันธุกรรมได้หลาย ๆ ชนิด การทำลาย DNA นั้น อาจเกิดจากหลาย ๆ ปัจจัย ซึ่งอาจจะสรุปได้ดังต่อไปนี้ คือ

1. สารก่อมะเร็ง (Chemical carcinogens) คือ สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนภายในเซลล์ โดยเมื่อได้รับสารเคมีเข้าไปในร่างกาย สารเคมีเหล่านี้จะไปจับกับสารภายในเซลล์ เช่น DNA, RNA และโปรตีน ทำให้เกิดความผิดปกติในการ replication, transcription และ translation เมื่อได้รับเป็นระยะเวลานาน ๆ ก็จะก่อให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่างชนิดกันไป

2. รังสี (Ionizing radiation) คือ รังสีทำให้เกิดการทำลายของสารพันธุกรรม ทั้งจากรังสีเอง และจากการที่รังสีไปทำปฏิกิริยากับน้ำในเซลล์ทำให้เกิด free radicals (hydroxyl radical,OH●) และ free radicals จะไปทำลายสารพันธุกรรม จนทำให้เกิดกลายเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวในที่สุด จากการที่ร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมความผิดปกตินั้นได้

3. ความผิดปกติของโครโมโซม (Chromosomal aberration) คือ ความผิดพลาดในการสร้างโครโมโซม รวมถึงในโรคทางพันธุกรรมบางชนิด เช่น โรค Down's symdrome จะทำให้เกิดความเสี่ยงในการที่จะเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ 10 – 20 เท่า เนื่องจากความไม่เสถียรของสารพันธุกรรม และการที่ร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมความผิดปกติที่เกิดจากการทำลายของ DNA ได้ ซึ่งในปัจจุบันก็ได้มีการตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมหลายชนิดที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่น Philadelphia (Ph) chromosome

4. ไวรัส (viruses) คือ ไวรัสบางชนิดสามารถสอดแทรกยีนของไวรัสไปในระหว่างยีนต่าง ๆ ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้ข้อมูลทางพันธุกรรมมีความผิดปกติไป เช่น human T-cell leukemia virus (HTLV) ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรค adult T-cell leukemia ในคน

5. เคมีบำบัด ที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ก็อาจจะทำให้เกิดการทำลายของ DNA และเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการทำให้เกิดโรคมะเร็งชนิดอื่น รวมถึงโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย

6. สารอาหาร การที่ร่างกายขาดสารอาหารที่จำเป็นในการสร้างสารพันธุกรรม เช่น folic acid และ vitamin B12 ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการทำลายของ DNA โดยอาจจะเป็นสาเหตุร่วมกับ การได้รับสารเคมี หรือการได้รับรังสี จนทำให้ก่อให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวขึ้นได้

โดยสาเหตุต่าง ๆ เหล่านี้จะทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของยีน ทำให้พันธุกรรมของเซลล์มีความผิดปกติ จนทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการแบ่งตัว เกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้นไม่หยุด และนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด

อาการของมะเร็งเม็ดเลือดขาว [1, 2, 19]

อาการของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ขึ้นอยู่กับจำนวน และตำแหน่งที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวไปอยู่ โดยผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังอาจจะไม่มีอาการ ส่วนใหญ่ตรวจพบจากการตรวจสุขภาพประจำปี และผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน มักมาด้วยอาการปวดหัว คลื่นไส้ หน้ามืด เวียนศีรษะ มีไข้ ติดเชื้อบ่อย รู้สึกอ่อนแรง เหนื่อยง่าย น้ำหนักลด มีเลือดออกง่าย เลือดจาง และซีด ซึ่งอาการเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจงที่จะบอกได้ว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว

จำเป็นต้องมีการซักประวัติ รวมไปถึงการตรวจร่างกายอย่างละเอียด เพื่อที่จะทำการวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวออกจากโรคอื่น

อาการของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน [19]

ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิด AML มักจะตรวจพบในผู้ใหญ่ ส่วนในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิด ALL มักจะพบบ่อยในเด็ก ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันส่วนใหญ่มักจะมีอาการเป็นมาไม่นาน โดยอาการที่สำคัญของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน ได้แก่ อาการของ bone marrow failure ซึ่งเป็นผลจากการที่ไขกระดูกเกิดความล้มเหลวในกระบวนการผลิตเม็ดเลือด ทำให้เซลล์ที่ผลิตออกมานั้น ไม่สามารถเจริญเป็นตัวแก่ได้ ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติมีจำนวนน้อยลง ทำให้เกิดภาวะติดเชื้อได้ง่าย ผู้ป่วยอาจจะมาด้วยอาการเจ็บคอ ไข้ ไอและหอบ เกิดการอักเสบ และหากมีการติดเชื้อที่รุนแรง อาจะทำให้มีการติดเชื้อในกระแสเลือด และเมื่อไขกระดูกมีเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น ก็จะส่งผลต่อการผลิตเม็ดเลือดชนิดอื่นด้วย ทำให้การสร้างเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดลดลง เกิดอาการซีดอ่อนเพลีย เวียนศีรษะ หน้ามืด เป็นลม หัวใจเต้นเร็ว มีอาการเลือดออกผิดปกติ มีจุดเลือดออกตามผิวหนัง มีจ้ำเลือดหรือจ้ำเขียว และในบางรายอาจจะมีอาการที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ (leukemic infiltration) ได้

อาการของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง [19]

ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมักจะมีการดำเนินของโรคเป็นเวลานาน อาจตรวจพบโดยบังเอิญจากการตรวจสุขภาพประจำปี หรือตรวจร่างกายทั่วไป โดยที่ผู้ป่วยไม่มีอาการใด ๆ อาการที่มักจะพบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังชนิด CML นั้น คือ อาการแน่นท้อง อึดอัด รับประทานอาหารได้น้อยลง จากการที่ม้ามมีขนาดโตจนไปเบียดกระเพาะอาหาร รวมไปถึงอาจมีอาการเจ็บบริเวณชายโครงซ้ายร่วมด้วย บางรายอาจจะมาด้วยเรื่องเลือดออกผิดปกติทั้งที่ปริมาณของเกล็ดเลือดไม่ต่ำ เนื่องจากเกิดความผิดปกติของการทำงานของเกล็ดเลือด (platelet dysfunction) ส่วนผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังชนิด CLL มักมีอาการต่อมน้ำเหลืองโตขนาดเล็ก ๆ เฉพาะบางตำแหน่ง ไปจนถึงต่อมน้ำเหลืองโตขนาดใหญ่ทั่วร่างกาย อาจมีตับม้ามโต และต่อมน้ำเหลืองในช่องท้องโต บางรายมาด้วยอาการซีด อ่อนเพลีย หรือมีเลือดออกผิดปกติ ผู้ป่วยมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย จากการทำงานที่ผิดปกติของเม็ดเลือดขาว

การวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [2, 11, 20]

เนื่องจากอาการของมะเร็งเม็ดเลือดขาว มีอาการที่คล้ายกับโรคอื่น ๆ จึงทำให้ต้องมีการวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ออกจากโรคอื่น ๆ โดยจำเป็นจะต้องอาศัยการซักประวัติ และการตรวจร่างกายอย่างละเอียด และมักเริ่มต้นทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count, CBC) เพื่อที่จะได้ค่าที่สำคัญในการนำไปวินิจฉัยได้แก่ ฮีโมโกลบิน (hemoglobin), ฮีมาโตคริต (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell count), จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count), จำนวนของเกล็ดเลือด (platelet count) และชนิดของเม็ดเลือดขาว (differential count) รวมไปถึงลักษณะที่ผิดปกติของเม็ดเลือดแดง (red blood cell morphology) โดยจะพบว่ามีระดับของเม็ดเลือดขาวที่สูงผิดปกติ หรือต่ำลงพร้อม ๆ กับการที่พบระดับของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดที่ต่ำลงด้วย โดยหากมีระดับของเม็ดเลือดขาวที่สูงผิดปกติ จะต้องทำการตรวจสอบเซลล์เม็ดเลือดขาวที่สูงขึ้นนั้นว่าเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภทใด และเป็นเซลล์ระยะตัวอ่อน หรือตัวแก่ และเพื่อเป็นการยืนยันผลของการตรวจนั้นจะทำการเจาะไขกระดูกเพื่อให้ได้ผลการวินิจฉัยที่แน่นอน โดยจะทำการประเมินปริมาณของเซลล์ทั้งหมดในไขกระดูก และประเมินว่ามีจำนวนของเซลล์ชนิดใดที่เห็นได้อย่างเด่นชัด ซึ่งจะพบเซลล์ที่มีความผิดปกติ (abnormal blast cells) มากกว่า 5% โดยมีหลักเกณฑ์ในการจำแนกมีหลายหลักเกณฑ์ โดยในที่นี้จะกล่าวถึง French-American-British (FAB) classification และ WHO classification 2008

FAB classification [14, 21]

เป็นการจำแนกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในระยะแรก โดยใช้ลักษณะและการติดสีของเซลล์ที่ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะทำให้สามารถแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ ต่อมามีการนำ cytochemistry classification ซึ่งเป็นการตรวจหาสารเคมีภายในเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์ และ lipids บนผิวเซลล์ มาช่วยในการจำแนกชนิดของ leukemia และมีการใช้ immunologic classification ซึ่งเป็นการตรวจหา surface markers ที่อยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดต่าง ๆ เข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยอาศัย monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ surface markers เหล่านั้น ซึ่งจะทำให้สามารถแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันออกได้เป็น Acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ Acute myeloid leukemia (AML) ซึ่งยังสามารถแยกชนิดย่อยลงไปได้อีก คือ

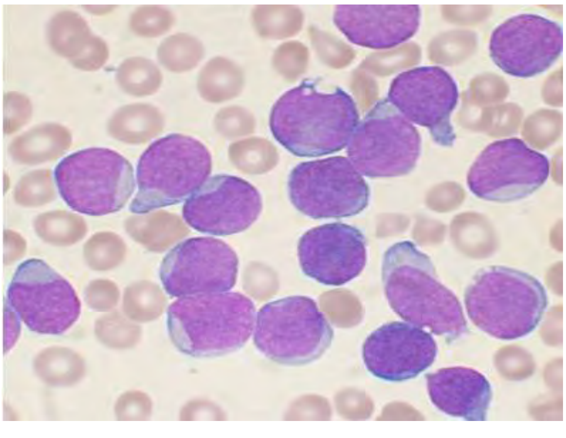
1. ALL แบ่งออกได้เป็น L1, L2 และ L3

2. AML แบ่งออกได้เป็น M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 และ M7

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่าง myeloblast และ lymphoblast [14]

	Myeloblast	Lymphoblast
สัดส่วนของ nucleus ต่อ cytoplasm (N:C ratio)	ต่ำ	สูง
Chromatin	ละเอียด	เป็นปื้น ๆ(clumped)
Nucleolus	2-5 อัน	0-1 อัน
Granule	มี	ไม่มี
Auer rod	มี/ไม่มี	ไม่มี
Cytoplasm	ฟ้าเทา (blue-gray)	ฟ้า (blue)
Myeloperoxidase (MPO)	+	-
Sudan Black B (SBB)	+	-
Periodic acid-Schiff (PAS)	-	+/-
Naphthol-ASD-chloroacetate esterase	+/-	-
Nonspecific esterase	+/-	-

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) [14, 21]



รูปที่ 1 ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL [22]

L1 subtype

ส่วนใหญ่จะพบเซลล์ขนาดเล็ก ขนาดเท่า ๆ กัน ลักษณะ nuclear chromatin จะมีลักษณะละเอียดเหมือนกันในคนไข้รายเดียวกัน และมีการกระจายกันดี รูปร่างของ nucleus มีลักษณะกลม มักจะไม่เห็น nucleoli มี cytoplasm น้อย

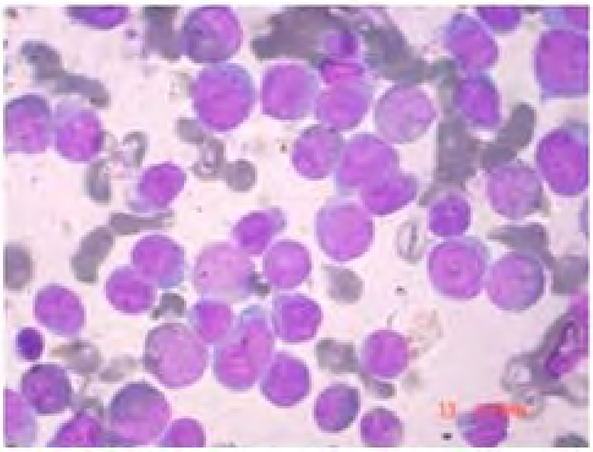
L2 subtype

เซลล์ที่พบจะมีขนาดใหญ่ประมาณ 2 เท่าของ small lymphocyte และพบเซลล์มีขนาดต่าง ๆ กัน ลักษณะของ nuclear chromatin ที่หลากหลายทั้งละเอียดและไม่ละเอียดในคนไข้รายเดียวกัน ลักษณะของ nucleus มีความหลากหลาย พบ nucleoli และพบมีความหลากหลายของปริมาตรของ cytoplasm ด้วย

L3 subtype

เซลล์ที่พบจะมีขนาดใหญ่ nuclear chromatin มีลักษณะ homogenous และมีเนื้อละเอียด nucleus มีรูปร่างปกติ cytoplasm มีปริมาตรมากปานกลาง และอยู่รอบ nucleus และพบ cytoplasmic vacuolation ที่เด่นชัด

Acute myeloid leukemia (AML) [14, 21]



รูปที่ 2 ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML [23]

M0 หรือ Myeloblastic leukemia with minimal maturation

เป็น AML ที่ไม่พบลักษณะของ myeloid differentiation จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่การตรวจด้วย cytochemistry และ flow cytometry พบว่ามีการแสดงออกของ myeloid antigen ประกอบด้วย blast cells มากกว่า 30% ของเซลล์ที่เป็น non-erythroid cells โดยblasts

น้อยกว่า 3% ติดสี MPO, SBB หรือ Naphthol-ASD-chloroacetate esterase ตรวจพบ CD33, CD13/CD117, CD34 และอาจพบ TdT และต้องไม่พบ Auer rod

M1 หรือ Myeloblastic leukemia without cytologic maturation หรือ Undifferentiated leukemia

เซลล์ใน bone marrow จะมี granulocytic differentiation โดยจะพบ blast cell มากกว่า 90% ของเซลล์ที่เป็น non-erythroid cells และบางส่วนจะพบ azurophilic granules และ/หรือ Auer rods และ blast $\geq$ 3% ติดสี MPO, SBB โดยที่ maturation ของ cells จะไม่มากกว่านั้น กล่าวคือ พบ promyelocyte, monocyte หรือ mature granulocyte รวมกันน้อยกว่า 10% การตรวจทาง immunophenotyping พบการแสดงออกของ myeloid antigen ตัวใดตัวหนึ่ง เช่น CD13, CD33, CD 117 โดยพบ CD34 และ HLA-DR ร่วมด้วยเป็นส่วนใหญ่

M2 หรือ Myeloblastic leukemia with significant maturation

ลักษณะที่แตกต่างจาก M1 คือ จะพบ cells ที่มี maturation ตั้งแต่ระยะ promyelocyte โดยทั่วไปจะพบ aurophilic granules จำนวนมาก หรือพบ Auer rods ซึ่งจะพบ blast cells 30-90% โดย blast $\geq$ 3% ติดสี MPO หรือ SBB มีการพบ granulocytic series มากกว่า 10% และพบ monocytic series น้อยกว่า 20% การตรวจทาง immunophenotyping พบการแสดงออกของ CD34, HLA-DR และ CD13

M3 หรือ Hypergranular promyelocytic leukemia

พบ promyelocytes เป็นส่วนใหญ่ มี promyelocytes และ/หรือ blast $\geq$ 30% พบการติดสี MPO หรือ SBB มาก มี heavy granulation ใน cytolplasm พบ granules เม็ดใหญ่ มี Auer rods เป็นกลุ่ม (faggots) กระจายอยู่ การตรวจทาง immunophenotyping พบการแสดงออกของ CD13 และ CD117 แต่ไม่พบ CD34 และ HLA-DR

M3 var หรือ Hypogranular promyelocytic leukemia

เป็น M3 ที่ผิดปกติ โดยมี granules น้อยกว่าปกติ แต่ในความเป็นจริงเกิดจากการที่มี granules ที่มีขนาดเล็กละเอียดมาก คล้ายฝุ่นละออง จนมักมองไม่เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีการติดสีของ MPO หรือ SBB

M4 หรือ Myelomonocytic leukemia

พบ blast cells มากกว่า 30% โดยพบทั้ง myeloblast, monoblast และ promonocyte มี granulocytic และ monocytic differentiation ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยพบมากกว่า 30% แต่น้อยกว่า 80% พบ promonocytes และ monocytes มากกว่า 20% ของ nucleated cells ใน bone marrow การตรวจทาง immunophenotyping พบการแสดงออกของ CD13, CD33, CD65 และ CD15 ในกลุ่มเซลล์สาย myeloid ส่วนในกลุ่ม monocytic lineage พบการแสดงออกของ CD14, Cd4, CD11b, CD11c, CD64, CD68, CD36 และ CD163

M4eo หรือ Myelomonocytic leukemia with eosinophilia

จะมีลักษณะเช่นเดียวกับ M4 แต่จะพบ eosinophilia ร่วมด้วย โดยจะมีจำนวน eosinophil มากกว่า 5% และมีลักษณะ immature และมี granules เป็น basophilic

M5 หรือ Monocytic leukemia

ต้องพบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสาย monocytic lineage อย่างน้อยร้อยละ 80 ในไขกระดูก โดยนับรวม monoblast, promonocyte และ monocyte สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

M5a หรือ Poorly differentiated (monoblastic) จะพบลักษณะของ blast cells ใน bone marrow โดยพบ monoblasts มากกว่า 80% ติดสี nonspecific esterase (NSE) และถูกยับยั้งได้ด้วย NaF และไม่ติดสี MPO หรือ SBB การตรวจทาง immunophenotyping พบเซลล์สาย myeloid ที่ติด CD13, CD33, CD65, CD15 และ HLA-DR และอาจพบ CD34, CD117 ได้บ้าง และตรวจพบ monocytic marker คือ CD14, CD4, Cd11b, CD11c, Cd64, Cd68, CD36 และ CD163

M5b หรือ Differentiated จะพบ promonocytes เป็นส่วนใหญ่ monoblasts น้อยกว่า 80% ส่วนใหญ่เป็น promonocytes มีการติดสี NSE และถูกยับยั้งได้ด้วย NaF และอาจมีการติดสี MPO หรือ SBB ได้บ้าง การตรวจทาง immunophenotyping พบเซลล์สาย myeloid ที่ติด CD13, CD33, CD65, CD15 และ HLA-DR และตรวจพบ monocytic marker คือ CD14, CD4, Cd11b, CD11c, Cd64, Cd68, CD36 และ CD163

M6 หรือ Erythroleukemia

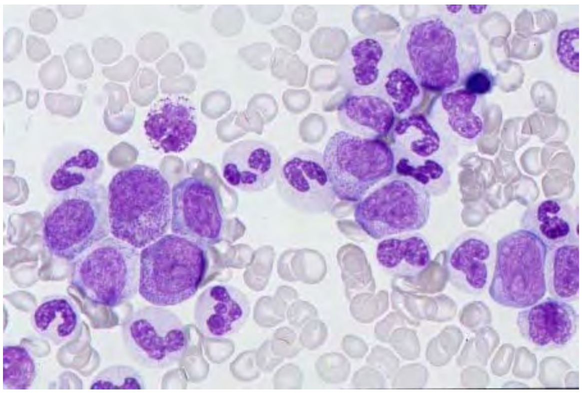
จะพบ erythropoietic cells มากกว่า 50% ของ nucleated cells ทั้งหมดใน bone marrow โดยจะพบ myeloblasts มากกว่า 30% และมีลักษณะของ erythroblasts ที่ผิดปกติ โดยเฉพาะ nucleus จะมีหลาย lobes และขนาดของ lobes ก็จะแตกต่างกัน ติดสี PAS

M7 หรือ Megakaryoblastic leukemia

เป็น leukemia ของ megakaryocytes โดยพบ megakaryoblasts มากกว่า 30% จากการตรวจ morphology หรือตรวจ immunophenotyping พบ CD41 และ CD61 และมักมี myelofibrosis การทำ bone marrow biopsy จะทำให้ช่วยสามารถวินิจฉัยได้

สำหรับมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังนั้น จะสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด คือ chronic myelogenous leukemia (CML) และ chronic lymphocytic leukemia (CLL)

Chronic myelogenous leukemia (CML) [14]



รูปที่ 3 ลักษณะมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML [24]

เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเรื้อรังที่พบว่า สามารถเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมและยีนได้ คือ Philadelphia (Ph) chromosome และ *BCR-ABL1* fusion gene โดยเป็นโรคที่มีการดำเนินโรคจากระยะเรื้อรัง (chronic phase) ไปเป็นระยะต่าง ๆ คือ accelerated phase (AP) และ blast phase (BP) สำหรับการวินิจฉัยนั้นจะพบเม็ดเลือดขาวหลายระยะในกระแสเลือด ตั้งแต่ ระยะ blast ไปจนถึง segmented neutrophil โดยในระยะเรื้อรังจะพบ blast และ promyelocyte จำนวนไม่มาก โดยพบ blast น้อยกว่า 2% ในเลือด และน้อยกว่า 5% ในไขกระดูก เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในระยะเรื้อรังจะเป็น myelocyte และ segmented neutrophil และอาจพบปริมาณของ basophil, eosinophil และ monocyte เพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย เกล็ดเลือดจะค่อนข้างสูง

การตรวจไขกระดูกจะพบ hypercellular marrow with granulocyte hyperplasia มี Myeloid (M): Erythroid (E) ratio สูง megakaryocyte มีรูปร่างผิดปกติ

ในการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยจะมีการเปลี่ยนแปลงจากระยะเรื้อรังไปสู่ระยะสุดท้ายจำเป็นต้องอาศัยเกณฑ์ดังนี้

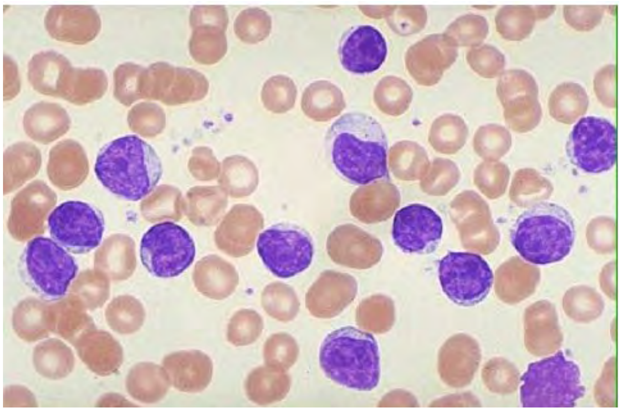
ลักษณะที่พบในระยะ accelerated phase

- มีการเพิ่มขึ้นของ WBC ($>10 \times 10^9$/ลิตร) หรือม้ามมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยไม่มีการตอบสนองต่อการรักษา
- มี persistant thrombocytosis ($>1,000 \times 10^9$/ลิตร) โดยยาไม่สามารถที่จะควบคุมได้
- มี persistant thrombocytopenia ($<100 \times 10^9$/ลิตร) โดยที่ไม่เกี่ยวกับการรักษา
- มี clonal cytogenetic evolution
- มี basophil ตั้งแต่ 20% ขึ้นไปในเลือด
- มี blast จำนวน 10-19% ในเลือดหรือในไขกระดูก

ลักษณะที่พบในระยะ blast phase

- มีจำนวนของ blast ตั้งแต่ 20% ขึ้นไปในเลือดหรือในไขกระดูก
- มีการรวมกลุ่มของ blast ในลักษณะ large aggregate ในไขกระดูก
- เกิด extramedullary blast proliferation

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) [14, 25]



รูปที่ 4 ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL [26]

เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังที่เชื่อว่าเกิดจากความผิดปกติของกระบวนการตายแบบ apoptosis มากกว่ามีการเพิ่มจำนวนจากการแบ่งตัวของเซลล์มากผิดปกติ โดยมีเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคนี้ คือ ต้องพบ lymphocyte ในกระแสเลือด อย่างน้อย 5×10^9/ลิตร เป็นเวลานาน

และ lymphocyte ที่พบจะต้องมีลักษณะเป็น mature cell โดยพบเซลล์ที่เป็นระยะ prolymphocyte น้อยกว่า 55% และมีการพบ lymphocyte อย่างน้อย 30% ในไขกระดูก และพบการแสดงออกของ B-cell marker อย่างน้อย 1 ชนิด ได้แก่ CD19, CD20, CD23 ร่วมกับ T-cell marker คือ CD5 และพบการแสดงออกของ kappa หรือ lambda ซึ่งเป็นการแสดงออกของ B-cell clonality รวมไปถึงมี surface immunoglobulin ในระดับต่ำ โดยในการตรวจเลือดในผู้ป่วย CLL จะพบ lymphocyte ขนาดเล็กถึงปานกลาง นิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ chromatin มีลักษณะ clumped ไม่พบ nucleolus

และในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้น หากแบ่งตามเซลล์ที่เกิดโรคก็จะแบ่งย่อยออกไปได้อีกดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามชนิดของเซลล์ที่เกิดโรค [14]

ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	ชนิดของเซลล์ที่เกิดโรค
Acute myeloid leukemia (AML)	Myeloid stem cell or progenitor cell
Acute promyelocytic leukemia (APL)	Myeloid stem cell
B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL)	Lymphoid stem cell or progenitor cell
T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)	T-cell progenitor or thymic lymphocyte
Chronic myelogenous leukemia (CML)	Pluripotent hematopoietic stem cell
Chronic neutrophilic leukemia (CNL)	Stem cell with limited lineage potential
Chronic eosinophilic leukemia (CEL)	Stem cell with limited lineage potential
Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)	Myeloid stem cell
Chronic lymphocytic leukemia (CLL)	Antigen-experienced B-cell
Prolymphocytic leukemia (PLL)	Unknown mature B-cell
Hairy cell leukemia (HCL)	Late, activated memory B-cell
Plasma cell leukemia (PCL)	Plasma cell
T-large granular lymphocyte (T-LGL) leukemia	CD8+ T-cell
Natural killer cell (NK-cell) leukemia	NK-cell
Sezary syndrome	CD4+ T-cell

WHO classification 2008 [14, 27, 28]

ในปี ค.ศ. 2008 องค์การอนามัยโลกได้พยายามแบ่งชนิดของมะเร็งระบบโลหิตตามพยาธิกำเนิด โดยทำการจัดกลุ่มโรคใหม่ตามเซลล์ที่ทำให้เกิดโรค และลักษณะเฉพาะทางคลินิกที่สัมพันธ์กับเซลล์ ทำให้มะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้ถูกกระจายออกไปอยู่กับหลายกลุ่มโรค โดยมะเร็ง

เม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันหลายชนิดจะถูกแยกออกไปรวมกับโรคอื่นในกลุ่ม acute leukemia, myeloproliferative neoplasms (MPN) และ myelodysplastic/myeloproliferartive neoplasms (MDS/MPN) โดยใน WHO classification 2008 จะทำการแบ่งชนิดของโรคออกเป็นกลุ่มดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 โรค myeloid และ lymphoid neoplasms ตาม WHO classification [27, 28]

Myeloproliferative neoplasms (MPN)
Chronic myelogenous leukemia, *BCR-ABL1*-positive
Chronic neutrophilic leukemia
Polycythemia vera
Primary myelofibrosis
Essential thrombocythemia
Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified
Mastocytosis
Cutaneous mastocytosis
Systemic mastocytosis
Mast cell leukemia
Mast cell sarcoma
Extracutaneous mastocytoma
Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
Myeloid and lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* or *FGFR1*
Myeloid and lymphoid neoplasms with *PDGFRA* rearrangement
Myeloid neoplasms with *PDGFRB* rearrangement
Myeloid and lymphoid neoplasms with *FGFR1* abnormalities
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)
Chronic myelomonocytic leukemia
Atypical chronic myeloid leukemia, *BCR-ABL1*-negative
Juvenile myelomonocytic leukemia
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
Provision entity: Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Myelodysplastic syndromes(MDS)

Refractory cytopenia with unlineage dysplasia

Refractory anemia

Refractory neutropenia

Refractory thrombocytopenia

Refractory anemia with ring sideroblasts

Refractory cytopenia with multilineage dysplasia

Refractory anemia with excess blasts

Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q)

Myelodysplastic syndrome, unclassifiable

Childhood myelodysplastic syndrome

Provision entity: Refractory cytopenia of childhood

Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22), *RUNX1-RUNX1T1*

AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;p22); *CBFB-MYH11*

Acute promyelocytic leukemia(APL) with t(15;17)(q22;q12);*PML-RARA*

AML with t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*

AML with t(6:9)(p23;q34); *DEK-NUP214*

AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3.3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*

AML (megakaryoblastic) with t(1:22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*

Provision entity: AML with mutated NPM1

Provision entity: AML with mutated CEBPA

Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms (continued)
Acute myeloid leukemia, not otherwise specified
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Acute erythroid leukemia
Pure erythroid leukemia
Erythroleukemia, erythroid/myeloid
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis
Myeloid leukemia associated with Down syndrome
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Acute leukemias of ambiguous lineage
Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged
Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS
Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS
Provision entity : Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Precursor lymphoid neoplasms

B lymphoblastic leukemia/lymphoma

B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); *MLL* rearranged

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy (hypodiploid ALL)

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32); *IL3-IGH*

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); *E2A-PAX1*

T lymphoblastic leukemia/lymphoma

Mature B-cell neoplasms

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma

B-cell prolymphocytic leukemia

Splenic B-cell marginal zone lymphoma

Hairy cell leukemia

Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable

Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma

Hairy cell leukemia-Variant

Lymphoplasmacytic lymphoma

Waldenström macroglobulinemia

Heavy chain diseases

Alpha heavy chain disease

Gamma heavy chain disease

Mu heavy chain disease

Plasma cell myeloma

Solitary plasmacytoma of bone

Extraosseous plasmacytoma

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)

Nodal marginal zone lymphoma

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Mature B-cell neoplasms (continued)
Pediatric nodal marginal zone lymphoma
Follicular lymphoma
Pediatric follicular lymphoma
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg-type
EBV positive DLBCL of the elderly
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
Primary effusion lymphoma
Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma
Mature T-cell and NK-cell neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
Chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV positive T-cell lymphoproliferative disease of childhood
Hydroa vacciniforme-like lymphoma
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Mature T-cell and NK-cell neoplasms (continued)
Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sezary syndrome
Primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma
Primary cutaneous CD8 positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma
Primary cutaneous CD4 positive small/medium T-cell lymphoma
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
Anaplastic large cell lymphoma, ALK positive
Anaplastic large cell lymphoma, ALK negative

โดยในกลุ่มของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิด AML นั้น AML-M0 ถึง M7 ยกเว้น M3 ได้ถูกจัดตาม WHO classification 2008 ให้อยู่ในกลุ่ม AML-not otherwise specified และ AML ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมนั้นได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities และทำการปรับลดเกณฑ์ในการวินิจฉัยแยก AML จาก MDS โดยลดจำนวน blast ลง จาก 30% เป็น 20% ของ non-erythroid cells ในไขกระดูก

เมื่อทำการเปรียบเทียบมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามการแบ่งกลุ่มตาม FAB classification กับการแบ่งกลุ่มตาม WHO classification 2008 จะได้กลุ่มใหม่ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบ่งกลุ่มตาม WHO classification 2008 [14]

ชนิด	WHO classification 2008
Acute myeloid leukemia (AML)	AML and related precursor neoplasms
Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Precursor lymphoid neoplasms
Chronic myelogenous leukemia (CML)	Myeloproliferative neoplasms
Chronic neutrophilic leukemia (CNL)	Myeloproliferative neoplasms
Chronic eosinophilic leukemia (CEL)	Myeloproliferative neoplasms
Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)	Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms
Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)	Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia (CLL)	Mature B-cell neoplasms
Hairy cell leukemia (HCL)	Mature B-cell neoplasms
B-prolymphocytic leukemia (B-PLL)	Mature B-cell neoplasms
Burkitt leukemia variant (ALL-L3)	Mature B-cell neoplasms
T-prolymphocytic leukemia (T-PLL)	Mature T-cell & NK-cell neoplasms
T-cell large granular lymphocytic (T-LGL) leukemia	Mature T-cell & NK-cell neoplasms
Aggressive NK-cell leukemia	Mature T-cell & NK-cell neoplasms
Mast cell leukemia (MCL)	Myeloproliferative neoplasms
Plasma cell leukemia (PCL)	Plasma cell myeloma
Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL)	Mature T-cell & NK-cell neoplasms

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่า ได้มีการแบ่งแยกชนิดของ leukemia ออกไปเป็นกลุ่มต่าง ๆ โดย Chronic myelogenous leukemia ได้ถูกจัดไปอยู่ในกลุ่มของ Myeloproliferative neoplasms และ Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms ส่วน Chronic lymphocytic leukemia (CLL) จะถูกจัดไปอยู่ในกลุ่ม Mature B-cell neoplasms ส่วน acute leukemia ในส่วนของ Acute myeloid leukemia (AML) จะอยู่ในส่วนของ AML and related precursor neoplasms และ Acute lymphoblastic leukemia (ALL) หรือ Burkitt leukemia จะจัดอยู่ในกลุ่มของ Precursor lymphoid neoplasms ยกเว้น ALL-L3 จะถูกจัดไปอยู่ในกลุ่มของ Mature B-cell neoplasms เช่นเดียวกับ CLL

พลูคาว [29]

รูปที่ 5 ลักษณะของต้นพลูคาว [30]

พลูคาว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Houttuynia cordata* Thunb. จัดเป็นพืชในวงศ์ Saruraceae และมีชื่อเรียกอื่น ๆ คือ ผักก้านตอง ผักเข้าตอง ผักคาวทอง ผักคาวตอง พลูคาว (ไทย), chinese lizard tail, houttuynia (ทั่วไป), yu xing cao (จีน) พบได้ทั่วไปในทวีปเอเชียตั้งแต่เทือกเขาหิมาลัยไปจนถึงเวียดนาม รวมทั้งประเทศไทยและญี่ปุ่น [30] ลักษณะของต้นพลูคาวเป็นพืชล้มลุก มีกลิ่นคาว ลำต้นใต้ดินเป็นปล้องสั้นๆ สีนวล ตามข้อมีรากออกโดยรอบ ลำต้นที่อยู่เหนือดินสูง 10-30 เซนติเมตร ใบเดี่ยว ออกเวียนหรือออกสลับ แผ่นใบรูปไข่กว้าง 2.5-7.5 เซนติเมตร ยาว 3-9 เซนติเมตร ปลายใบแหลมมาก โคนใบรูปหัวใจ หรือรูปไต ขอบใบเรียบ เส้นใบออกที่โคนใบ 5-7 เส้น มีขนสั้นๆตามโคนใบแผ่นใบบนสีเขียวเข้มกว่าใต้ใบ ช่อดอกออกตามยอด หรือซอกใบใกล้ยอด รูปทรงกระบอกกว้าง กว้าง 5-8 มิลลิเมตร ยาว 2-2.5 เซนติเมตร มีกลีบประดับสีขาว 4 กลีบ รูปรี หรือรูปไข่กลับแกมขอบขนาด กว้าง 5-7 มิลลิเมตร ยาว 1-2 เซนติเมตร รองรับโคนช่อ ก้านช่อยาว 1-2 เซนติเมตร ช่อดอกประกอบด้วยดอกเล็กๆจำนวนมาก เรียงตัวแน่นตามความยาว

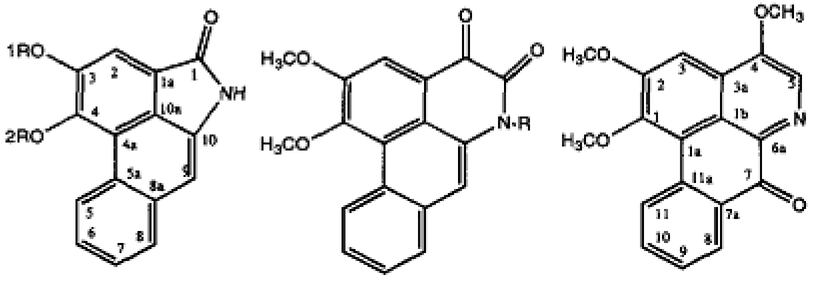
ของแกนช่อ ดอกแต่ละดอกไม่มีก้านดอก ไม่มีกลีบดอก มีเฉพาะเกสรเพศผู้ 3 อัน ยาวประมาณ 6 มิลลิเมตร อับเรณูสีเหลือง ดอกออกมากในเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม

สารออกฤทธิ์ที่พบในพลูคาว มีหลายชนิด ได้แก่ essential oil, alkaloids และ flavonoids

Essential oils [31] เช่น β-Myrcene, trans-β-Ocimene, n-Decanal, Methyl nonyl ketone, Bornyl acetate, n-Decanoic acid, Acetic acid geraniol ester, Caryophyllene, 4-Tridecanone และ Docosanoic acid, ethyl ester ดังตารางที่ 5

Alkaloids [32] เช่น Aristolactam A, Aristolactam B, Aristolactam A II, Piperolactam A, Norcepharadione B, Cepharadione B และ Splendidine ดังรูปที่ 6

Flavonoids [33, 34] เช่น Quercetin, Quercitrin, Hyperin และ Rutin



รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสาร alkaloids ที่พบในพลูคาว

1. Aristolactam B, 2. Piperolactam A, 3. Aristolactam A, 4. Norcepharadione B,

5. Cepharadione B และ 6. Splendidine [32]

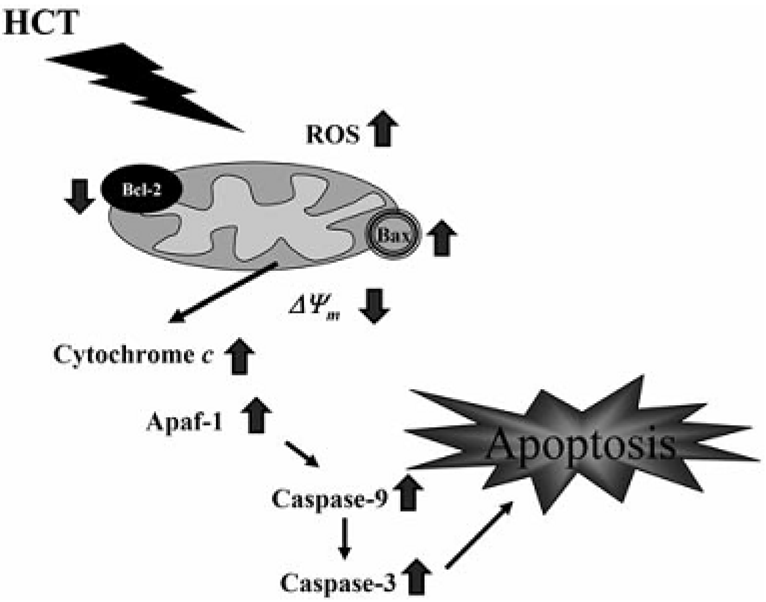
จากการศึกษาที่ผ่านมาคาดว่า พลูคาวสามารถใช้ในการรักษามะเร็งทางเดินอาหาร มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ [29, 35, 36] มะเร็งทางเดินหายใจ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด รักษาอาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้รังสีรักษา และเคมีบำบัด ยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว [3, 4, 29] ยับยั้งการอักเสบและเพิ่มภูมิต้านทาน [37-39] ยับยั้งการติดเชื้อ [31, 40, 41] ต่อต้านอนุมูลอิสระ [42-44] โดยพลูคาวจะทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยการไปกระตุ้น mitochondria ให้หลั่ง cytochrome C เพื่อให้ไปกระตุ้น caspase-9 และ caspase-3 ต่อไป จนเกิดการตายแบบ apoptosis ในที่สุด

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของ essential oils ที่พบในพลูคาว [31]

α-pinene	cis-β-Ocimene	Neodihydro carveol
Camphene	Nanonol	n-Decanoic acid
Sabinene	4-Terpineol	Acetic acid geraniol ester
β-pinene	α-Terpineol	3- methylene-undecane
β-Myrcene	n-Decanol	Lauraldehyde
α-Terpinene	trans-Pinocarvyl acetate	Caryophyllene
Cymene	Decanol	β-Farnesene
D-Limonene	Carvacrol	4-Tridecanone
trans-β-Ocimene	Methyl nonyl ketone	Patchoulene
γ-Terpinene	Bornyl acetate	α-Farnesene
2-Nonanone	2-Decanol	Tetradecanoic acid
2-Carene	Dodecene	Trans-Nerolidol
β-Linalool	Undecanal	Ethyl tridecanoate
Perillen	α-cyclogeraniol acetate	Caryophyllene oxide
2,6-Dimethyl-3,5,7-octatriene-2-ol	4,4,6,6-Tetramethyl-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene	
2,6-Dimethyl-2,7-octadiene-1,6-diol	Phenylcarbamic acid, 9-bromononyl ester	
7-Methoxy-3,7-dimethyl-octanol	Docosanoic acid, ethyl ester	

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของ bioactive components ที่พบในพลูคาว [34]

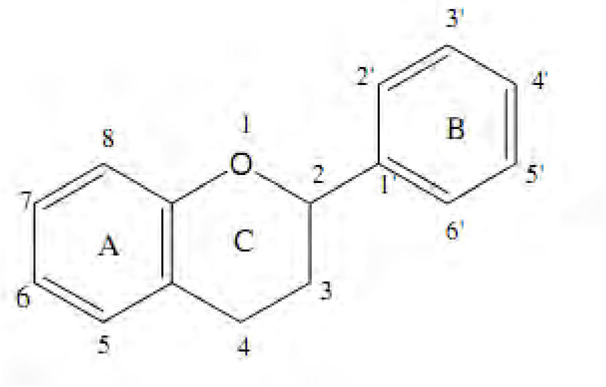
Chlorogenic acid
Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranoside
Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranoside
Rutin
Hyperin
Quercitrin
Piperpolactam A
Aristolactam B
Cepharadione B



รูปที่ 7 การเกิด apoptosis จากการเหนี่ยวนำของสารสกัดพลูคาว [36]

ฟลาโวนอยด์ [45]

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล (polyphenol) ที่พบมากที่สุดในพืช โดยเฉพาะผักและผลไม้ และอาหารที่มีพืชเป็นส่วนประกอบ โดยมีส่วนประกอบหลักของโครงสร้างเป็น 3-คาร์บอนเชื่อมกับวงแหวนไพแรน หรือวงแหวนไพรอน เรียกว่า phenylbenzopyrone structure (C6-C3-C6)

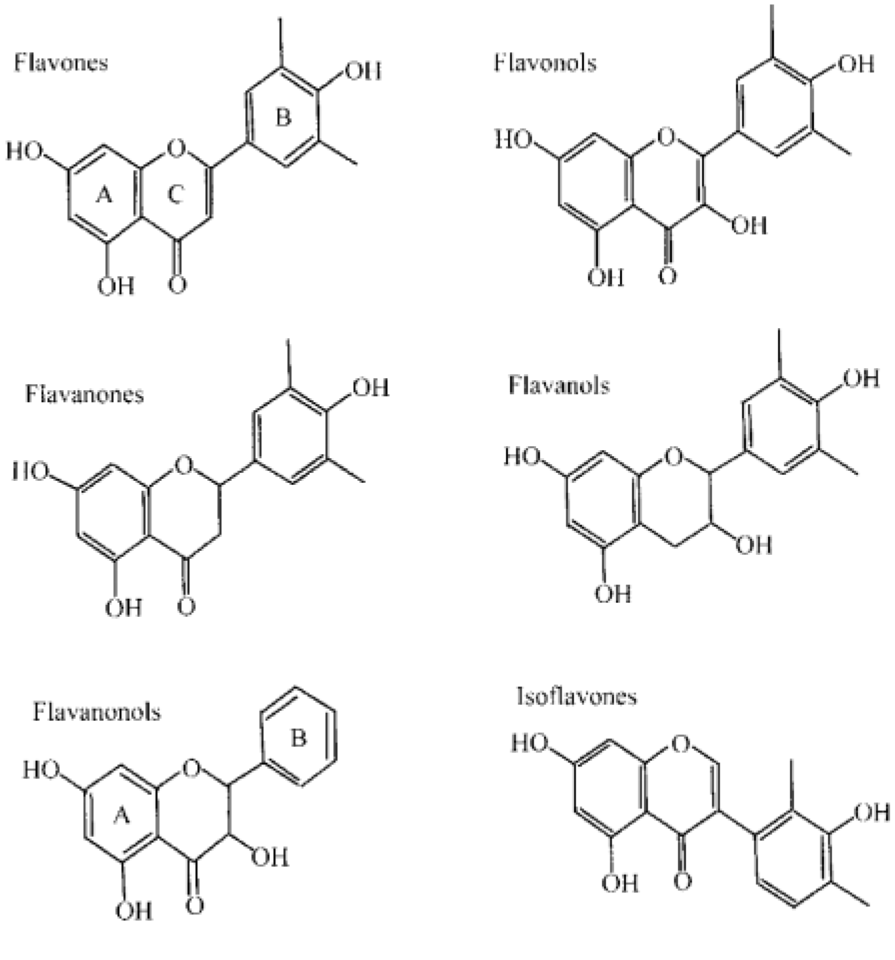


รูปที่ 8 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์ [46]

ฟลาโวนอยด์ยังสามารถแบ่งออกได้ ตามลักษณะเปิดของวงแหวนไพแรน B หรือ C ออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ flavones, flavanols, isoflavones, flavonols, flavanones และ flavanonols

ตารางที่ 7 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ [45]

Flavonoid subgroup	Representative flavonoids
Flavonols	Kaempherol, myricetin, quercetin, rutin
Flavones	Apigenin, chrysin, luteolin
Isoflavones	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin
Flavanols	Catechin, gallocatechin
Flavanones	Eriodictyol, hesperitin, naringenin
Flavanonols	Taxifolin

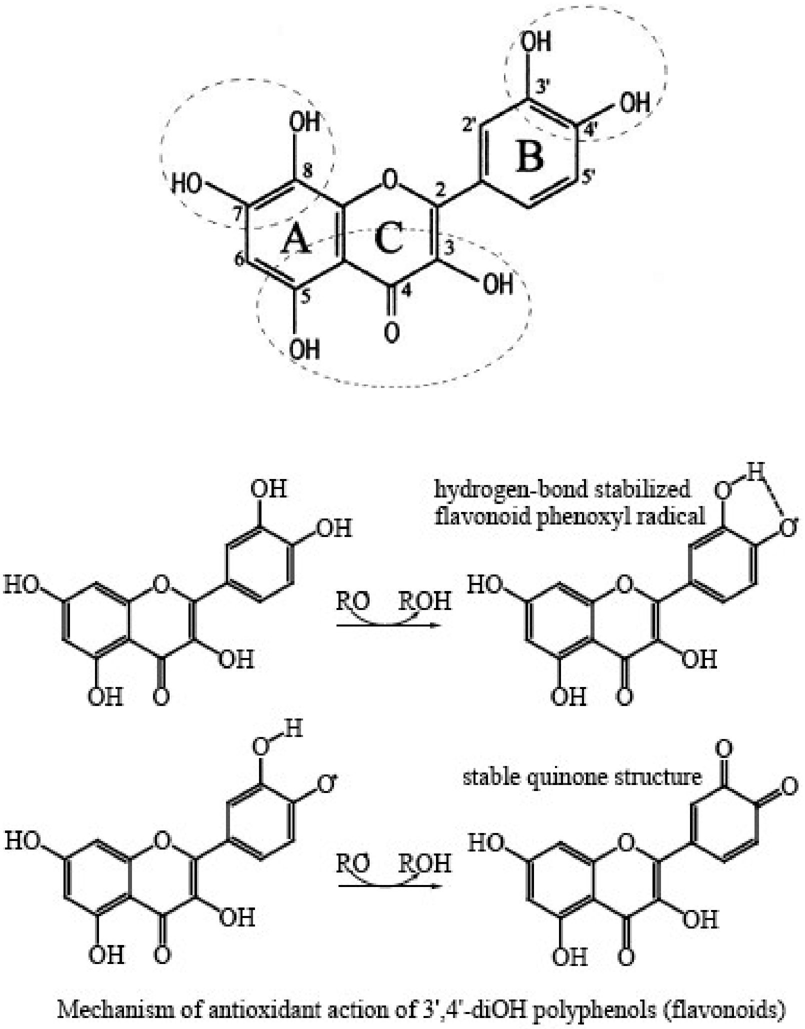


รูปที่ 9 ลักษณะโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ [45]

คุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ [45, 47]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารฟลาโวนอยด์นั้นมีคุณสมบัติทางด้านชีวภาพในหลาย ๆ ด้าน กล่าวคือ

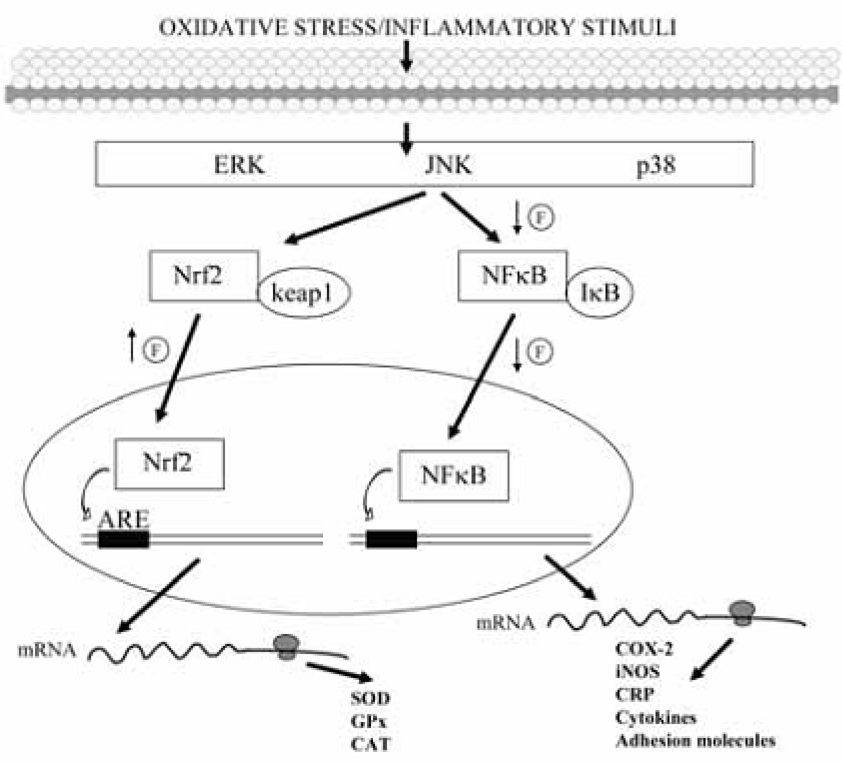
- ต่อต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) โดยฟลาโวนอยด์จะให้ H กับอนุมูลอิสระ (RO●) และจะมีการให้ H แก่อนุมูลอิสระอีกครั้ง หรือเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในฟลาโวนอยด์ [48]



รูปที่ 10 คุณสมบัติโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ในการต้านอนุมูลอิสระ [48, 49]

- ต่อต้านอาการอักเสบ [50] โดยจะไปลดการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase และ lipoxygenase [47] และลดการสังเคราะห์ของ eicosanoids [51] เช่น prostaglandin ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย และยังไปยับยั้งการ phosphorylation

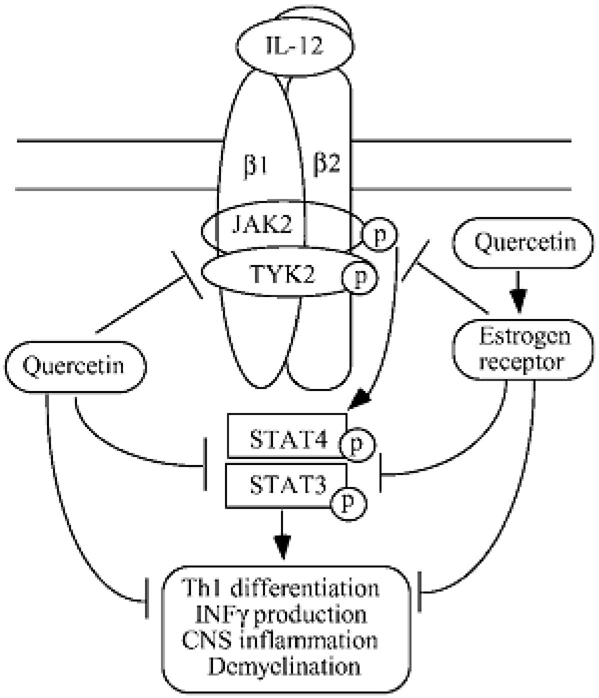
ของ IKB เพื่อไม่ให้ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส เพื่อสังเคราะห์ nitric oxide (NO) และ cyclooxygenase ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ [52]



รูปที่ 11 การต้านการอักเสบของสารฟลาโวนอยด์ [52]

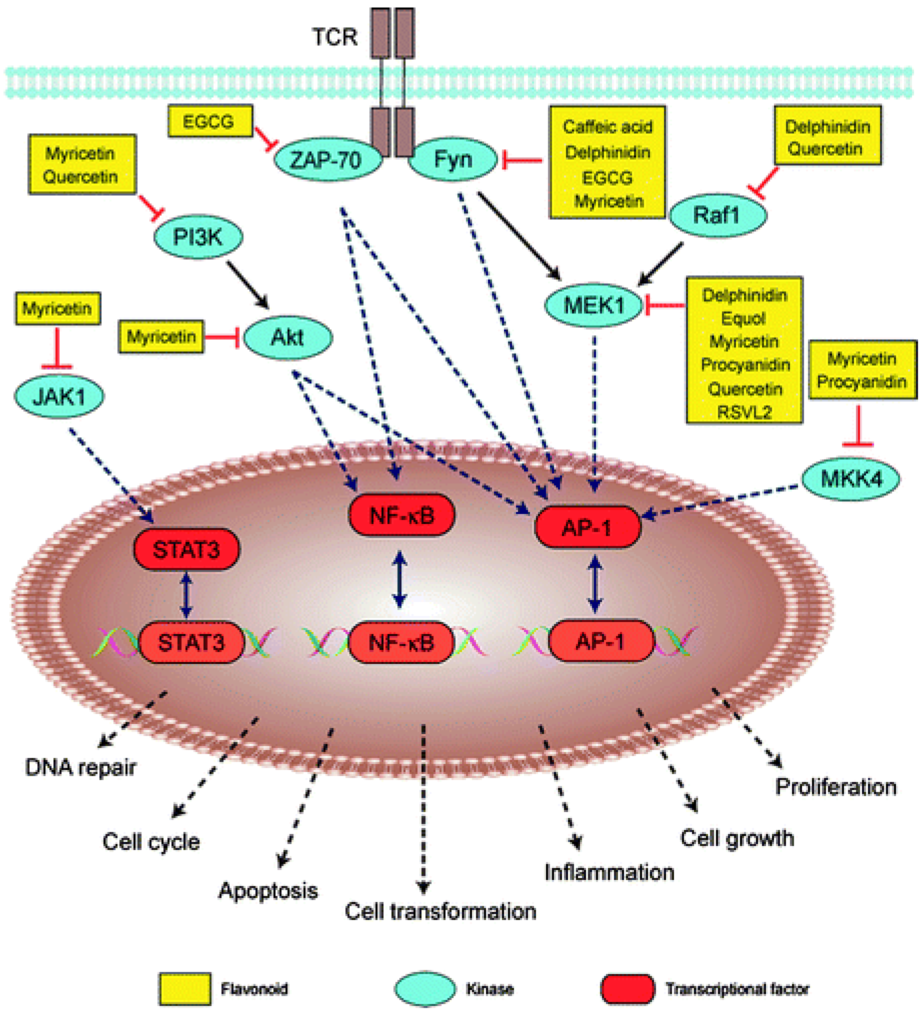
(ERK, extracellular signal-regulated kinases; JNK, c-Jun N-terminal kinase; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase; COX-2, cyclooxygenase; i-NOS, inducible nitric oxide synthase และ CRP, c-reactive protein)

- ต่อต้านอาการแพ้ โดยจะไปยับยั้งการส่งสัญญาณของ IL-12 ในการกระตุ้นให้เกิดการแพ้ โดยจะไปยับยั้ง JAK-STAT pathway [53]



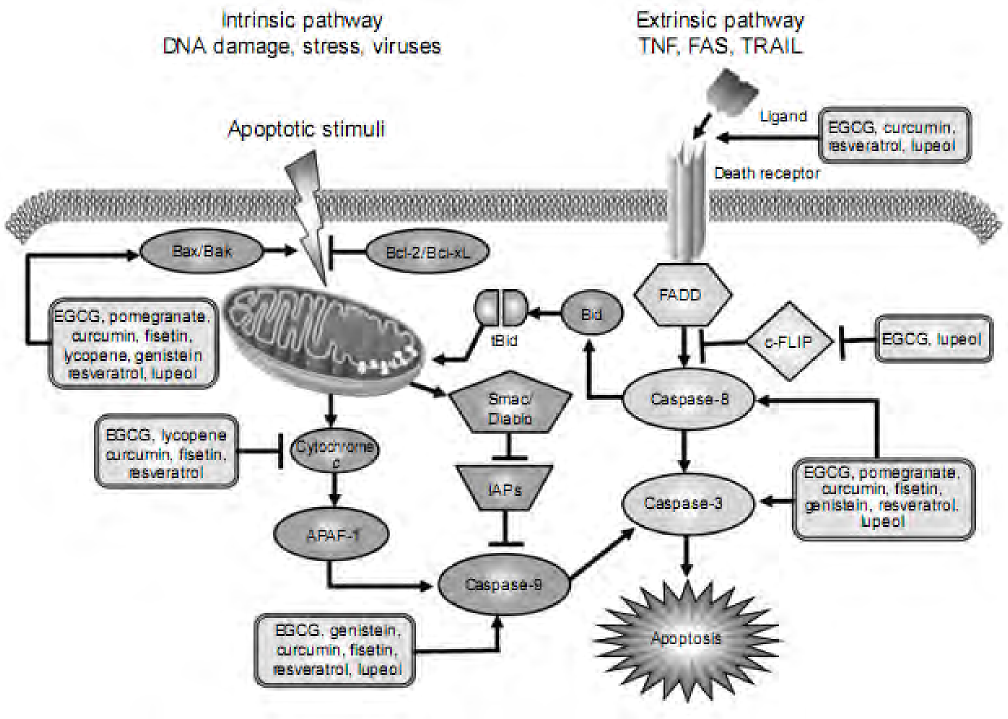
รูปที่ 12 การยับยั้ง JAK-STAT signaling pathway โดย quercetin [53]

- ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยจากการที่สารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเป็น anti-oxidant ที่จะไปลดปริมาณของ RO● ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ carcinogensis [47] จะไปยับยั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ growth factors, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase [54] และกระตุ้นการแสดงออกของ Bax และ Bak ในการกระตุ้น mitochondrial ให้ปล่อย cytochrome c ทำให้เกิดการเกิด caspase-9 และ caspase-3 และลดการแสดงออกของ Bcl-2, Bcl-X_L ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเกิด apoptosis รวมไปถึงยับยั้ง DNA topoisomerase I/II และควบคุม cell cycle ทำให้เกิดการหยุดการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะใดระยะหนึ่งใน cell cycle ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และยังไปยับยั้งกระบวนการในการก่อให้เกิดมะเร็ง [55-57]

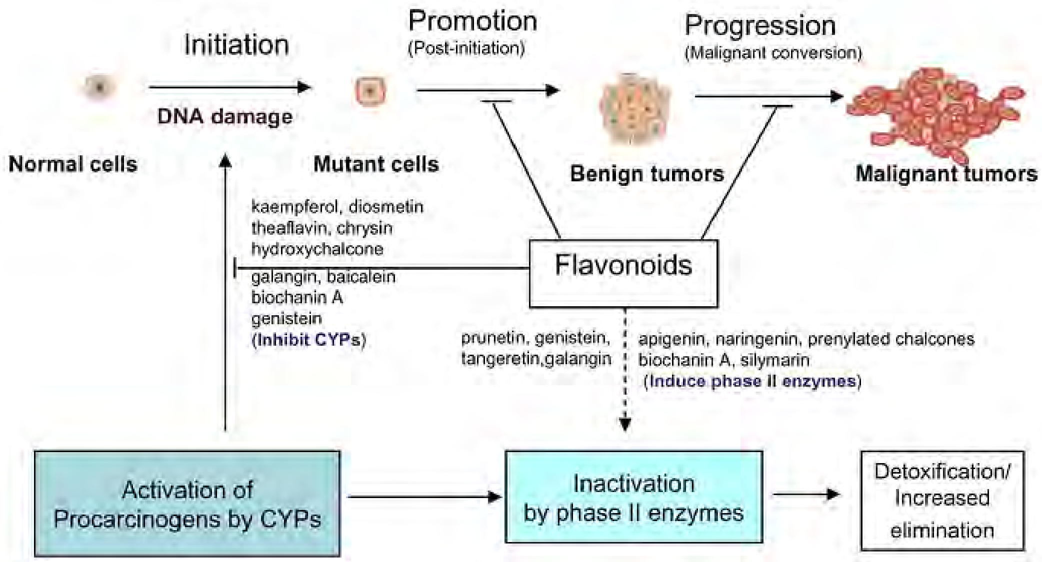


รูปที่ 13 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ของสารฟลาโวนอยด์ [54]

Flavonoids จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ใน signaling parthways ต่าง ๆ ทำให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นลดลง ซึ่งเป็นกลไกอย่างหนึ่งในการควบคุมและรักษาโรคมะเร็ง

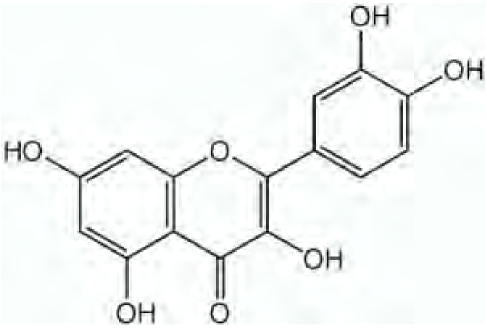


รูปที่ 14 การกระตุ้นการเกิด apoptosis ของสารฟลาโวนอยด์ [58]

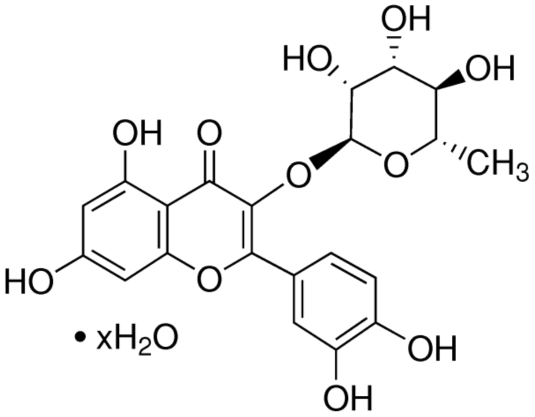


รูปที่ 15 การยับยั้งกระบวนการก่อให้เกิดมะเร็งของสารฟลาโวนอยด์ [57]

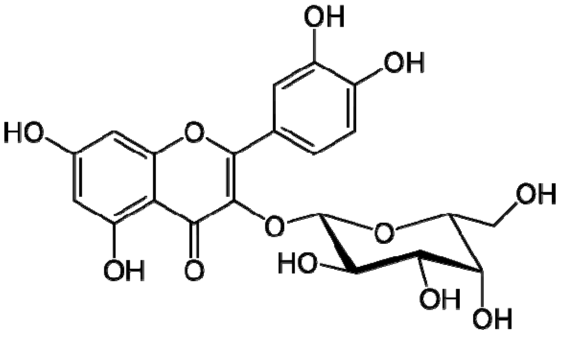
สารฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพลูคาว คือ Quercetin, Quercitrin และ Hyperin [33] โดย Quercetin (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, 3,3′,4′,5,6-Pentahydroxyflavone), quercitrin และ hyperin (hyperoside) เป็นสารฟลาโวนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม flavonols ซึ่ง quercitrin และ hyperin เป็นอนุพันธ์ของ quercetin โดย quercitrin เป็น glycosides form ของ quercetin และน้ำตาล deoxy rhamnose [59] และ hyperin เป็น 3-O-galactoside ของ quercetin



รูปที่ 16 โครงสร้างของสาร Quercetin [60]



รูปที่ 17 โครงสร้างของสาร Quercitrin [59]



รูปที่ 18 โครงสร้างของสาร Hyperin [61]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า quercetin นั้นจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ ยับยั้งอนุมูลอิสระ [62] สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดย การเหนี่ยวนำให้มะเร็งเม็ดเลือดขาวตาย ยับยั้งการทำงานของ DNA topoisomerase I รวมไปถึงการยับยั้งในกระบวนการก่อให้เกิดมะเร็ง และยังไปกระตุ้นให้มีการหลั่งของ cytochrome c ให้เกิดการสร้าง caspase 9 และ caspase 3 และยับยั้งการสร้าง calmodulin [51, 55-57, 63-65], ยับยั้งการอักเสบ โดยการไปลดการกระตุ้น และควบคุมการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte [50, 66], ยับยั้งอาการแพ้โดยการไปยับยั้งสัญญาณของ IL-12 โดยผ่านทาง JAK-STAT signaling pathway [53]

ไซโตไคน์ (Cytokines) [67, 68]

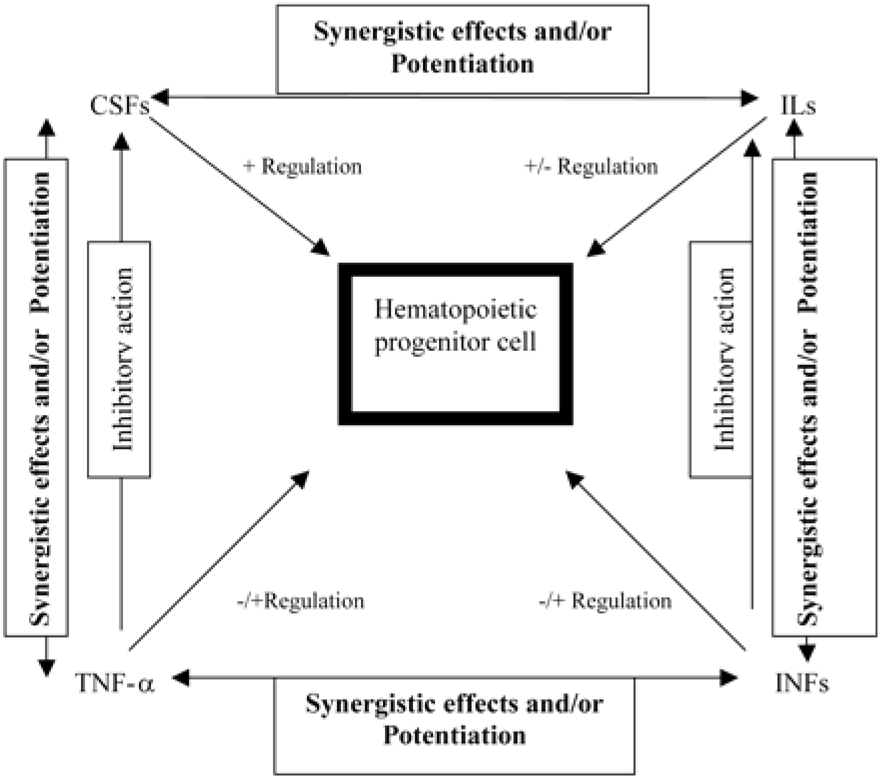
ไซโตไคน์เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีบทบาทในการติดต่อ และปฏิสัมพันธ์กันระหว่างเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วย interleukins (IL), colony stimulating factors (CSF), tumor necrosis factors (TNF) และ interferons (IFN) โดยไซโตไคน์มีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งไซโตไคน์สามารถทำหน้าที่ทั้งในการกระตุ้นและการยับยั้ง โดยแบ่งบทบาทออกได้ดังนี้

- pleiotropy คือ ไซโตไคน์ชนิดเดียวกันที่ออกฤทธิ์ในเซลล์ต่างชนิดกัน ทำให้เซลล์นั้นแสดงออกไม่เหมือนกัน

- redundancy คือ ไซโตไคน์ต่างชนิดกันที่สามารถออกฤทธิ์ให้เซลล์ชนิดหนึ่งแสดงออกเหมือนกัน

- synergy คือ ไซโตไคน์ 2 ชนิดที่เสริมฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือยับยั้งกัน

- antagonism คือ ไซโตไคน์ 2 ชนิด ที่ต้านฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือยับยั้งกัน



รูปที่ 19 การทำงานและการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างไซโตไคน์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดเลือด [67]

โดย CSF และ IL เป็นไซโตไคน์ที่ควบคุมในเชิงบวก โดยยับยั้งการเกิด apoptosis และกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาของเซลล์ ในขณะที่ไซโตไคน์ที่ควบคุมในเชิงลบ คือ TNF และ transforming growth factor β ซึ่งทำหน้าที่ในด้านตรงกันข้ามกับ CSF และ IL

IL-1β [7-9, 69, 70]

IL-1β เป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม IL-1 สร้างจากเซลล์ mononuclear phagocytes, fibroblasts, keratinocytes และ T และ B lymphocytes และจัดอยู่ในกลุ่มของ proinflammatory cytokines ที่มีบทบาทในด้านการก่อให้เกิดการอักเสบ รวมไปถึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดปกติ และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยการกระตุ้นเซลล์ตัวเองและเซลล์รอบข้างให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์

IL-2 [5, 6, 10, 70, 71]

IL-2 เป็นไซโตไคน์ที่มีหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte สร้างจากเซลล์ activated T helper cells เป็นส่วนใหญ่ โดย

การกระตุ้นการแสดงออกของ NF-κB และ IL-2 receptor รวมทั้งยังมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยควบคุมพัฒนาการของ T cell, B ell รวมไปถึง natural killer cell (NK cell) และยังทำหน้าที่เป็น autocrine growth factor อีกด้วย

IL-4 [70, 72, 73]

IL-4 สร้างจาก CD4+ T helper cells, mast cells และ basophils โดยเหนี่ยวนำการ differentiation ของ CD4+ T cells ให้เป็น T helper 2 (T_H2) cells และยับยั้งการพัฒนาของ T_H1 cells และยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของ B cell, T cell และ mast cell รวมไปถึงกระตุ้นการสร้าง collagen และ IL-6 อีกทั้ง IL-4 ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ และมีบทบาทสำคัญในการควบคุม IgE

IL-5 [70, 74-76]

IL-5 สร้างจาก CD4+ T helper cells และ NK cells โดยเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการ differentiation ของ eosinophils ในโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และสามารถเพิ่มการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ B cells รวมไปถึงกระตุ้น cytotoxicity ของ T cell และ IL-5 ยังสามารถกระตุ้นการ differentiation ของ T_H2 cells

IL-6 [7, 70, 77]

IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์หลายชนิดทั้ง mononuclear phagocytes, T cells รวมไปถึง fibroblasts โดยจะถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างจาก IL-1, TNF-α และ platelet derived growth factor (PDGF) มีคุณสมบัติเป็น proinflammatory cytokines และ anti-inflammatory cytokines ด้วยเช่นเดียวกัน ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม และยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด โดยทำงานร่วมกับ CSF และ IL-3 ในการกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือด

IL-7 [70, 78, 79]

IL-7 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจาก bone marrow และ thymic stromal cell โดยกระตุ้นการพัฒนาของ pre-B และ pre-T cells และทำหน้าที่เป็น growth factor สำหรับ B cells, T cells และ thymocytes และควบคุมระบบ homeostasis ของ T cells รวมไปถึงเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ type I

IL-8 [70, 80-82]

IL-8 หรือ CXCL-8 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจาก mononuclear phagocytes, antigen activated T cells, endothelial และ epithelial cells รวมไปถึง neutrophils ทำหน้าที่เป็น chemotactic ในการเคลื่อนที่และกระตุ้น neutrophils โดยทำให้ neutrophils มีการแสดงออกของ cell-surface adhesion molecule เพิ่มมากขึ้น และควบคุมการทำงานของเม็ดเลือดขาวในกระบวนการอักเสบ อีกทั้ง IL-8 ยังมีคุณสมบัติกระตุ้น angiogenic responses ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์ endothelial และเซลล์มะเร็ง และยังเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง

IL-10 [70, 83]

IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้าง IFN-γ ของ activated T cells โดยสามารถสร้างจาก T_H2 cells และยับยั้งการทำงานของ T_H1 cells โดยการยับยั้งการสร้าง T_H1 cytokines และยังสามารถทำหน้าที่เป็น co-differentiation factor สำหรับ cytotoxic T cells และ co-factors ในการเจริญเติบโตของ T cells และ IL-10 สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis โดยการกระตุ้นการทำงานของ phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)

IL-12 [70, 84, 85]

IL-12 หรือ natural killer cell stimulatory factor (NKSF) และ cytotoxic lymphocyte maturation factor (CLMF) ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างและการทำงานของ cytotoxic T cells และ lymphokine-activated killer (LAK) cells และเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนของ activated T cells และ NK cells โดย IL-12 จะมีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบแบบ cell-mediated และทำให้เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันในการต่อต้านมะเร็ง และทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis โดยการกระตุ้นการแสดงออกของ Fas

IL-13 [70, 72, 86]

IL-13 สร้างจาก T_H2 cells ทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory โดยจะไปยับยั้งการสร้างของ inflammatory cytokines เช่น IL-1β, TNF-α, IL-8 และ IL-6 และ IL-13 จะสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการ differentiation ของ monocyte และ B lymphocytes รวมไปถึงร่วมกับ IL-4 ในการกระตุ้นการแสดงออกของ major histocompatability complex (MHC) class II

IL-17 [70, 87]

IL-17 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจาก activated T cells ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้าง IL-6 และ IL-8 และกระตุ้นการแสดงออกของ Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) และยังมีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการอักเสบ

G-CSF [70, 88]

G-CSF หรือ granulocyte-colony stimulating factor จัดเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดเลือด ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการ differentiation ของ hematopoietic progenitor cells โดยสร้างจาก monocytes, T cells, fibroblasts และ endothelials ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 และ TNF โดยสามารถกระตุ้น neutrophils

GM-CSF [70, 89]

GM-CSF หรือ granulocyte/macrophage-colony stimulating factor เป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดเลือด โดยสร้างจาก monocytes, T cells, fibroblasts และ endothelials ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 และ TNF โดยจะไปกระตุ้น neutrophils และการทำงานของ eosinophils และ mononuclear phagocytes และช่วยฟื้นฟูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ innate ในคนไข้ที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันด้วย glucocorticoid

IFN-γ [70, 72, 90]

IFN-γ หรือ interferon-γ เป็นไซโตไคน์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม type II interferon มีคุณสมบัติเป็น anti-viral โดยไปรบกวนการ replication ของ virus ซึ่งสร้างจาก activated T cells และ NK cells ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการแสดงออกของ MHC class I และ II ของ nucleated cells และกระตุ้นการทำงานของ mononuclear phagocytes อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของ IL-13 receptor α2 (IL-13Rα2) บนผิวเซลล์ และการเพิ่มการแสดงออกของ chemokines ทั้ง MCP-1, MIP-1β รวมไปถึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

MCP-1 [70, 91, 92]

MCP-1 หรือ monocyte chemoattractant protein-1 หรือ CCL-2 จัดเป็น chemokines ที่กระตุ้นการเคลื่อนที่และการทำงานของ neutrophils และยังกระตุ้นให้ monocytes เคลื่อนที่ผ่าน

endothelial และ epithelial cells ไปยังบริเวณที่มีการอักเสบ และมีบทบาทสำคัญในการเกิด acute inflammation สร้างจาก monocytes โดยการกระตุ้นของ inflammatory cytokines

MIP-1β [70, 93, 94]

MIP-1β หรือ macrophage inflammatory protein-1β หรือ CCL-4 จัดอยู่ในกลุ่มของ chemotactic cytokines ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่และการทำงานของ neutrophils และยังสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ monocytes และ T lymphocytes อีกทั้งยังกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และกระตุ้นให้ T cells หลั่ง IL-4 และ IL-6 และยังมีการศึกษาพบว่า MIP-1β จะเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ของ pre-B cells

TNF-α [7, 95, 96]

TNF-α เป็นไซโตไคน์อีกตัวหนึ่งในกลุ่ม proinflammatory cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันและก่อให้เกิดการอักเสบ และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้าง CSF และ IL-6 ขึ้น รวมไปถึง TNF-α สามารถกระตุ้นให้เกิดการมีชีวิตรอด และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไซโตไคน์ที่กล่าวมาในกลุ่มข้างต้นนั้น จะมีบทบาททั้งในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดปกติ รวมไปถึงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว [5, 97, 98] และกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งพบว่าสาร propranolol จะยับยั้งการเกิดมะเร็ง โดยจะไปลดปริมาณของ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity ซึ่งจะเกี่ยวข้องในกระบวนการ angiogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญที่จะทำให้มะเร็งมีการเจริญเติบโตและลุกลามต่อไป [99] และสาร Leptomycin B จะไปควบคุมการทำงานของ NF-κB ซึ่งมีบทบาทในการสร้าง cytokines, การเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ โดยจะไปเพิ่มการสะสมของ IκB ที่จะไปจับกับ NF-κB ทำให้ NF-κB ไม่สามารถเข้าไปใน nucleus เพื่อที่จะกระตุ้นการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้อง [100, 101] ทำให้มีการสร้างไซโตไคน์ลดลง ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวลดลง

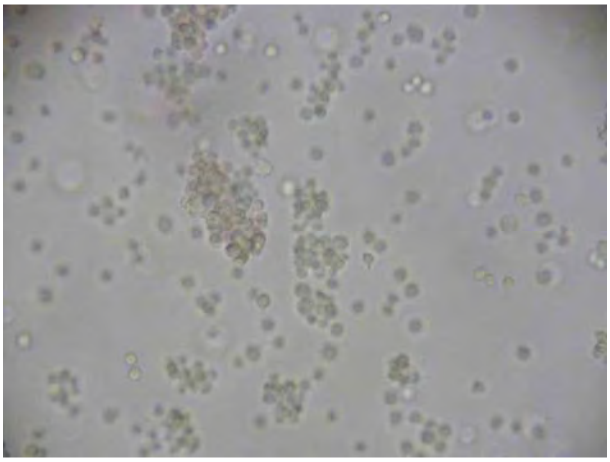
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. ตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบ

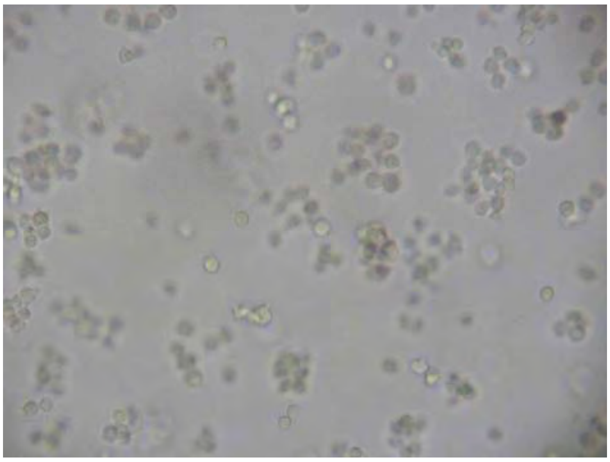
เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ในการทดสอบมี 2 ชนิด คือ

1.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat (human acute T cell leukemia)



รูปที่ 20 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat (100x)

1.2 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937 (human chronic myelogenous leukemia cell)



รูปที่ 21 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937 (100x)

2. ตัวอย่างสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

สมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดสอบ คือ พลูคาว โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพลูคาว จากอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ในเดือนพฤศจิกายน 2553 และนำมาทำการยืนยันชนิดของพลูคาว โดยหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Herbarium number 013435 (BCU))

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20°C freezer	Sanyo, ญี่ปุ่น
-80°C deep freezer	ilshin Lab, เนเธอแลนด์
4°C refrigerator	Mitsubishi, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
24 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Autoclave	Tomy, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 μl	Gilson, ฝรั่งเศส
Autopipette 10-100 μl	Gilson, ฝรั่งเศส
Autopipette 101-1000 μl	Gilson, ฝรั่งเศส
Beaker (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Bio-Plex system	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา

Cell culture flask (25 cm^3)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Kokusan, ญี่ปุ่น
Centrifuge tube (5, 14, 50 ml)	Falcon, สหรัฐอเมริกา
CO_2 incubator	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Cylinder (100, 1000 ml)	Witeg Diffico, เยอรมนี
Differential counter	Modulus, สหรัฐอเมริกา
Disposable Serological pipette (5, 10, 25 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Flask (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Freeze dryer	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Glass bottles (100, 200, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Invented microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow	Faster, อิตาลี
Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen tank	Air Liquide, ฝรั่งเศส
Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้

Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
Microtube 1.5 ml	Hycon, สหรัฐอเมริกา
Multichannel pipette 5-50 μl	Biohit, ฟินแลนด์
pH meter	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Plate shaker	Desaga, เยอรมนี
Rotary evaporator	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Serological pipette (1, 5, 10, 25 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Tip (10, 20, 100, 200, 1000 μl)	Sorenson, สหรัฐอเมริกา
Vacuum pump	GelmanSciences, สหรัฐอเมริกา
Volumetric flask (100, 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	Labnet, สหรัฐอเมริกา
Waterbath	Mgw Lauda, เยอรมนี
UV/VIS spectrophotometer	PG instruments, สหราชอาณาจักร

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Aluminium chloride ($AlCl_3$)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bio-Plex PRO magnetic cytokine (17-Plex Panel)	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	Fisher,สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, เยอรมนี
Ethyl alcohol	Merck, เยอรมนี
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Human IL-2 ELISA kit	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Human IL-6 ELISA kit	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Human TNF-α kit	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Hyperin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
In vitro toxicology assay kit (TOX2)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Leucoagglutinin PHA-L (PHA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
L-glutamine	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Penicillin	E.R. SQUIBB & SONS INC, สหรัฐอเมริกา
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride (KCl)	Merck, เยอรมนี
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, เยอรมนี
Quercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Quercitrin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Roswell Park Memorial Institute medium-1640	
(RPMI-1640)	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride (NaCl)	Merck, เยอรมนี
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, เยอรมนี
Sodium nitrite ($NaNO_2$)	Merck, เยอรมนี
Streptomycin	General Drugs House, ไทย
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, เยอรมนี
Tetramethylbenzidine	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Trizma base	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Trypan blue	The British Drug Houses, อังกฤษ
Tween20	S.E.supply, ไทย
Vincristine	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

วิธีการวิจัย

1. การสกัดพลูคาว

นำพลูคาวสดทั้งหมด แต่ไม่รวมรากมาทำการล้างให้สะอาด และผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนพลูคาวแห้ง จะได้ลักษณะดังรูปที่ 22 และนำมาบดให้ละเอียด เพื่อที่จะนำมาทำการสกัดต่อไป

รูปที่ 22 ลักษณะของพลูคาวที่ผ่านการอบแห้ง

การสกัดพลูคาวเพื่อนำมาใช้ในการวิจัย จะทำการสกัด 2 แบบ คือ การสกัดด้วยน้ำ และการสกัดด้วยแอลกอฮอล์

1.1 การสกัดพลูคาวด้วยน้ำ (water extract) โดยทำการสกัดและดัดแปลงวิธีการบางส่วนจาก Han และคณะ [102] โดยมีวิธีการสกัดดังนี้

นำพลูคาวแห้งจำนวน 50 กรัม มาทำการแช่ลงในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จำนวน 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 5 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้สารสกัดที่มีลักษณะดังรูปที่ 23 และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมที่จะทำการระเหิดให้แห้ง (lyophilization) ต่อไป

รูปที่ 23 ลักษณะของสารสกัดพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ

1.2 การสกัดพลูคาวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% (ethanolic extract) โดยทำการสกัดและดัดแปลงวิธีการบางส่วนจาก Ampasavate และคณะ [103] โดยมีวิธีการสกัดดังนี้

นำพลูคาวแห้งจำนวน 50 กรัม มาทำการแช่ลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้สารสกัดที่มีลักษณะดังรูปที่ 24 จากนั้นนำไปทำการ evaporation ด้วยเครื่อง rotary evaporator ซึ่งเป็นเครื่องเตรียมสารให้เข้มข้น โดยใช้การกลั่นสารละลายที่อุณหภูมิต่ำและความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อทำการแยกเอาแอลกอฮอล์ออกจากสารสกัด แล้วจึงนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมที่จะทำการระเหิดให้แห้งต่อไป

รูปที่ 24 ลักษณะของสารสกัดพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์

1.3 การระเหิดสารสกัดพลูคาว ด้วยวิธี lyophilization โดยนำสารสกัดพลูคาวที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเข้าเครื่อง Freeze dryer ซึ่งเป็นเครื่องเตรียมสารให้แห้ง โดยไม่ทำให้สารเสียคุณสมบัติ ที่อาศัยหลักการเปลี่ยนสถานะของตัวอย่างจากของแข็งให้เกิดการระเหิดกลายเป็นไอ โดยทำการระเหิดจนกว่าสารสกัดจะแห้ง แล้วทำการเก็บสารสกัดแห้งที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4 การหาปริมาณ percent yield (%yield) ของสารสกัดจากพลูคาว โดยทำการชั่งสารสกัดแห้งที่ได้หลังจากการทำการระเหิด และนำมาคำนวณหา % yield จากสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดแห้ง}}{\text{น้ำหนักของพลูคาวแห้ง}} \times 100$$

2. การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์

การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว จะทำการตรวจวัดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay

การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์จะทำตามวิธีของ Kim และคณะ [104, 105] โดย aluminium chloride จะทำปฏิกิริยากับ C-4 keto group และ C-3 หรือ C-5 hydroxyl group ของฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavones และ flavonols เกิดเป็นสารประกอบ complex ที่ทนต่อกรดที่มีสีเขียว และ aluminium chloride จะทำปฏิกิริยากับ ortho-dihydroxyl group ในวงแหวน A- หรือ B- ของฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสารประกอบ complex ที่ไม่ทนต่อกรด ที่มีสีเขียว ที่จะแปรผันตามปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัด โดยการตรวจวิธีนี้ใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน ค่าปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะรายงานในหน่วย µg เมื่อเทียบกับ quercetin ต่อน้ำหนักของสารสกัดพลูคาวแห้ง (µg QE/mg dried H.*cordata* extract) และหน่วย mg เมื่อเทียบกับ quercetin ต่อน้ำหนักของพลูคาวแห้ง (mg QE/g dried H.*cordata*)

2.1.1 ทำการเตรียมสารละลายก่อนการทดลอง ดังนี้

- สารละลาย sodium nitrite ($NaNO_2$) 5% w/v
- สารละลาย aluminium chloride ($AlCl_3$) 10% w/v
- สารละลาย sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 1 M

- สารมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 และ 7.8125 μg/ml

2.1.2 ผสมสารสกัดพลูคาวที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 0.2 มิลลิลิตร กับน้ำ distilled deionized water จำนวน 0.8 มิลลิลิตร และเติม $NaNO_2$ 5% w/v จำนวน 0.06 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา ทำการเติม $AlCl_3$ 10%w/v จำนวน 0.06 มิลลิลิตร ในนาทีที่ 6 ทำการเติม NaOH 1M ลงไปจำนวน 0.4 มิลลิลิตร และน้ำ distilled deionized water จำนวน 0.48 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาค่าปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ โดยทำการเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน quercetin

ตารางที่ 8 ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric assay

Reagents	Blank (ml)	Standard (ml)	Sample (ml)
1. สารสกัดพลูคาว	-	-	0.2
2. สารมาตรฐาน quercetin	-	0.2	-
3. Distilled deionized water	1	0.8	0.8
4. $NaNO_2$ 5% w/v	0.06	0.06	0.06
ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที			
5. $AlCl_3$ 10%w/v	0.06	0.06	0.06
ผสมและตั้งทิ้งไว้ 1 นาที			
6. NaOH 1M	0.4	0.4	0.4
7. Distilled deionized water	0.48	0.48	0.48
ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน และสารกัดพลูคาว เปรียบเทียบกับ blank			

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

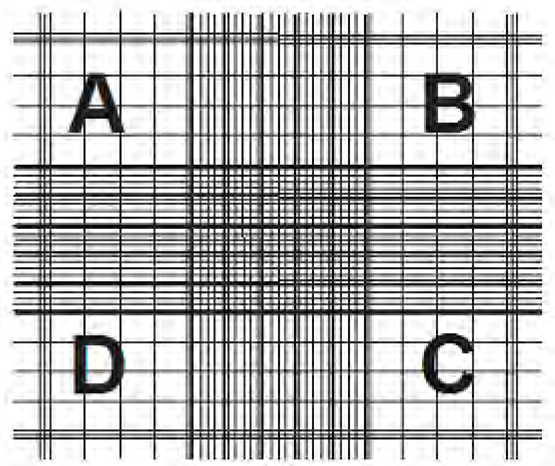
เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat และ U937 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 โดยทำการเติม Fetal bovine serum (FBS) 10%, L-glutamine 1% และ Penicillin-Streptomycin 1% (penicillin 100 units/ml และ streptomycin 100 μg/ml) และเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.2 การเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงมาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 วันก่อนนำมาทำการทดสอบ จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง 1 วัน มาทำการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ hemocytometer ในการนับ โดยจะทำการนับเซลล์ในช่อง A, B, C และ D ดังรูปที่ 25 แล้วทำการคำนวณเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร และทำการดูเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วย trypan blue ซึ่งจะต้องได้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดมากกว่า 90 % จึงจะสามารถนำมาใช้ทำการทดสอบได้ โดยเซลล์ที่มีชีวิตรอดจะไม่ติดสี trypan blue ในขณะที่เซลล์ตายจะติดสี trypan blue และสามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดได้จากสูตร

$$\%\ \text{cell viability} = \frac{\text{viable cells}}{\text{total cells}} \times 100$$

เมื่อได้ปริมาณเซลล์ที่มีทั้งหมด แล้วนำมาทำให้เซลล์มีปริมาณ 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร



รูปที่ 25 ลักษณะตารางของ hemocytometer [106]

4. การเตรียมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์

นำสารสกัดพลูคาวแห้งจำนวน 5 มิลลิกรัม ละลายใน RPMI-1640 จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5 mg/ml เพื่อที่จะทำการเจือจางในอัตราส่วน 1 : 2 ด้วย RPMI-1640 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5000, 2500, 1250, 625,312.5,156.25 และ 78.125 μg/ml ตามลำดับ

นำสารฟลาโวนอยด์จำนวน 1 มิลลิกรัม ละลายใน RPMI-1640 จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml เพื่อที่จะทำการเจือจางในอัตราส่วน 1 : 2 ด้วย RPMI-1640 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 μg/ml ตามลำดับ

5. การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ จะทำการทดสอบ 2 วิธีคือ วิธี XTT assay และวิธี microscopic analysis

5.1 ทำการเตรียมสารละลายก่อนการทดลอง ดังนี้

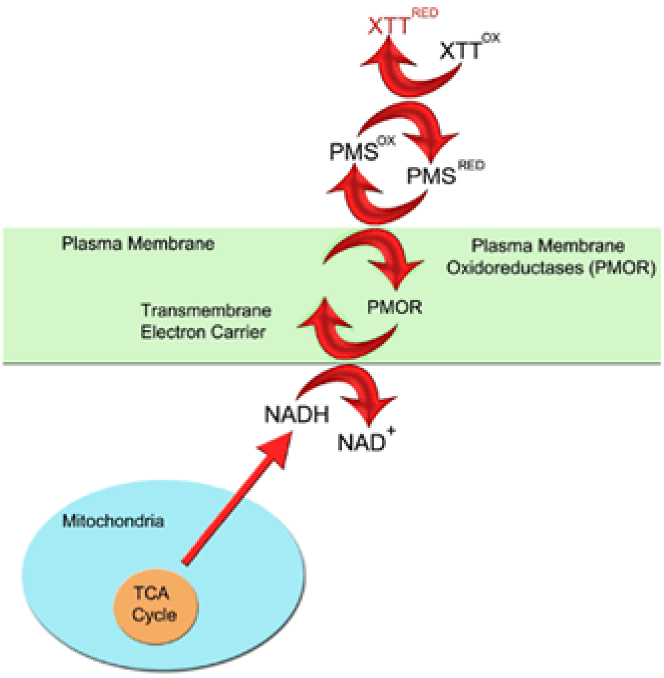
- สาร XTT ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่มี phenazinemethosulfate (PMS) 1%

5.2 การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยวิธี XTT assay

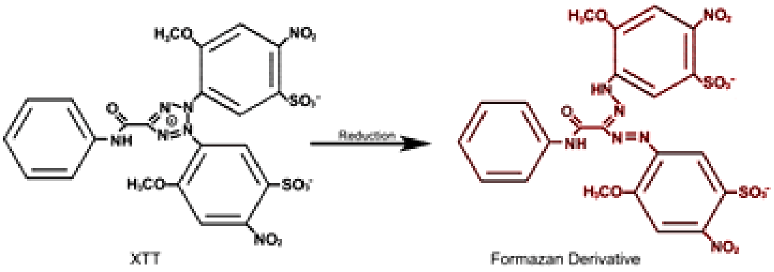
การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี XTT assay จะทำการทดสอบและดัดแปลงวิธีของ Chiang และคณะ [107] เป็นการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงเกิดการตาย ด้วยวิธี XTT assay ซึ่งอาศัยหลักการของเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ภายในเซลล์ที่มีชีวิต จะทำการรีดิวซ์สาร XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) ที่มีสีเหลือง โดยเปลี่ยน tetrazolium salt ของ XTT ให้เป็น formazan ที่มีสีส้ม ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 well plate) โดยใส่เซลล์ที่มีปริมาณเซลล์ 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 90 µl และเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 10 µl โดยใช้ RPMI-1640 เป็น negative control และ vincristine เป็น positive control จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา 2 วัน นำมาเติม XTT working solution ลงไปหลุมละ 20 µl และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 690 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA plater reader นำมาคำนวณหาค่า %cell viability จากสูตร และหาค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) จากกราฟ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

$$\%\text{cell viability} = \frac{\text{mean absorbance test}}{\text{mean absorbance control}} \times 100$$



รูปที่ 26 การ reduction XTT ด้วยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase [108]



รูปที่ 27 การรีดิวซ์สาร XTT ให้กลายเป็น formazan [108]

5.3 การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยวิธี microscopic analysis

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี microscopic analysis เป็นการทดสอบทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยดูจากปริมาณเซลล์ และลักษณะที่สามารถมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง โดยมีวิธีทำการทดสอบดังนี้

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 well plate) โดยใส่เซลล์ที่มีปริมาณเซลล์ 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 90 μl และเติมสารสกัดพลูคาวและสาร

ฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 10 μl โดยใช้ RPMI-1640 เป็น negative control และ vincristine เป็น positive control จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา 2 วัน นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะความแตกต่างที่เกิดขึ้นของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับ negative และ positive control

6. การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงหลั่งออกมา โดยทำการทดสอบ 2 วิธี คือ วิธี ELISA และวิธี bead-based multiplex sandwich immunoassays (Bio-Plex)

6.1 การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA เป็นการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์โดยอาศัยหลักการของ antigen-antibody โดย coat บริเวณก้นหลุมของ plate ด้วย capture antibody และจึงเติมสิ่งส่งตรวจ เพื่อให้ antibody จับกับ antigen ซึ่งก็คือ ไซโตไคน์ที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจ แล้วจึงทำการเติม antibody อีกตัวหนึ่ง ซึ่งก็คือ detection antibody ที่มีการติดฉลากด้วย biotin เพื่อให้จับกับไซโตไคน์ที่เราต้องการวัดปริมาณ แล้วจึงเติม streptavidin ที่ conjugated กับ horseradish peroxidase (HRP) เพื่อให้ streptavidin จับกับ biotin และจึงเติม substrate เพื่อให้ horseradish peroxidase ทำปฏิกิริยาและเกิดสีขึ้น และจึงนำไปวัดด้วยเครื่อง ELISA plate reader เพื่อหาปริมาณของไซโตไคน์ โดยทำการตรวจวัดไซโตไคน์ IL-2, IL-6 และ TNF-α

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม (6 well plate) โดยใส่เซลล์ที่มีปริมาณเซลล์ 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร/หลุม และทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ โดยการเติมสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 350 μg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาว (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) และ 50 μg/ml สำหรับสารฟลาโวนอยด์ (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมากระตุ้นด้วย PMA 12.5 ng/ml และ PHA 250

ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat และกระตุ้นด้วย LPS 1 μg/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937 เมื่อครบกำหนดเวลานำมาเก็บน้ำใส (supernatant) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หากยังไม่นำไปทำการทดสอบให้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ

และในการทำการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA จะทำการ coat จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมด้วย capture antibody เป็นเวลา 1 คืน เมื่อครบเวลา นำมาทำการล้างจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ด้วย wash buffer 3 ครั้ง และนำเอา supernatant มาทำการเติมลงในหลุมที่ทำการ coat ด้วย capture antibody ไว้แล้ว หลุมละ 100 μl นำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วจึงเติม detection antibody ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 100 μl นำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วจึงเติม streptavidin-HRP ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 100 μl นำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง และเติม substrate ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 100 μl นำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลา เติม stop solution (2N H_2SO_4) ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 50 μl และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA plate reader นำมาอ่านค่าปริมาณของไซโตไคน์จากกราฟมาตรฐาน

6.2 การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ โดยใช้หลักการ bead-based multiplex sandwich immunoassay ที่สามารถตรวจวัดไซโตไคน์หลายชนิดได้ในครั้งเดียว โดย capture antibody จะทำการ coat ติดกับ bead ที่มีสีแดงของสี fluorescence และสีของ infrared อยู่ ซึ่งจะมีอัตราส่วนของสีทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของไซโตไคน์ โดย bead ที่มี capture antibody จะจับกับไซโตไคน์ในสิ่งส่งตรวจที่จำเพาะกันใน plate และใช้ detection antibody ที่ conjugated กับ biotin มาจับกับไซโตไคน์อีกครั้งหนึ่ง และใช้streptavidin ที่มีการ conjugated กับ phycoerythrin (PE) จับกับ biotin และทำการวัดปริมาณของไซโตไคน์ โดยใช้เครื่อง Bio-Plex เพื่อทำการวัดสีแดงและสี infrared เพื่อแยกชนิดของไซโตไคน์ และวัดสีเขียวของ PE เพื่อวัดปริมาณของไซโตไคน์ และในการวิจัยครั้งนี้จะทำการวัด

ระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex จำนวน 17 ไซโตไคน์ คือ IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β และ TNF-α เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์

ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ โดยทำการเติมสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 350 μg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาว (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) และ 50 μg/ml สำหรับสารฟลาโวนอยด์ (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) โดยการนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาทำการกระตุ้นด้วย PMA 12.5 ng/ml และ PHA 250 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat และกระตุ้นด้วย LPS 1 μg/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937 เมื่อครบกำหนดเวลานำมาเก็บน้ำใส (supernatant) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หากยังไม่นำไปทำการทดสอบให้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ

และในการทำการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex จะทำการ prewet filter plate เพื่อให้บริเวณ filter ที่ก้นหลุมเปียก ด้วย assay buffer ปริมาณ 100 μl แล้วจึงทำการ filter เอา assay buffer ออกจาก plate จากนั้นเติมเม็ด bead ที่ coat ด้วย antibody ต่อ cytokines ลงไปปริมาณ 50 μl และนำไป incubate และ shake เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาทำการ filter wash ด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μl จำนวน 3 ครั้ง และทำการเติม standard หรือสิ่งส่งตรวจลงไปในหลุม ๆ ละ 50 μl แล้วจึงทำการ seal plate แล้ว incubate และ shake ที่ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที และที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและห้ามโดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการ filter wash ด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μl จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติม detection antibody ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 25 μl และทำการ seal plate แล้ว incubate และ shake ที่ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที และที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และห้ามโดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการ filter wash ด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μl จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม streptavidin-PE ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 50 μl และทำการ seal plate แล้ว incubate และ shake ที่ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที และที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และห้ามโดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลา

ทำการ filter wash ด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μl จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม assay buffer ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 125 μl แล้วทำการ seal plate แล้ว incubate และ shake ที่ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที นำแผ่น seal ออก และนำไปวัดด้วยเครื่อง Bio-Plex ในทันที

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การทดสอบปริมาณของสารสกัดพลูคาวแห้ง และปริมาณสารฟลาโวนอยด์จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM) และทำการทดสอบทางสถิติโดยคำนวณหาความแตกต่างกันของการสกัดพลูคาวทั้ง 2 วิธีด้วยสถิติ independent student's *t*-test

2. การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยวิธี XTT assay จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM)

3. การตรวจวัดระดับไซโตไคน์ที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงหลั่งออกมา ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM) และทำการทดสอบทางสถิติ โดยคำนวณหาความแตกต่างกันระหว่างค่าระดับไซโตไคน์ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับค่าระดับไซโตไคน์ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นและได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ ด้วยสถิติ one-way ANOVA

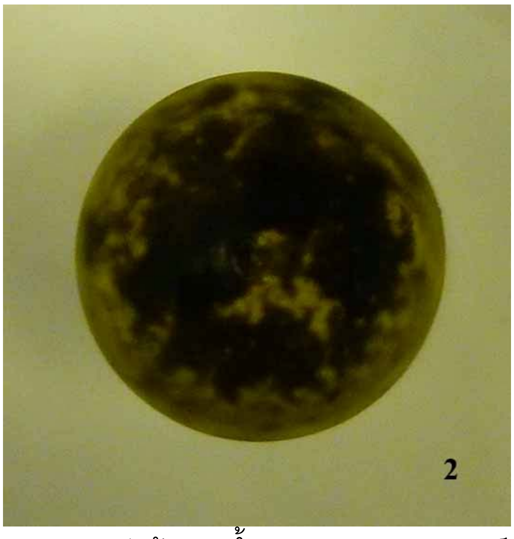
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. ผลการสกัดสารจากพลูคาว

ลักษณะของสารสกัดพลูคาวที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ จะได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงสีเขียวอ่อน ในขณะที่สารสกัดพลูคาวที่ทำการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ จะมีลักษณะเป็นผงสีเขียวเข้ม ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 ลักษณะของสารสกัดแห้งจากพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วย 1.น้ำ, 2. 95% แอลกอฮอล์

ปริมาณสารสกัดพลูคาวแห้งที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ และแอลกอฮอล์จะมีค่าเท่ากับ 7.05 และ 7.14 กรัมตามลำดับ และเมื่อคำนวณหาปริมาณ % yield ก็จะได้ค่าเท่ากับ 14.10% สำหรับการสกัดด้วยน้ำ และ 14.28% สำหรับการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์

ตารางที่ 9 ปริมาณของสารสกัดจากพลูคาว

วิธีสกัด	น้ำหนักของสารสกัดแห้ง (กรัม)	% yield
สกัดด้วยน้ำ	7.05	14.10
สกัดด้วย95% แอลกอฮอล์	7.14	14.28

2. ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพลูคาวทั้ง 2 วิธี พบว่า สารสกัดพลูคาวที่ทำการสกัดด้วยน้ำ จะมีค่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 927.58±34.66 μg QE/g dried H.*cordata* extract หรือเท่ากับ 130.79±4.89 mg QE/g dried H.*cordata* และปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพลูคาวที่ทำการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์เท่ากับ 1574.90±19.56 μg QE/g dried H.*cordata* extract หรือเท่ากับ 224.90±2.80 mg QE/g dried H.*cordata*

ตารางที่ 10 ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว

วิธีการสกัด	**สารฟลาโวนอยด์ต่อสารสกัด** (μg QE/g dried *H.cordata* extract)			**สารฟลาโวนอยด์ต่อพลูคาว** (mg QE/g dried *H.cordata*)		
	1	2	**เฉลี่ย**	1	2	**เฉลี่ย**
น้ำ	892.92	962.24	927.58±34.66	125.90	135.68	130.79±4.89
95%แอลกอฮอล์	1594.46	1555.34	1574.90±19.56	227.69	222.10	224.90±2.80

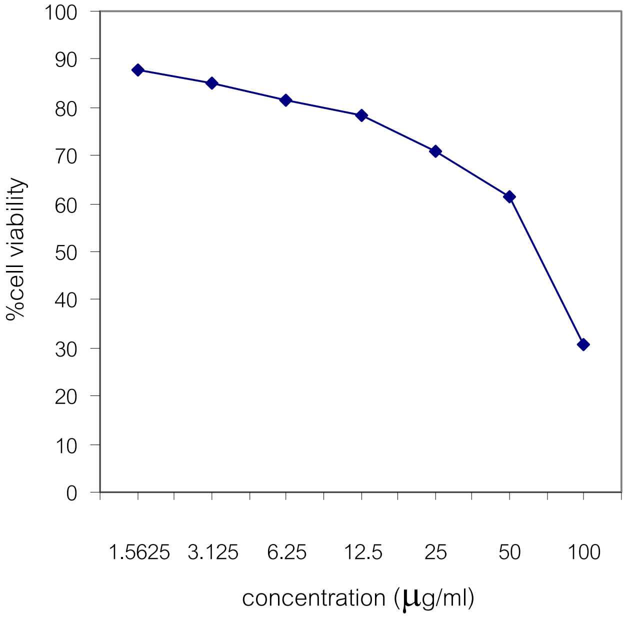
3. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์

เมื่อทดสอบเซลล์ Jurkat และ U937 ด้วยสาร vincristine, สารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิด คือ quercetin, quercitrin และ hyperin เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี XTT assay

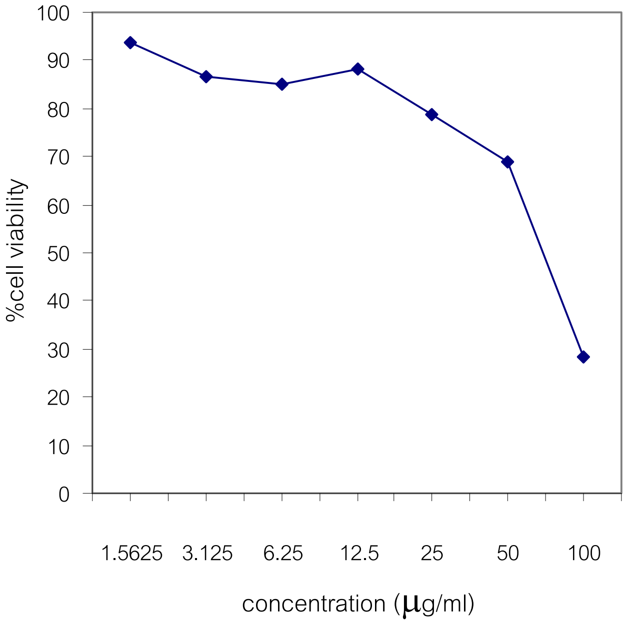
เมื่อครบกำหนดเวลา และนำเซลล์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี XTT assay ได้ค่าต่าง ๆ ที่สร้างกราฟเพื่อที่จะหาค่า IC_{50} โดยกราฟที่ได้มีลักษณะดังรูปที่ 29 และ 30

ก.



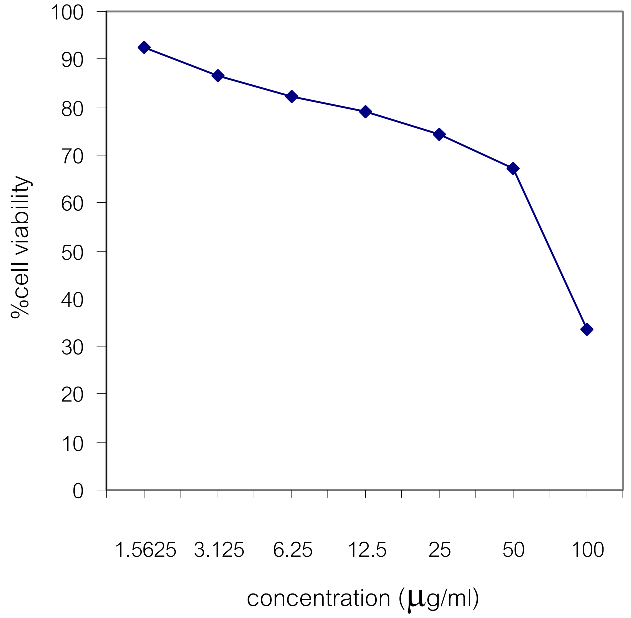
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%cell viability
1.5625 3.125 6.25 12.5 25 50 100
concentration (μg/ml)

ข.

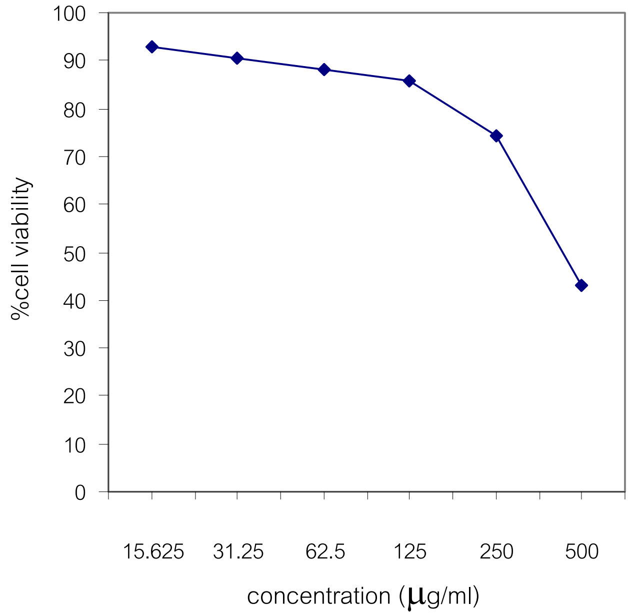


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%cell viability
1.5625 3.125 6.25 12.5 25 50 100
concentration (μg/ml)

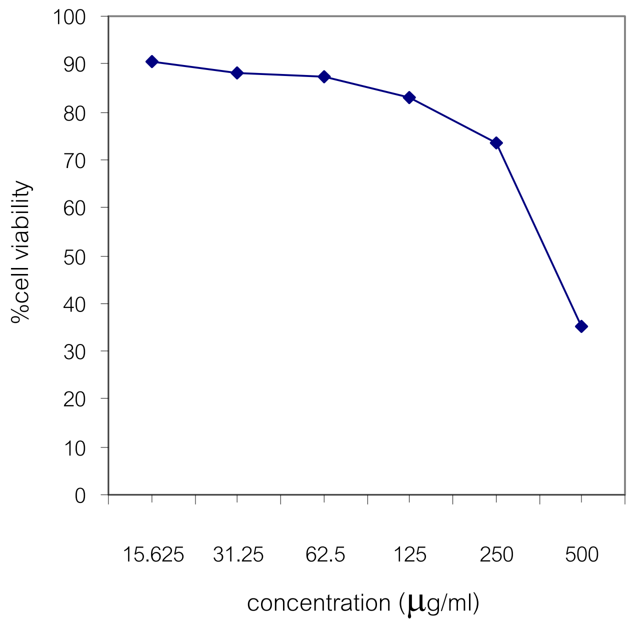
ค.


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%cell viability
1.5625
3.125
6.25
12.5
25
50
100
concentration (μg/ml)

ง.

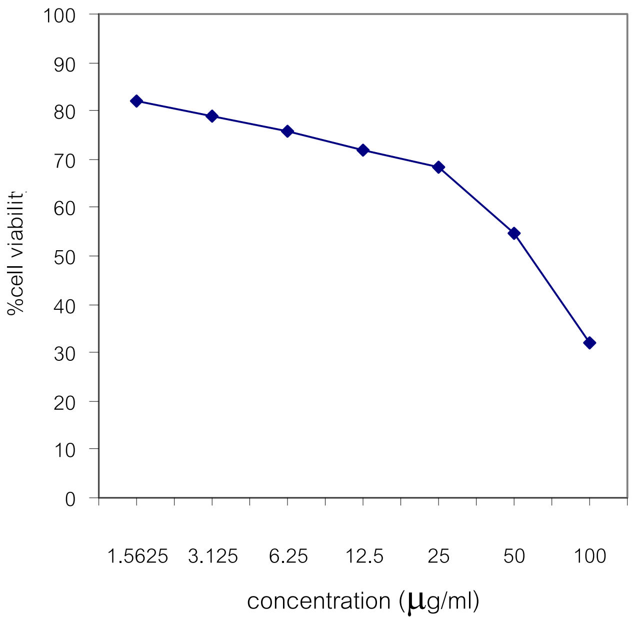

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%cell viability
15.625
31.25
62.5
125
250
500
concentration (μg/ml)

จ.

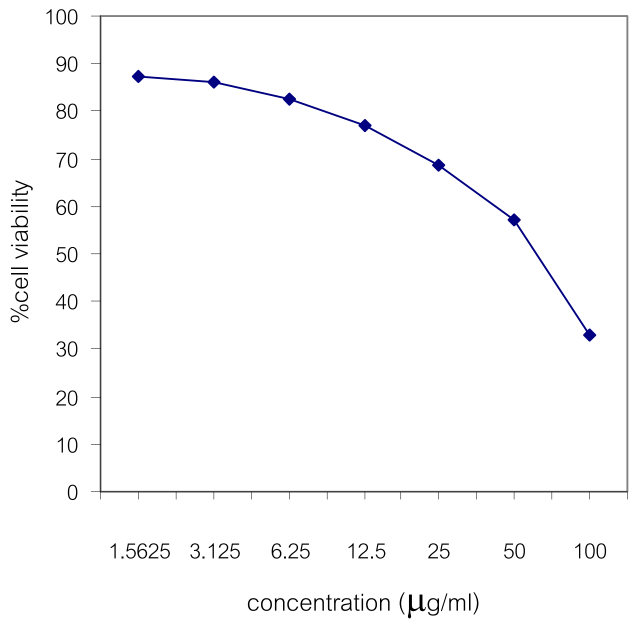


รูปที่ 29 กราฟระหว่างสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์กับ % cell viability ของ Jurkat. เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Jurkat. ก. quercetin ข. quercitrin ค. hyperin ง. สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ จ. สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

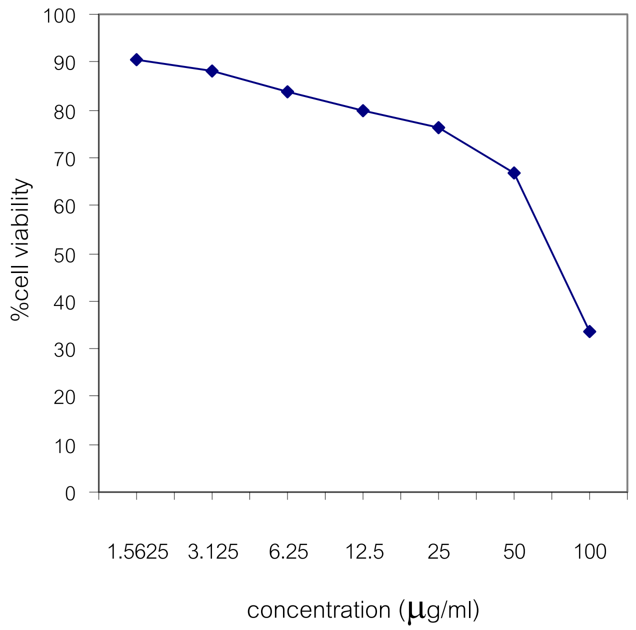
ก.



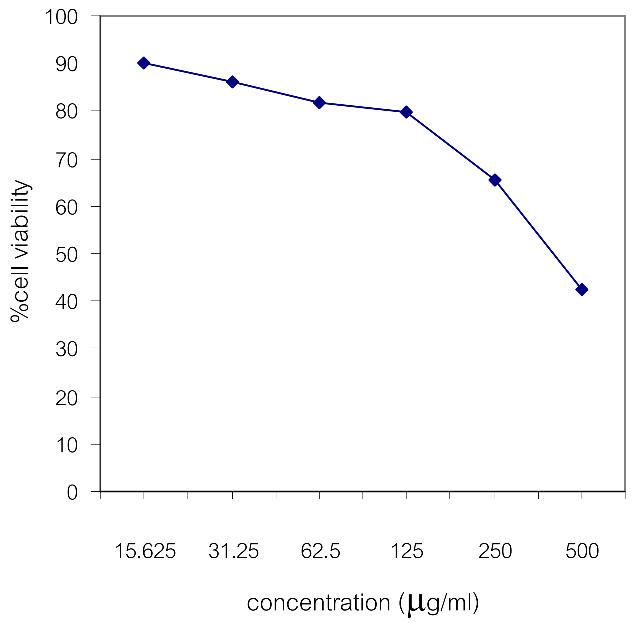
ข.


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%cell viability
1.5625
3.125
6.25
12.5
25
50
100
concentration (μg/ml)

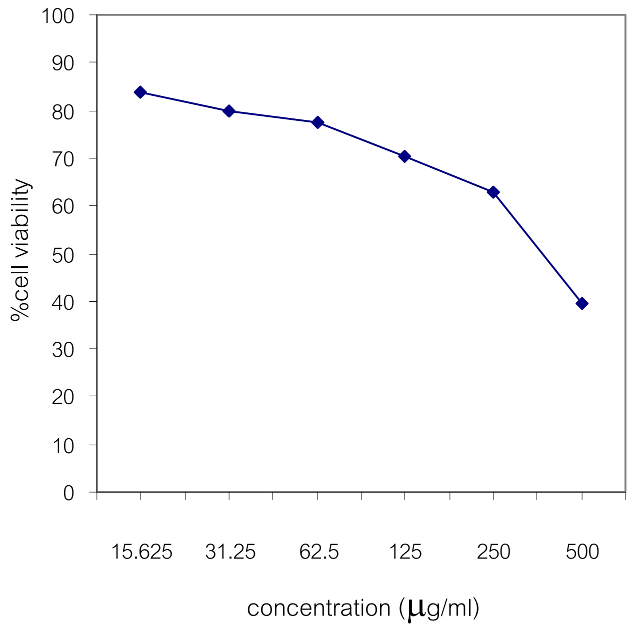
ค.


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%cell viability
1.5625
3.125
6.25
12.5
25
50
100
concentration (μg/ml)

ง.



จ.



รูปที่ 30 กราฟระหว่างสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์กับ %cell viability ของ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ U937. ก. quercetin ข. quercitrin ค. hyperin ง. สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ จ. สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

เมื่อได้กราฟจะทำการอ่านค่าจากกราฟ โดยจะอ่านจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cell viability) ก็จะได้ค่าของ IC_{50} ของสาร ดังตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11 ค่า IC_{50} ของสารฟลาโวนอยด์และสารสกัดพลูคาวในเซลล์ Jurkat

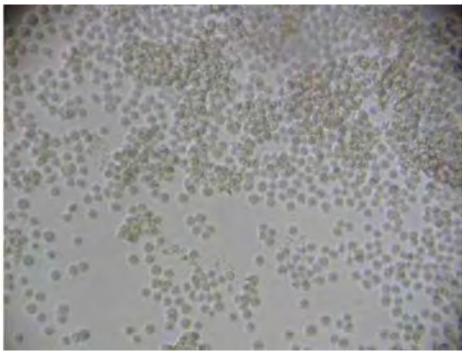
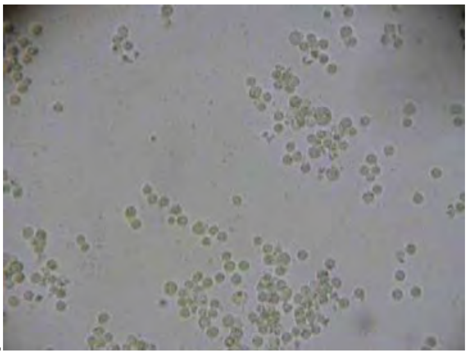
	ค่า IC_{50} (μg/ml)			
	1	2	3	เฉลี่ย
Quercetin	63.2	69.3	73.0	68.50±2.86
Quercitrin	69.4	78.1	71.8	73.10±2.59
Hyperin	79.1	71.4	76.3	75.60±2.25
สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ	449.1	453.8	432.4	445.10±6.49
สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์	413.4	395.2	401.3	403.30±5.35

ตารางที่ 12 ค่า IC_{50} ของสารฟลาโวนอยด์และสารสกัดพลูคาวในเซลล์ U937

	ค่า IC_{50} (μg/ml)			
	1	2	3	เฉลี่ย
Quercetin	54.7	64.3	62.5	60.50±2.95
Quercitrin	66.7	76.1	67.5	70.10±3.01
Hyperin	77.3	71.6	76.4	75.10±1.77
สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ	425.7	403.2	420.3	416.40±6.78
สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์	393.4	375.9	389.3	386.20±5.28

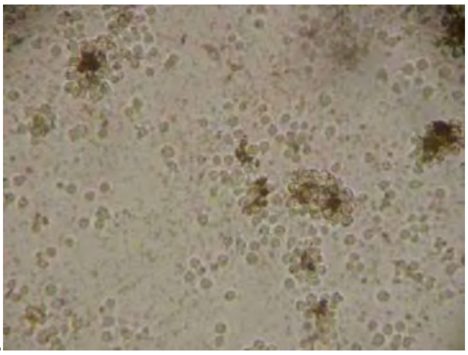
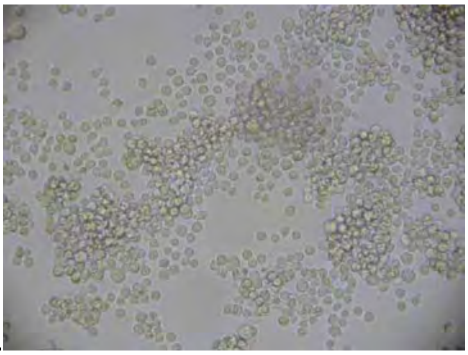
3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี microscopic analysis

เมื่อทำการตรวจดูเซลล์ด้วยวิธี microscopic analysis พบว่า เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (negative) จะมีปริมาณของเซลล์เป็นจำนวนมาก ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับสาร vincristine (positive) จะมีปริมาณของเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เซลล์เมื่อได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง จะมีการลดลงของจำนวนเซลล์มากกว่าเซลล์ที่ได้รับสารในปริมาณที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ อย่างเห็นได้ชัด ดังรูปที่ 31-42

ก.  ข. 

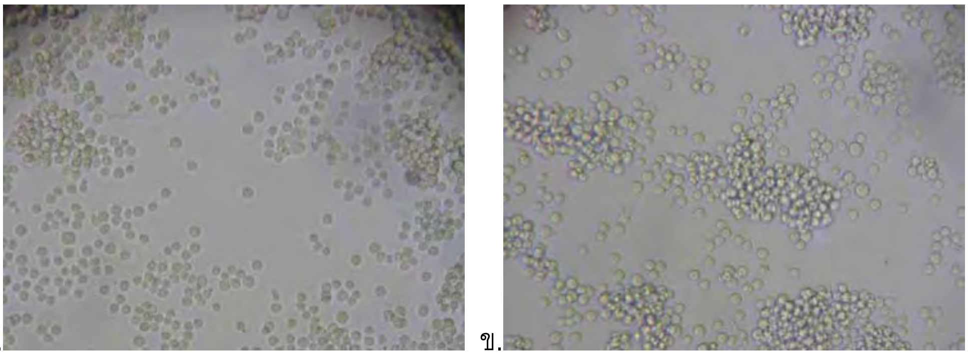
รูปที่ 31 ลักษณะของเซลล์ Jurkat

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) ข. รับสาร vincristine (positive control)

ก.  ข. 

รูปที่ 32 ลักษณะของเซลล์ Jurkat

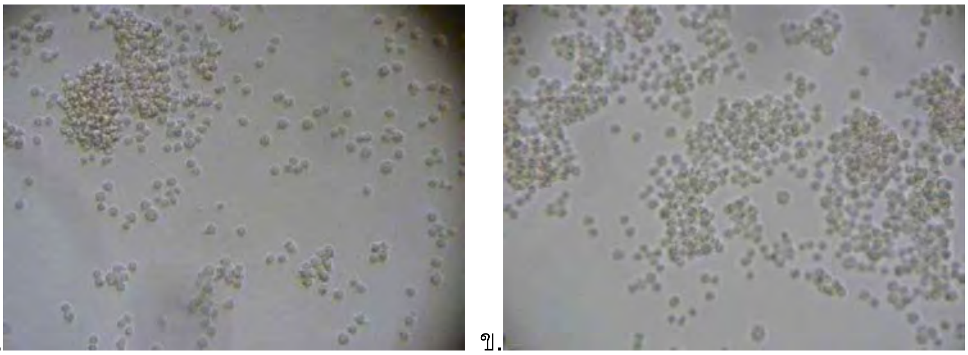
ก. รับสาร quercetin 100 μg/ml ข. รับสาร quercetin 10 μg/ml



ก. ข.

รูปที่ 33 ลักษณะของเซลล์ Jurkat

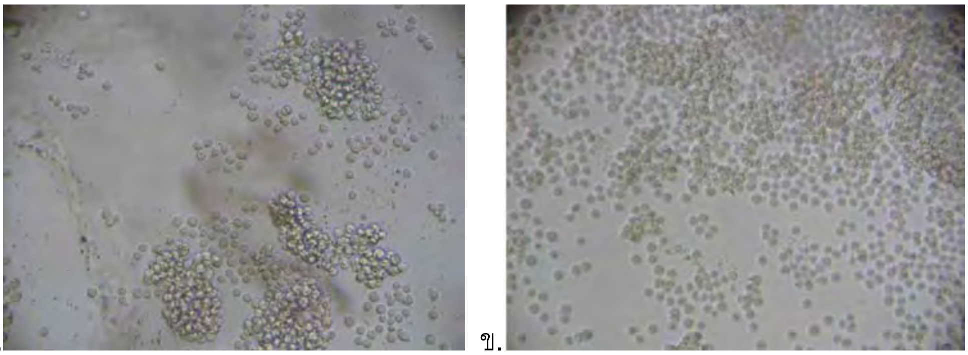
ก. รับสาร quercitrin 100 μg/ml ข. รับสาร quercitrin 10 μg/ml



ก. ข.

รูปที่ 34 ลักษณะของเซลล์ Jurkat

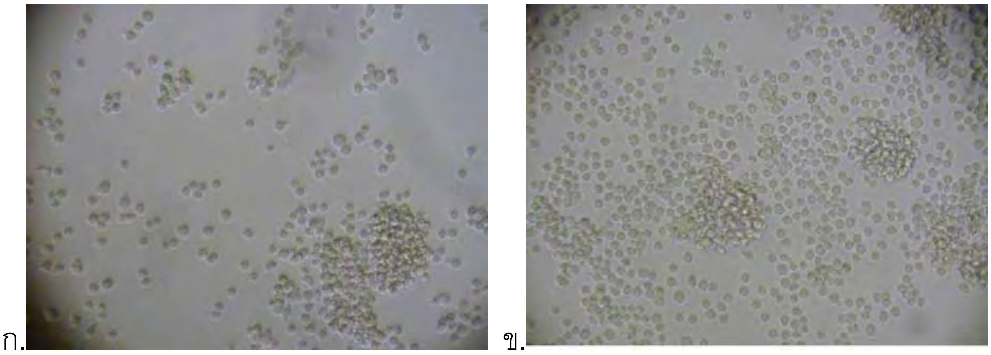
ก. รับสาร hyperin 100 μg/ml ข. รับสาร hyperin 10 μg/ml



ก. ข.

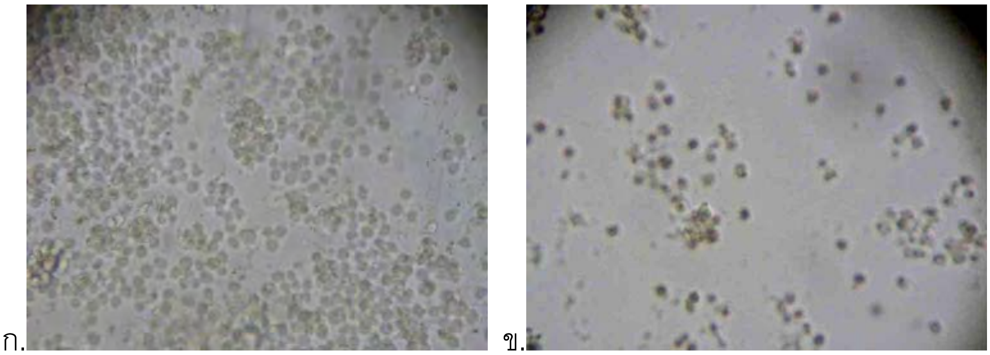
รูปที่ 35 ลักษณะของเซลล์ Jurkat

ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 100 μg/ml



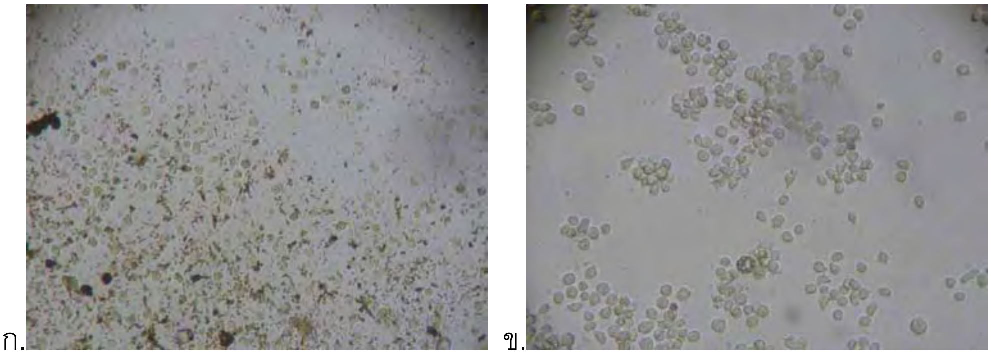
รูปที่ 36 ลักษณะของเซลล์ Jurkat

ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 100 μg/ml



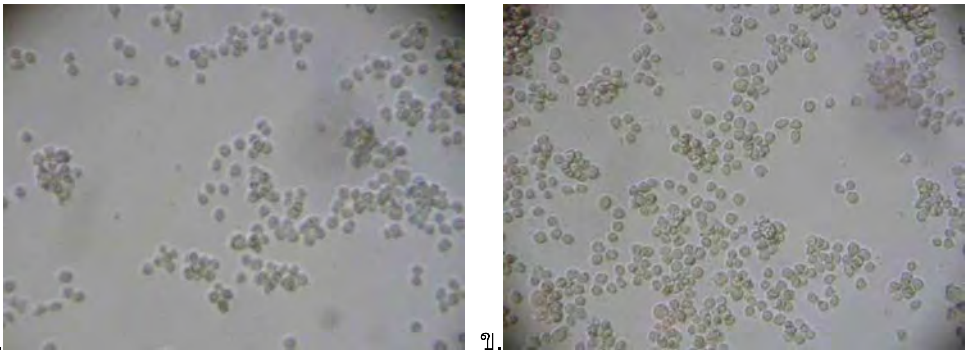
รูปที่ 37 ลักษณะของเซลล์ U937

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) ข. รับสาร vincristine (positive control)



รูปที่ 38 ลักษณะของเซลล์ U937

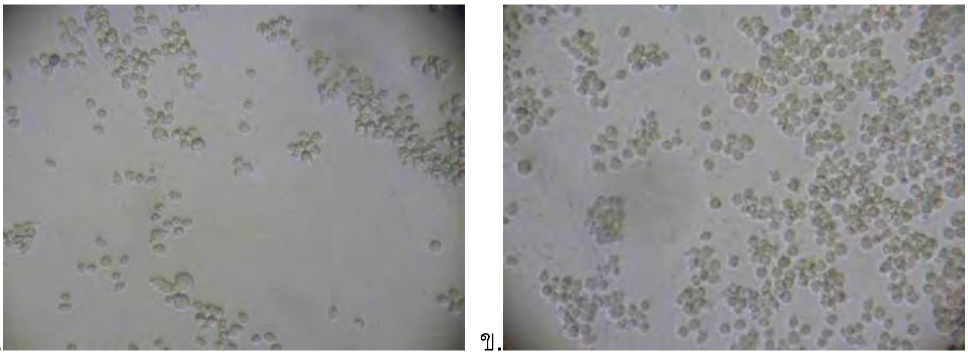
ก. รับสาร quercetin 100 μg/ml ข. รับสาร quercetin 10 μg/ml



ก. ข.

รูปที่ 39 ลักษณะของเซลล์ U937

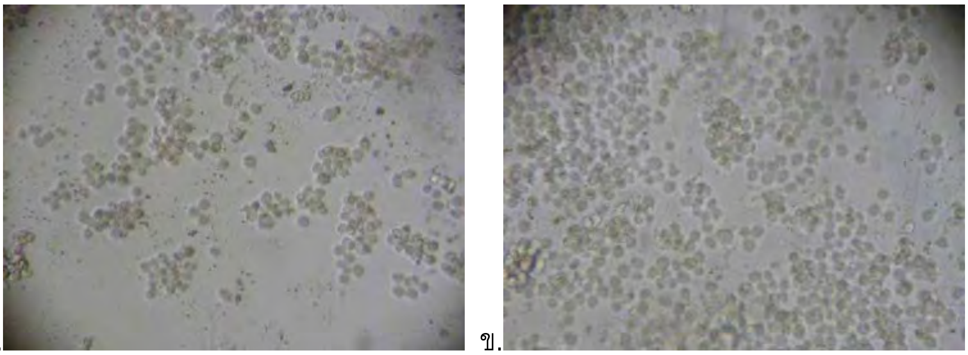
ก. รับสาร quercitrin 100 μg/ml ข. รับสาร quercitrin 10 μg/ml



ก. ข.

รูปที่ 40 ลักษณะของเซลล์ U937

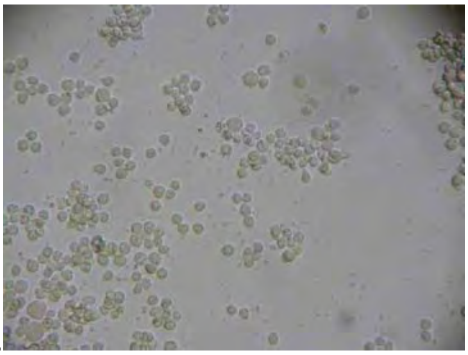
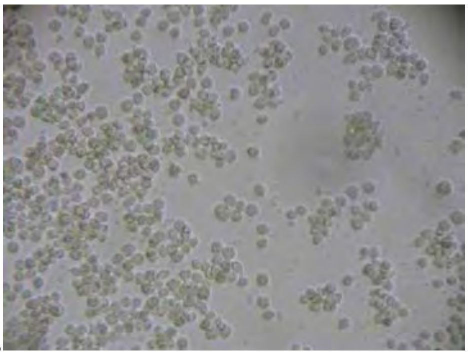
ก. รับสาร hyperin 100 μg/ml ข. รับสาร hyperin 10 μg/ml



ก. ข.

รูปที่ 41 ลักษณะของเซลล์ U937

ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัด ด้วยน้ำ 100 μg/ml

ก.  ข. 

รูปที่ 42 ลักษณะของเซลล์ U937

ก. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 500 μg/ml ข. รับสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 100 μg/ml

4. ผลการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์

4.1 ผลการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA

เมื่อทำการเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ ที่ความเข้มข้น 350 μg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาว และ 50 μg/ml สำหรับสารฟลาโวนอยด์ (ระดับต่ำกว่า IC_{50}) และทำการกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA เพียงอย่างเดียวจะทำให้มีปริมาณของ IL-2 เท่ากับ 869.46$\pm$26.41 pg/ml และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA ภายหลังการเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์พบปริมาณของ IL-2 เท่ากับ 139.27$\pm$8.11 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 665.58$\pm$7.06 pg/ml สำหรับสาร quercitrin, 693.69$\pm$4.06 pg/ml สำหรับสาร hyperin, 479.48$\pm$3.84 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจากน้ำ และ 253.10$\pm$7.84 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจาก 95% แอลกอฮอล์ ดังตารางที่ 13

และเมื่อกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA จะทำให้มีปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 107.83$\pm$25.39 pg/ml และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA ภายหลังการเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์พบปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 28.53$\pm$4.04 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 76.12$\pm$17.71 pg/ml สำหรับสาร quercitrin, 81.99$\pm$20.37 pg/ml สำหรับสาร hyperin, 88.51$\pm$22.66 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจากน้ำ และ 35.26$\pm$7.72 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจาก 95% แอลกอฮอล์ ดังตารางที่ 14

เมื่อทำการเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ ที่ความเข้มข้น 350 μg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาว และ 50 μg/ml สำหรับสารฟลาโวนอยด์ (ระดับต่ำกว่า IC_{50}) และทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS เพียงอย่างเดียวจะทำให้มีปริมาณของ IL-6 เท่ากับ 96.72±6.87 pg/ml และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS ภายหลังการเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์พบปริมาณของ IL-6 เท่ากับ 12.77±0.65 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 71.14±5.04 pg/ml สำหรับสาร quercitrin, 70.48±7.58 pg/ml สำหรับสาร hyperin, 83.41±5.23 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจากน้ำ และ 253.10±7.84 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจาก 95% แอลกอฮอล์ ดังตารางที่ 15

และเมื่อกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS จะทำให้มีปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 1531.22±86.86 pg/ml และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS ภายหลังการเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์พบปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 667.31±84.70 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 1660.44±79.27 pg/ml สำหรับสาร quercitrin, 1647.07±92.16 pg/ml สำหรับสาร hyperin, 1477.71±77.80 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจากน้ำ และ 964.93±60.41 pg/ml สำหรับสารสกัดพลูคาวจาก 95% แอลกอฮอล์ ดังตารางที่ 16

โดยในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์ Jurkat และไซโตไคน์ IL-2 ในเซลล์ U937 ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี ELISA

ตารางที่ 13 ปริมาณ IL-2 ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat

	IL-2 (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	13.52	11.81	14.61	13.31±0.81
Positive control	826.12	917.26	864.99	869.46±26.41
Quercetin	155.45	130.24	132.12	139.27±8.11*
Quercitrin	663.75	678.61	654.38	665.58±7.06*
Hyperin	690.37	701.76	688.93	693.69±4.06*
สารสกัดพลูคาวจากน้ำ	479.57	472.78	486.08	479.48±3.84*
สารสกัดพลูคาวจากแอลกอฮอล์	239.92	267.06	252.32	253.10±7.84*

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร PMA/PHA เพียงอย่างเดียว)

ตารางที่ 14 ปริมาณ TNF-α ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat

	TNF-α (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	18.47	19.01	24.80	20.76±2.02
Positive control	126.63	57.59	139.28	107.83±25.39
Quercetin	31.96	20.48	33.15	28.53±4.04*
Quercitrin	84.94	42.00	101.40	76.12±17.71
Hyperin	90.97	43.08	111.93	81.99±20.37
สารสกัดพลูคาวจากน้ำ	108.23	43.30	113.99	88.51±22.66
สารสกัดพลูคาวจากแอลกอฮอล์	48.12	21.41	36.25	35.26±7.72*

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร PMA/PHA เพียงอย่างเดียว)

ตารางที่ 15 ปริมาณ IL-6 ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937

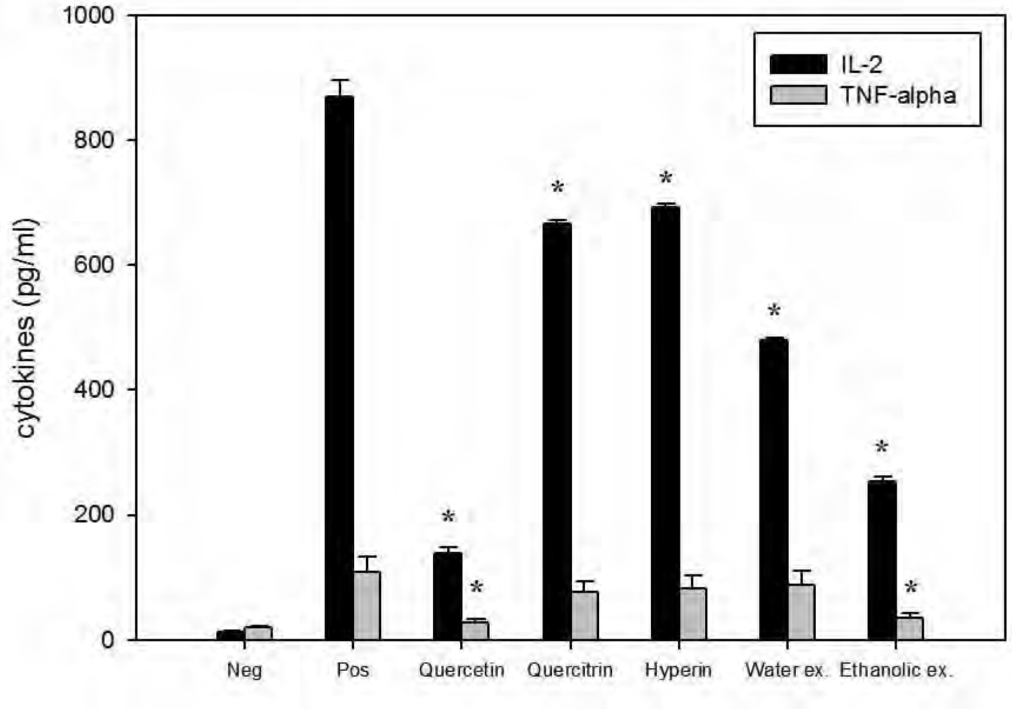
	IL-6 (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	28.57	27.10	27.84	27.84±0.43
Positive control	102.38	83.05	104.74	96.72±6.87
Quercetin	13.96	11.72	12.64	12.77±0.65*
Quercitrin	73.53	61.46	78.42	71.14±5.04*
Hyperin	80.80	55.70	74.94	70.48±7.58*
สารสกัดพลูคาวจากน้ำ	92.47	74.34	83.41	83.41±5.23
สารสกัดพลูคาวจากแอลกอฮอล์	19.60	15.70	18.92	18.07±1.20*

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว)

ตารางที่ 16 ปริมาณ TNF-α ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937

	TNF-α (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	519.48	524.17	497.45	513.73$\pm$8.25
Positive control	1624.38	1611.62	1357.65	1531.22$\pm$86.86
Quercetin	696.57	797.19	508.17	667.31$\pm$84.70*
Quercitrin	1738.80	1740.61	1501.90	1660.44$\pm$79.27
Hyperin	1728.78	1749.29	1463.14	1647.07$\pm$92.16
สารสกัดพลูคาวจากน้ำ	1531.11	1577.58	1324.44	1477.71$\pm$77.80
สารสกัดพลูคาวจากแอลกอฮอล์	962.30	107.86	861.65	964.93$\pm$60.41*

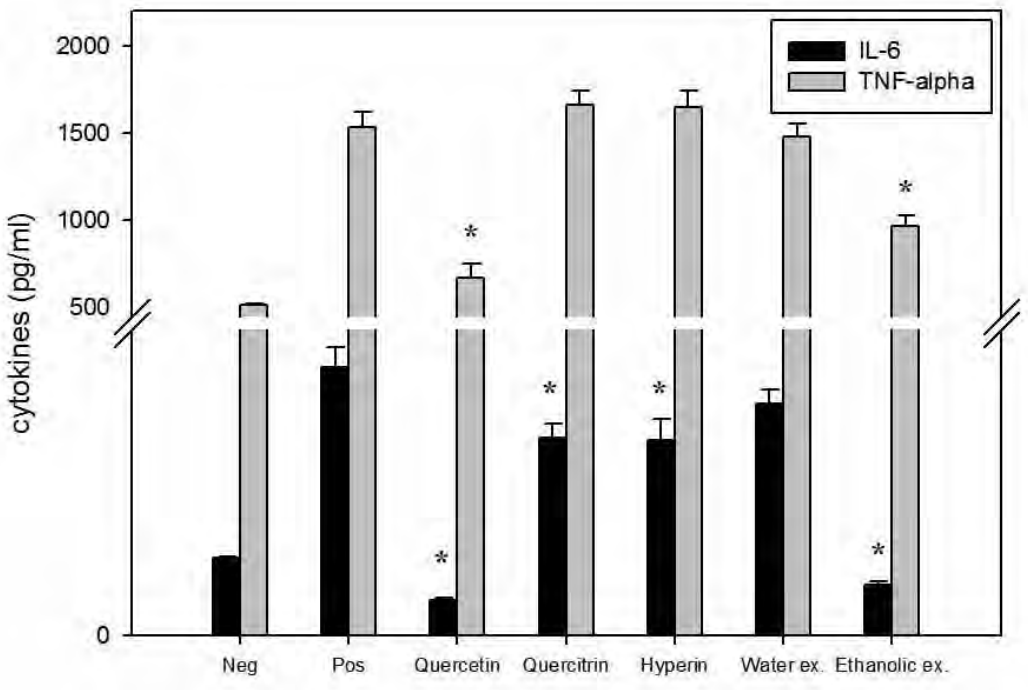
* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว)



รูปที่ 43 กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat วิธี ELISA

เซลล์ Jurkat ถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ในภาวะที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control



รูปที่ 44 กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 วิธี ELISA

เซลล์ U937 ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในภาวะที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control

4.2 ผลการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex

ในการตรวจวัดปริมาณของไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex ได้จัดกลุ่มของไซโตไคน์ตามหน้าที่หลักของไซโตไคน์ โดยแบ่งกลุ่มเป็น hematopoietic cytokines หรือไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งก็คือ IL-2, G-CSF และ GM-CSF และ inflammatory cytokines หรือไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งก็คือ IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β และ TNF-α ส่วน IL-5 และ IL-7 ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ Jurkat และ U937 เมื่อกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA พบว่า PMA/PHA สามารถกระตุ้นให้เซลล์ Jurkat หลั่งไซโตไคน์ IL-2, IL-8, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-γ, MIP-1β และ TNF-α และเมื่อ treat เซลล์

Jurkat ด้วยสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ก่อนทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย PMA/PHA พบว่ามีการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ Jurkat ดังตารางที่ 17 และ 18 และตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์เมื่อกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS จะพบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α และสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์จะสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ U937 ได้ ดังตารางที่ 19 และ 20 แต่ IL-8, MCP-1 และ MIP-1β ในเซลล์ U937 มีปริมาณสูงจนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณได้

ตารางที่ 17 ปริมาณของ hematopoietic cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

	Jurkat (pg/ml)	
	IL-2	GM-CSF
Negative control	3.46±0.07	1.10±0.18
Positive control	3516.70±727.05	30.70±4.16
Quercetin	7.92±1.20*	3.57±1.57*
Quercitrin	2193.62±300.14	21.01±2.32
Hyperin	1175.02±709.25*	12.81±6.63*
สารสกัดพลูคาวจากน้ำ	1610.40±124.89*	21.36±0.73
สารสกัดพลูคาวจากแอลกอฮอล์	58.00±33.48*	3.46±0.01*

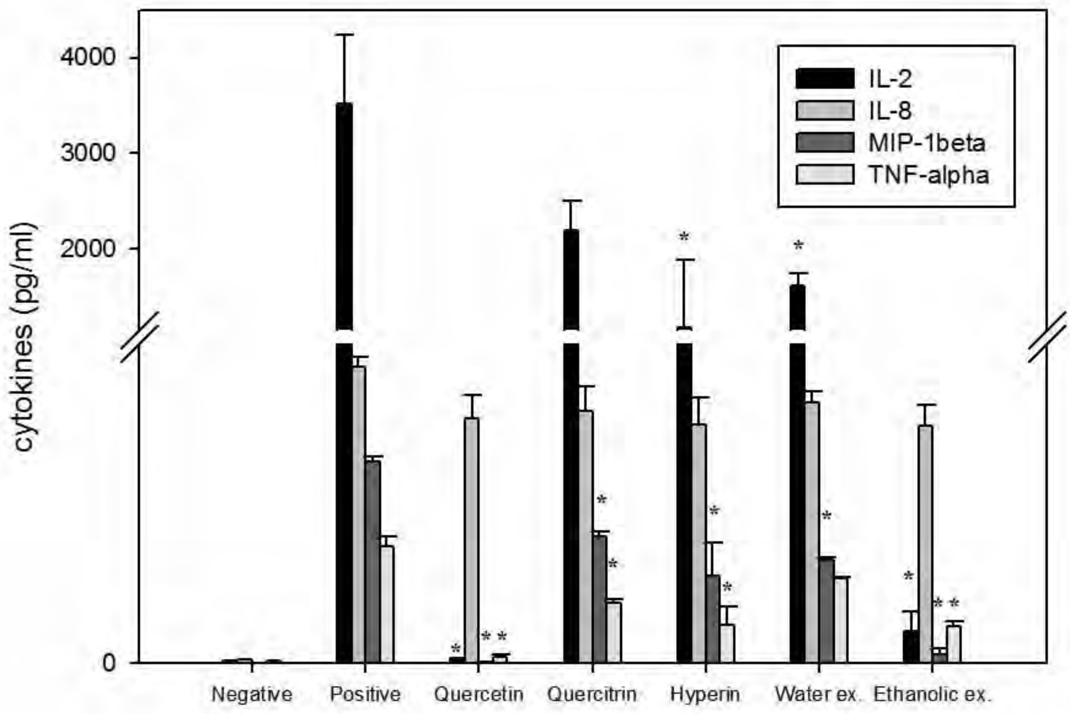
* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร PMA/PHA เพียงอย่างเดียว)

ตารางที่ 18 ปริมาณของ inflammatory cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

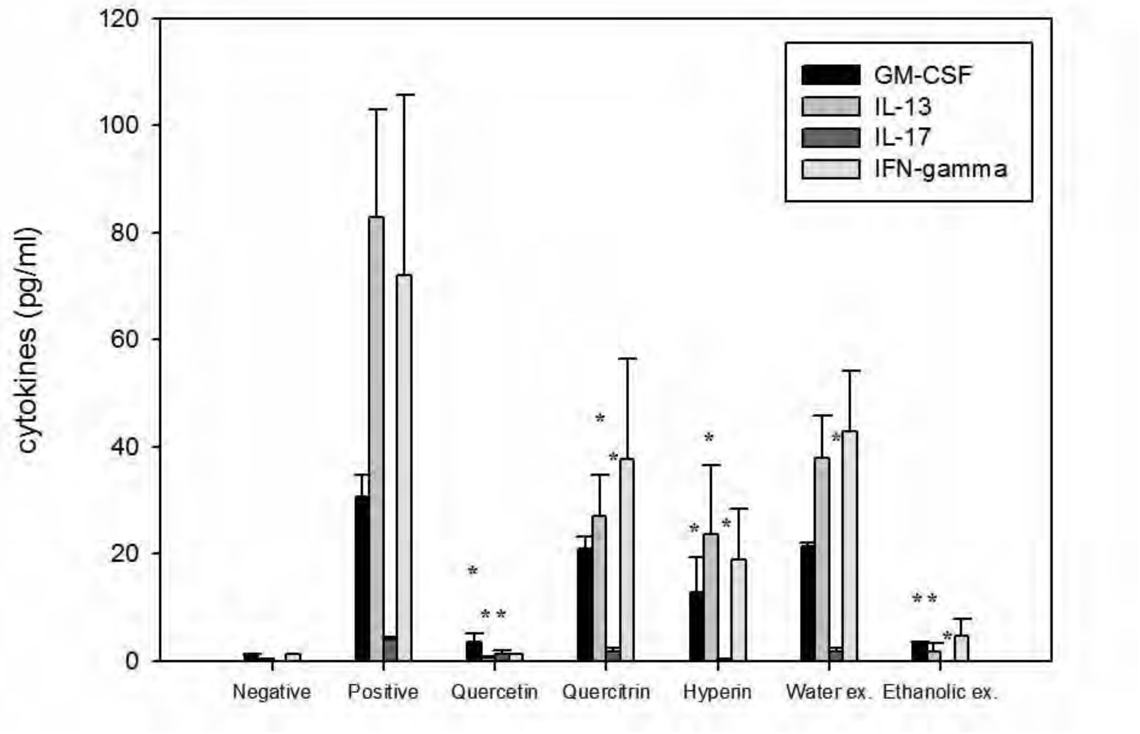
	Jurkat (pg/ml)					
	IL-8	IL-13	IL-17	IFN-γ	MIP-1β	TNF-α
Negative	<6.58	0.24±0.07	<0.10	<1.26	0.38±0.15	<4.56
Positive	533.85±18.49	82.87±20.10	4.11±0.42	72.06±33.60	362.43±8.10	209.53±19.09
Quercetin	440.64±43.01	0.53±0.27*	1.30±0.65*	<1.26	0.81±0.16*	10.78±5.41*
Quercitrin	452.88±45.97	27.11±7.71*	1.68±0.84*	37.68±18.71	226.68±9.50*	107.01±8.22*
Hyperin	428.76±49.2	23.77±12.83*	0.21±0.11*	18.97±9.49	156.93±59.78*	67.62±33.15*
สารสกัดจากน้ำ	469.65±19.32	37.96±7.82	1.68±0.84*	42.80±11.40	185.12±6.00*	151.48±2.66
สารสกัดจากแอลกอฮอล์	427.77±36.46	1.76±1.54*	<0.10*	4.59±3.33	15.16±11.10*	66.58±7.55*

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร PMA/PHA เพียงอย่างเดียว)

ก.


IL-2
IL-8
MIP-1beta
TNF-alpha
cytokines (pg/ml)
4000
3000
2000
0
Negative
Positive
Quercetin
Quercitrin
Hyperin
Water ex.
Ethanolic ex.

ข.



รูปที่ 45 กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat วิธี Bio-Plex

ก. IL-2, IL-8, MIP-1β และ TNF-α ข. GM-CSF, IL-13, IL-17 และ IFN-γ

เซลล์ Jurkat ถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ในภาวะที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control

ตารางที่ 19 ปริมาณของ hematopoietic cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937 โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

	U937 (pg/ml)		
	IL-2	G-CSF	GM-CSF
Negative control	8.63±0.65	7.88±0.39	5.64±0.97
Positive control	13.88±1.63	14.69±2.15	9.38±2.74
Quercetin	6.37±0.98*	4.50±0.57*	5.41±1.83
Quercitrin	11.70±0.55	13.99±1.21	8.65±1.25
Hyperin	13.85±0.36	14.71±1.44	8.03±0.90
สารสกัดพลูคาวจากน้ำ	12.38±0.10	14.94±1.67	9.89±1.26
สารสกัดพลูคาวจากแอลกอฮอล์	11.34±0.73	10.05±1.01	5.68±1.57

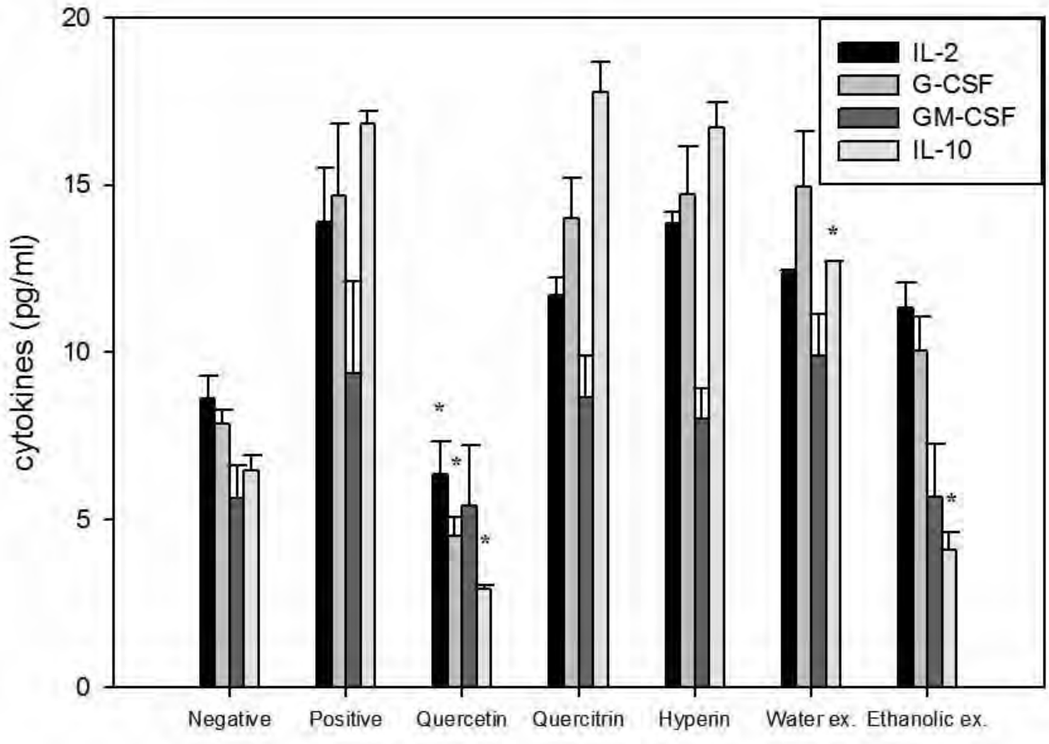
* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว)

ตารางที่ 20 ปริมาณของ inflammatory cytokines ที่ตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ U937 โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

	U937 (pg/ml)				
	IL-1β	IL-6	IL-10	IFN-γ	TNF-α
Negative	71.91±2.46	55.82±4.64	6.47±0.44	69.20±0	595.10±120.12
Positive	148.91±38.20	214.20±36.50	16.84±0.38	161.17±21.06	2707.15±208.97
Quercetin	81.71±4.28	22.16±4.62*	2.92±0.12*	69.12±8.42*	465.54±74.73*
Quercitrin	89.71±0.42	160.13±11.19	17.79±0.89	159.55±4.58	3109.48±219.85
Hyperin	91.02±2.37	153.59±25.28	16.72±0.76	162.31±3.66	3200.66±141.11
สารสกัดจากน้ำ	99.14±0.37	202.86±25.20	12.72±0.02*	153.08±9.23	2928.12±202.88
สารสกัดจากแอลกอฮอล์	96.98±3.43	40.39±5.97*	4.09±0.52*	97.76±1.99*	1375.28±87.17*

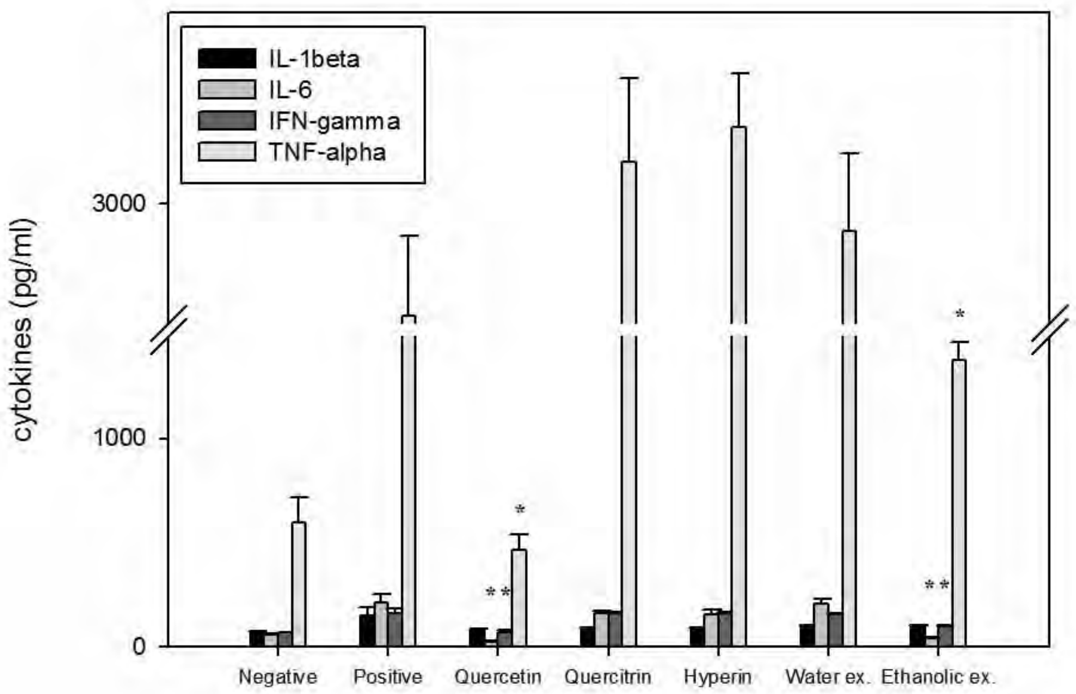
* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว)

ก.



20
15
10
5
0
cytokines (pg/ml)
IL-2
G-CSF
GM-CSF
IL-10
Negative
Positive
Quercetin
Quercitrin
Hyperin
Water ex.
Ethanolic ex.

ข.



รูปที่ 46 กราฟปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 วิธี Bio-Plex

ก. IL-2, G-CSF, GM-CSF และ IL-10 ข. IL-1β, IL-6, IFN-γ และ TNF-α

เซลล์ U937 ถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ในภาวะที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคมะเร็งของกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดที่ต้องได้รับการรักษาติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งในการรักษานั้นจะเกิดผลข้างเคียงของการใช้เคมีบำบัดและรังสีรักษา และในปัจจุบันการรักษาด้วยสมุนไพร ซึ่งก็เป็นหนึ่งในการรักษาทางเลือกมาร่วมใช้ในการรักษาเพื่อช่วยลดผลข้างเคียงจากการรักษา ทั้งนี้จากการศึกษาของ Chang และคณะ [3] การศึกษาของ Ramos และคณะ [57] และการศึกษาของ Moqattash และ Lutton [67] ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจผลของพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ที่พบในพลูคาวที่มีต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาวในการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

จากผลการศึกษาโดยการสกัดพลูคาวทั้ง 2 วิธี คือการสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% พบว่า ปริมาณของสารสกัดที่ได้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน แต่มีลักษณะของสีที่แตกต่างกัน โดยสีของสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำอ่อนกว่าสีของสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และมีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดพลูคาวแตกต่างกันไป โดยสารสกัดพลูคาวที่ทำการสกัดด้วยน้ำจะมีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่น้อยกว่าสารสกัดพลูคาวที่ทำการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ แสดงให้เห็นว่า แอลกอฮอล์มีคุณสมบัติในสกัดสารฟลาโวนอยด์จากพลูคาวได้ดีกว่าน้ำและน่าจะเป็นวิธีที่เป็นทางเลือกในการสกัดสารฟลาโวนอยด์

ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง พบว่า สารสกัดพลูคาวและสารสกัดฟลาโวนอยด์จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ U937 ได้ดีกว่าเซลล์ Jurkat เมื่อใช้สารสกัดในปริมาณที่เท่ากัน และสารฟลาโวนอยด์จะให้ผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าสารสกัดพลูคาว และในส่วนของสารฟลาโวนอยด์นั้น quercetin ให้ผลดีที่สุด ตามมาด้วย quercitrin และ hyperin ตามลำดับ และในสารสกัดพลูคาวจะพบว่า สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% ให้ผลการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี microscopic analysis ที่พบว่าในสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้น้อยกว่าสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นสูง และ

ผลที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวก็สอดคล้องกับปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบจากสารสกัดพลูคาวทั้ง 2 วิธี คือ การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% ได้ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ ทำให้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีกว่า จากผลการทดลองที่ได้ก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Lamson และคณะ [109] และการศึกษาของ Casagrande และคณะ [110] รวมไปถึงการศึกษาของ Seremet และคณะ [111] พบว่า สารฟลาโวนอยด์และสารสกัดพลูคาวสามารถยับยั้งให้ cell cycle ของเซลล์มะเร็งหยุดอยู่ใน G1/S phase และ G2/M phase โดยควบคุมการทำงานของเอนไซม์ cyclin-dependent-kinases 1 (CDK 1) ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ และจากการศึกษาของ Jang และคณะ [56] พบว่า สาร quercitrin ในพลูคาวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA topoisomerase I activity ทำให้ไม่สามารถเกิดการ replication และ transcription ต่อไป และการศึกษาของ Wang และคณะ [63] พบว่า สารฟลาโวนอยด์ยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 และ Bcl-X_L ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเกิด apoptosis และไปกระตุ้นการแสดงออกของ Bax และ Bak ซึ่งกระตุ้นให้ mitochondria ปล่อย cytochrome c ไปกระตุ้น APAF-1 ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ caspase-9 ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ caspase-3 ก่อให้เกิดการ apoptosis ต่อไป และจากการศึกษาของ Brusselmans และคณะ [112] พบว่า สารฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase ที่สร้าง end product คือ palmitate ที่ไปยับยั้งคุณสมบัติ cytotoxic ของสารฟลาโวนอยด์ และการศึกษาของ Huang และคณะ [113] และการศึกษาของ Levitzki และคณะ [114] พบว่า สารฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinases โดยยับยั้งการ phosphorylation ของ JAK-STAT [53] PI3K [115] Raf-MEK [54] Akt [116] MAPK signaling pathway [117] และ c-AMP independent protein kinases [118] ทำให้ส่งผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เมื่อคณะผู้วิจัยทำการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA พบว่า สารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์ให้ผลในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยในส่วนของสารฟลาโวนอยด์นั้น พบว่า สารฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิดคือ quercetin, quercitrin และ hyperin และสารสกัดพลูคาวจะสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-2 ของเซลล์ Jurkat ได้ ในขณะที่มีเพียงสาร quercetin และสารสกัดพลูคาวที่ทำการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง TNF-α ของเซลล์ Jurkat ได้ และในเซลล์ U937 สารฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้ในขณะที่สารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ IL-6 และ TNF-α ได้ และเมื่อผู้วิจัยทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex พบว่าสาร quercetin สามารถยับยั้งการหลั่ง

ไซโตไคน์ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารฟลาโวนอยด์อีก 2 ชนิด และสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์จะยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ได้ดีกว่าสารสกัดพลูคาวที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดทั้ง 2 ชนิด โดยจากการศึกษาของ Khalaf และคณะ [119] และการศึกษาของ Schafer และคณะ [120] พบว่า การหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ Jurkat โดยการกระตุ้น PMA/PHA เกิดจากการทำงานของ NF-κB และ activated protein-1 (AP-1) และจาก PI3K และ MAPK signaling pathway [121, 122] จากการศึกษาของ Nakata และคณะ [123] พบว่า การหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ U937 เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ NF-κB, PI3K และ MAPK signaling pathway ซึ่งผลจากการทดลองที่ได้จะสอดคล้องกับการศึกษาของ Shin และคณะ [124] ที่ว่า การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของสารสกัดพลูคาว เป็นการยับยั้ง cyclooyxgenase II (COX II)-prostaglandin E_2 (PGE_2) pathway และจากการศึกษาของ Hou และคณะ [54] พบว่า สารฟลาโวนอยด์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinases ทำให้ลดการแสดงออกของ NF-κB และ AP-1 และการศึกษาของ Choi และคณะ [125] พบว่า สารสกัดพลูคาวสามารถยับยั้ง TNF-α ในการกระตุ้นการทำงานของ COX II และจากการศึกษาของ Boots และคณะ [126] พบว่า quercetin ลดการสร้างไซโตไคน์จากการกระตุ้นของ TNF-α ได้ และเนื่องจากไซโตไคน์บางชนิด คือ IL-10 และ IL-13 ที่มีคุณสมบัติเป็น anti-inflammatory นั้น มีปริมาณของไซโตไคน์ลดลงด้วย เนื่องมาจากผลของสาร ฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์จากกระบวนการข้างต้นได้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลของปริมาณไซโตไคน์จากการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA และวิธี Bio-Plex พบว่า วิธี Bio-Plex สามารถตรวจวัดปริมาณของไซโตไคน์หลายชนิดที่ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA ได้ เนื่องมาจากวิธี ELISA นั้นเป็นวิธีการวัดการเกิดสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ horseradish peroxidase และสีที่เกิดขึ้นนั้นวัดความแตกต่างของสีจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง จึงต้องมีความแตกต่างของสีในระดับหนึ่ง จึงจะสามารถทำการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ได้ แต่ในวิธี Bio-Plex นั้น เป็นการตรวจวัดปริมาณของไซโตไคน์จากปริมาณของสี fluorescence ซึ่งจะเรืองแสงและตรวจวัดผ่านเครื่องได้โดยตรง ไม่ต้องผ่านการทำปฏิกิริยาใด ๆ ก่อน และเป็นการตรวจวัดด้วยการใช้แสงเลเซอร์ในการตรวจวัด ซึ่งจะมีความไวมากกว่าการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า พลูคาวซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยสามารถนำมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยเมื่อทำการสกัดพลูคาว ควรทำการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ เพื่อที่จะให้ได้ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำโดยสารฟลาโวนอยด์ในพลูคาวนั้นมีผลอย่างชัดเจนในการยับยั้ง

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว และลดระดับปริมาณของไซโตไคน์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และ การอักเสบของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

รายการอ้างอิง

[1]นพดล ศิริธนารัตนกุล. โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=323 [2553, มีนาคม 2].

[2]Leukemia [online]. 2010. Available from: http://www.medicinenet.com/leukemia/article.htm [2010, March 2].

[3]Chang, J.S., Chiang, L.C., Chen, C.C., Liu, L.T., Wang, K.C., and Lin, C.C. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. Am J Chin Med. 29, 2 (2001): 303-312.

[4]Zhen, T., and Chen, S.J. Progress on targeted therapy of acute myeloid leukemia with active components of Chinese herbal medicines. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 29, 1 (2009): 14-18.

[5]Touw, I., Delwel, R., Bolhuis, R., van Zanen, G., and Löwenberg, B. Common and pre-B acute lymphoblastic leukemia cells express interleukin 2 receptors, and interleukin 2 stimulates in vitro colony formation. Blood. 66, 3 (1985): 556-561.

[6] Panayotides, P., Porwit, A., Lenkei, R., and Reizenstein, P. Interleukin-2 can induce proliferation of leukemic B-cells in prolymphocytic leukemia. Eur J Hematol. 38, 3 (1987):274-278.

[7]Oster, W., et al. Participation of the cytokines interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin 1-beta secreted by acute myelogenous leukemia blasts in autocrine and paracrine leukemia growth control. J Clin Invest. 84, 2 (1989): 451-457.

[8]Cozzolino, F., et al. Interleukin 1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 86, 7 (1989): 2369-2373.

[9]Bradbury, D., Rogers, S., Reilly, I.A., Kozlowski, R., and Russell, N.H. Role of autocrine and paracrine production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 beta in the autonomous growth of acute

myeloblastic leukaemia cells--studies using purified CD34-positive cells. Leukemia. 6, 6 (1992): 562-566.

[10]Arima, N., et al. IL-2-induced growth of $CD8^+$ T cell prolymphocytic leukemia cells mediated by NF-κB induction and IL-2 receptor α expression. Leuk Res. 22, 3 (1998): 265-273.

[11]อิศรางค์ นุชประยูร. Overview of leukemia. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 5-16.

[12]จิรายุ เอื้อวรากุล. บทนำ. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์. 2552. 11-20.

[13]พรเทพ เทียนสิวากุล. Traditional classification of leukemia. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 73-79.

[14]จิรายุ เอื้อวรากุล. การแบ่งชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์. 2552. 21-62.

[15]ภัทรา นันทวัน. Chemical carcinogens induce leukemi. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 17-28.

[16]ประยุทธ โรจนพรประดิษฐ. Ionizing radiation effects induce leukemia. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 29-43.

[17]ชินวร พรหมชัยนันทน์. Chromosome, Chromosomal disorders, Chromosomal aberration in leukemia. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 45-58.

[18]พรเทพ เทียนสิวากุล. Viral leukemogenesis. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 59-72.

[19]จิรายุ เอื้อวรากุล. อาการทางคลินิกของมะเร็งเม็ดเลือดขาว. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์. 2552. 63-74.

[20]จิรายุ เอื้อวรากุล. การวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวระดับเซลล์. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์. 2552. 75-130.

[21]พรเทพ เทียนสิวากุล. FAB morphologic classification of acute leukemia. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 81-91.

[22]Leukemia [online]. 2010. Available from: http://www.ent.mrt.ac.lk/~040007/. [2011, March 21].

[23]The Internet Journal of Surgery. Acute Myeloid Leukemia Presenting As Priapism [online]. 2009. Available from: http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_surgery/volume_21_number_1_1/article/acute_myeloid_leukemia_presenting_as_priapism.html. [2011, March 21].

[24]Haematological Malignancy Diagnostic Service. The Chronic Myeloproliferative Disorders [online]. 2003. Available from: http://www.hmds.org.uk/mpd.html. [2011, March 21].

[25]Hanson, C.A., Kurtin, P.J., and Dogan, A. The proposed diagnostic criteria change for chronic lymphocytic leukemia: unintended consequences?. Blood. 113, 25 (2009): 6495-6496.

[26]Path Wiki. HemaSlide23 [online]. 2011. Available from: http://pathwiki.pbworks.com/w/page/14674003/HemaSlide23. [2011, March 21]

[27]Vardiman, J.W., et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 114, 5 (2009): 937-951.

[28]Vardiman, J.W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. Chem Biol Interact. 184, 1-2 (2010): 16-20.

[29]สถาบันวิจัยสมุนไพร. ผักคาวตอง [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/Plant/MPRI/Q_Houttuynia.shtm. [2553, มีนาคม 2].

[30]ปริญญา จันทรศรี. พลูคาว [ออนไลน์]. 2546. แหล่งที่มา: http://www.ist.cmu.ac.th/riseat/nl/2003/12/03.php. [2554, มีนาคม 28].

[31]Lu, H., Wu, X., Liang, Y., and Zhang, J. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of Houttuynia THUNB. Chem Pharm Bull. 54, 7 (2006): 936-940.

[32]Kim, S.K., Ryu, S.Y., No, J., Choi, S.U., and Kim, Y.S. Cytotoxic alkaloids from Houttuynia cordata. Arch Pharm Res. 24, 6 (2001): 518-521.

[33]Wu, L.S., Si, J.P., Yuan X.Q., and Shi, X.R. Quantitive Variation of Flavonoids in Houttuynia cordata from Different Geographic Origins in China. Chinese Journal of Natural Medicines. 7, 1 (2009): 40-46.

[34]Meng, J., Leung, K.S., Dong, X.P., Zhou, Y.S., Jiang, Z.H., and Zhao, Z.Z. Simultaneous quantification of eight bioactive components of Houttuynia cordata and related Saururaceae medicinal plants by on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray mass spectrometry. Fitoterapia. 80, 8 (2009): 468-474.

[35]Tang, Y.J., et al. Houttuynia cordata Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Oncol Rep. 22, 5 (2009): 1051-1056.

[36]Lai, K.C., et al. Houttuynia cordata Thunb extract inhibits cell growth and induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. Anticancer Res. 30, 9 (2010): 3549-3556.

[37]Park, E., Kum, S., Wang, C., Park, S.Y., Kim, B.S., and Schuller-Levis, G. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production

and tumor necrosis factor-alpha secretion in an activated macrophage-like cell line. Am J Chin Med. 33, 3 (2005): 415-424.

[38]Li, G.Z., Chai, O.H., Lee, M.S., Han, E.H., Kim, H.T., and Song, C.H. Inhibitory effects of Houttuynia cordata water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. Biol Pharm Bull. 28, 10 (2005): 1864-1868.

[39]Li, W., Zhou, P., Zhang, Y., and He, L. Houttuynia cordata, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. J Ethnopharmacol. 133, 2 (2011): 922-927.

[40]Hayashi, K., Kamiya, M., and Hayashi, T. Virucidal effects of the steam distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. Planta Med. 61, 3 (1995): 237-241.

[41]Chiang, L.C., Chang, J.S., Chen, C.C., Ng, L.T., and Lin, C.C. Anti-Herpes simplex virus activity of Bidens pilosa and Houttuynia cordata. Am J Chin Med. 31, 3 (2003): 355-362.

[42]Chen, Y.Y., Liu, J.F., Chen, C.M., Chao, P.Y., and Chang, T.J. A study of the antioxidative and antimutagenic effects of Houttuynia cordata Thunb. using an oxidized frying oil-fed model. J Nutr Sci Vitaminol. 49, 5 (2003): 327-333.

[43]Kusirisin, W., et al. Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. Med Chem. 5, 2 (2009): 139-147.

[44]Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, H.Y., Shibahara, N., and Park, J.C. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation. Am J Chin Med. 31, 6 (2003): 907-917.

[45]Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., and Zhang, L. Flavonoids: promising anticancer agents. Med Res Rev. 23, 4 (2003): 519-534.

[46]Xu, Y.C., et al. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. Phytochemistry. 68, 8 (2007): 1179-1188.

[47]Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., and van Leeuwen, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. 74, 4 (2001): 418-425.

[48]i-coloncancer. Poly-phenols And Colon Or Rectal Cancer [online]. 2010. Available from: http://i-coloncancer.com/poly-phenols-and-colon-or-rectal-cancer/. [2011, March 30].

[49]Amic, D., Ducanka, D.A., Drago, B., and Nanad, T. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croatica Chemica Acta. 76 , 1 (2003): 55-61.

[50]Ivanov, V., et al. Essential nutrients suppress inflammation by modulating key inflammatory gene expression. Int J Mol Med. 22, 6 (2008): 731-741.

[51]Formica, J.V., and Regelson, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol. 33, 12 (1995): 1061-1080.

[52]Gonzalez-Gallego, J., Sanchez-Campos, S., and Tunon, M.J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. Nutr Hosp. 22, 3 (2007): 287-293.

[53]Muthian, G., and Bright, J.J. Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T lymphocyte. J Clin Immunol. 24, 5 (2004): 542-552.

[54]Hou, D.X., and Kumamoto, T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. Antioxid Redox Signal. 13, 5 (2010): 691-719.

[55]Matsui, J., et al. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. Leuk Res. 29, 5 (2005): 573-581.

[56]Jang, S.Y., Bae, J.S., Lee, Y.H., Oh, K.Y., Park, K.H., and Bae, Y.S. Caffeic acid and quercitrin purified from Houttuynia cordata inhibit DNA topoisomerase I activity. Nat Prod Res, 25, 3 (2011): 222-231.

[57]Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. J Nutr Biochem. 18, 7 (2007): 427-442.

[58]Khan, N., Adhami, V.M., and Mukhtar, H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 17, 1 (2010): 39-52.

[59]Quercetin [online]. 2010. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin [2010, December 20].

[60]Quercitrin [online]. 2010. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Quercitrin [2010, December 20].

[61]Hyperin [online]. 2010. Available from : http://en.wikipedia.org/wiki/Hyperin [2010, December 20].

[62]Miller, A.L. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. Alternative Medicne Review. 1, 2 (1996): 103-111.

[63]Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., and Lin, J.K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. European Journal of Cancer. 35, 10 (1999): 1517-1525.

[64]Mertens-Talcott, S.U., Talcott, S.T., and Percival, S.S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. J Nutr. 133, 8 (2003): 2669-2674.

[65]Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., and Olah, E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. Life Sci. 60, 24 (1997):2157-2163.

[66]Lugli, E., et al. Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. Leuk Res. 33, 1 (2009):140-150.

[67]Moqattash, S., and Lutton, J.D. Leukemia cells and the cytokine network: therapeutic prospects. Exp Biol Med. 229, 2 (2004): 121-137.

[68]Sachs, L. The Molecular Control of Hematopoiesis and Leukemia: From Basic Biology to the Clinic. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 1 (2000): 1.

[69]Russell, N,H. Autocrine growth factors and leukaemic haemopoiesis. Blood Reviews. 6, 3 (1992): 149-156.

[70]Feghali, C.A., and Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci. 2 (1997): 12-26.

[71]Joyce, S. Natural T cells: cranking up the immune system by prompt cytokine secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 13 (2000): 6933-6935.

[72]Daines, M.O., and Hershey, G.K. A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha -2 and their rapid mobilization by interferon-gamma. J Biol Che. 277, 12 (2002): 10387-10393.

[73]Isidoro-García, M., Dávila, I., Laffond, E., Moreno, E., Lorente, F., and González-Sarmiento, R. Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. Clin Mol Allergy. 3 (2005): 15.

[74]Adachi, T., and Alam, R. The mechanism of IL-5 signal transduction. Am J Physiol. 275, 3 (1998): 623-633.

[75]Sakuishi, K., Oki, S., Araki, M., Porcelli, S.A., Miyake, S., and Yamamura, T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. J Immunol. 179, 6 (2007): 3452-3462.

[76]Lampinen, M., Carlson, M., Håkansson, L.D., and Venge, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. Allergy. 59, 8 (2004): 793-805.

[77]Sachs, L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 10 (1996): 4742-4749.

[78]Fry, T.J., and Mackall, C.L. Interleukin-7: from bench to clinic. Blood. 99, 11 (2002): 3892-3904.

[79]Purton, J.F., Martin, C.E., and Surh, C.D. Enhancing T cell memory: IL-7 as an adjuvant to boost memory T-cell generation. Immunol Cell Biol. 86, 5 (2008): 385-386.

[80]Tobler, A., et al. Constitutive expression of interleukin-8 and its receptor in human myeloid and lymphoid leukemia. Blood. 82, 8 (1993): 2517-2525.

[81]Shahzad, A., Knapp, M., Lang, I., and Köhler, G. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker?. Int Arch Med. 3 (2010): 11.

[82]Waugh, D.J., and Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res. 14, 21 (2008): 6735-6741.

[83]Zhou, J.H., et al. IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. J Immunol. 167, 8 (2001): 4436-4442.

[84]Eisenring, M., vom Berg, J., Kristiansen, G., Saller, E., and Becher, B. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. Nat Immunol. 11, 11 (2010): 1030-1038.

[85]Lafleur, E.A., Jia, S.F., Worth, L.L., Zhou, Z., Owen-Schaub, L.B., and Kleinerman, E.S. Interleukin (IL)-12 and IL-12 gene transfer up-regulate Fas expression in human osteosarcoma and breast cancer cells. Cancer Res. 61, 10 (2001): 4066-4071.

[86]Wynn, T.A. IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol. 21 (2003): 425-456.

[87]Kawaguchi, M., Adachi, M., Oda, N., Kokubu, F., and Huang, S.K. IL-17 cytokine family. J Allergy Clin Immunol. 114, 6 (2004): 1265-1273.

[88]Bar-Yehuda, S., et al. Agonists to the A3 adenosine receptor induce G-CSF production via NF-kappaB activation: a new class of myeloprotective agents. Exp Hematol. 30, 12 (2002): 1390-1398.

[89]Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M., and Julkunen, I. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. Journal of Leukocyte Biology. 71, 3 (2002): 511-519.

[90]Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. 75, 2 (2004): 163-189.

[91]Maus, U., Henning, S., Wenschuh, H., Mayer, K., Seeger, W., and Lohmeyer, J. Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 283, 6 (2002): 2584-2591.

[92]Shireman, P.K., Contreras-Shannon, V., Ochoa, O., Karia, B.P., Michalek, J.E., and McManus, L.M. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. J Leukoc Biol. 81, 3 (2007): 775-785.

[93]Lillard, J.W. Jr., Singh, U.P., Boyaka, P.N., Singh, S., Taub, D.D., and McGhee, J.R. MIP-1alpha and MIP-1beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. Blood. 101, 3 (2003): 807-814.

[94]Abe, M., et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. Blood. 100, 6 (2002): 2195-2202.

[95]Habtemariam, S. Natural inhibitors of tumour necrosis factor-alpha production, secretion and function. Planta Med. 66, 4 (2000): 303-313.

[96]Rangamani, P., and Sirovich, L. Survival and apoptotic pathways initiated by TNF-alpha: modeling and predictions. Biotechnol Bioeng. 97, 5 (2007): 1216-1229.

[97]Kestler, D.P., Agarwal, S., and Hall, R.E. Up-regulation of cytokine mRNA in human monocytes and myeloid cell lines by the differentiation/activation factor p48. Immunology. 86, 3 (1995): 463-468.

[98]Lee, I.H., Kim, I.S., and Lee, S.Y. Expression of alpha1-Acid Glycoprotein and Inflammatory Cytokines during Differentiation of HL-60 Cells. Journal of Chemistry and Molecular Biology. 33, 5 (2000): 402-406.

[99]Hajighasemi, F., and Hajighasemi, S. Effect of propranolol on angiogenic factors in human hematopoietic cell lines in vitro. Iran Biomed J. 13, 4 (2009): 223-228.

[100]Ghosh, C.C., et al. Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear IkappaBalpha. J Immunol. 185, 6 (2010): 3685-3693.

[101]Miskolci, V., et al. TNF[alpha] release from peripheral blood leukocytes depends on a CRM1-mediated nuclear export. Biochem Biophys Res Commun. 351, 2 (2006): 354-360.

[102]Han, E.H., Park, J.H., Kim, J.Y., and Jeong, H.G. Houttuynia cordata water extract suppresses anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response by inhibiting multiple steps of FcepsilonRI signaling in mast cells. Food Chem Toxicol. 47, 7 (2009): 1659-1666.

[103]Ampasavate, C., Okonogi, S., and Anuchapreeda, S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. Afr J Pharm Pharmacol. 4, 1 (2010): 013-021.

[104]Kim, D.O., Jeong, S.W., and Lee, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry. 81, 3 (2003): 321-326.

[105]Abouzid, S.F., and Elsherbeiny, G.M. Increase in flavonoids content in red onion peel by mechanical shredding. Journal of Medicine Plants Research. 2, 9 (2008): 258-260.

[106]Wisconsin Institute for Discovery. Thomson Lab Protocol [online]. 2011. Available from: http://discovery.wisc.edu/home/morgridge/research/regenerative-biology/protocols/. [2011, March 28].

[107]Chiang, L.C., Cheng, H.Y., Liu, M.C., Chieng W., and Lin C.C. In vitro evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 37, 5 (2004): 539-544.

[108]ATCC. XTT Cell Proliferation Assay Kit [online]. Available from: http://www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/KitsPanels/XTTCellProliferationAssayKit/tabid/182/Default.aspx. [2010, December 20].

[109]Lamson, D.W., and Brignall, M.S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. Altern Med Rev. 5, 3 (2000): 196-208.

[110]Casagrande, F., and Darbon, J.M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. Biochem Pharmacol. 61, 10 (2001): 1205-1215.

[111]Seremet, T., et al. Photobiomodulation of quercetin antiproliferative effects, seen in human acute T leukemic Jurkat cells. Rom. J. Biophys. 17, 1 (2007): 33-44.

[112]Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. J Biol Chem. 280, 7 (2005): 5636-5645.

[113]Huang, Y.T., et al. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. Br J Pharmacol. 128, 5 (1999): 999-1010.

[114]Levitzki, A., and Mishani, E. Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. Annu Rev Biochem. 75 (2006): 93-109.

[115]Walker, E.H., et al. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. Mol Cell. 6, 4 (2000): 909-919.

[116]Labbé, D., Provençal, M., Lamy, S., Boivin, D., Gingras, D., and Béliveau, R. The flavonols quercetin, kaempferol, and myricetin inhibit hepatocyte growth factor-induced medulloblastoma cell migration. J Nutr. 139, 4 (2009): 646-652.

[117]Lakhanpal, P., and Rai, D.K. Role of quercetin in cardiovascualar diseases. Internet Journal of Medical Update. 3, 1 (2008): 31-49.

[118]Glossmann, H., Presek, P., and Eigenbrodt, E. Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 317, 1 (1981): 100-102.

[119]Khalaf, H., Jass, J., and Olsson, P.E. Differential cytokine regulation by NF-kappaB and AP-1 in Jurkat T-cells. BMC Immunol. 11 (2010): 26.

[120]Schafer, P.H., et al. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. J Pharmacol Exp Ther. 305, 3 (2003): 1222-1232.

[121]Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J Clin Invest. 109, 3 (2002): 295-299.

[122]Li, Y.Q., Hii, C.S., Costabile, M., Goh, D., Der, C.J., and Ferrante, A. Regulation of lymphotoxin production by the p21ras-raf-MEK-ERK cascade in PHA/PMA-stimulated Jurkat cells. J Immunol. 162, 6 (1999): 3316-3320.

[123]Nakata, H., Uemura, Y., Kobayashi, M., Harada, R., and Taguchi, H. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 suppresses cell growth and constitutive production of granulocyte-colony stimulating factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor in lung cancer cells. Cancer Sci. 94, 2 (2003): 173-180.

[124]Shin, S., et al. Anti-inflammatory effects of a Houttuynia cordata supercritical extract. J Vet Sci. 11, 3 (2010): 273-275.

[125]Choi, J.Y., Lee, J.A., Lee, J.B., Yun, S.J., and Lee, S.C. Anti-Inflammatory Activity of Houttuynia cordata against Lipoteichoic Acid-Induced Inflammation in Human Dermal Fibroblasts. Chonnam Medical Journal. 46, 3 (2010): 140-147.

[126]Boots, A.W., Wilms, L.C., Swennen, E.L., Kleinjans, J.C., Bast, A., and Haenen, G.R. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. Nutrition. 27, 7-8 (2008): 703-710.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

- อาหารเลี้ยงเซลล์
    - RPMI-1640 90 มิลลิลิตร
    - fetal bovine serum 10 มิลลิลิตร
    - 1% L-glutamine 1 มิลลิลิตร
    - 100x penicillin-streptomycin 1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 5% w/v $NaNO_2$
    - $NaNO_2$ 5 กรัม
    - distilled deionized water 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย 10% w/v $AlCl_3$
    - $AlCl_3$ 10 กรัม
    - distilled deionized water 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย 1M NaOH
    - NaOH 4 กรัม
    - distilled deionized water 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย XTT 1 mg/ml
    - XTT 5 มิลลิกรัม
    - PMS 0.5 มิลลิกรัม
    - RPMI-1640 5 มิลลิลิตร
- Phosphate buffer saline
    - NaCl 8 กรัม
    - KCl 0.2 กรัม
    - Na_2HPO_4 1.15 กรัม
    - KH_2PO_4 0.20 กรัม

ละลายใน distilled water 800 มิลลิลิตร และทำการปรับ pH ให้เป็น 7.4 แล้วจึงเติม distilled water ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

แบบรายงานผลการพิสูจน์ชนิดของพลูคาว

แบบขอใช้บริการพิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1 / 2554 วันที่ 28 ม.ค. 2554

1. ชื่อผู้ขอใช้บริการ นายจตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย
2. ที่อยู่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   โทรศัพท์ติดต่อ 089-826-1670 โทรสาร

   E-mail
3. วัตถุประสงค์การขอใช้บริการ

   ☑ ตรวจระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์ไม้ จำนวน 1 ตัวอย่าง

   ☐ สอบถามข้อมูลพันธุ์ไม้

   ☑ ทำ Voucher Specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง (พลูคาว)

   ☐ อื่นๆ

ลงชื่อ จตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย
(จตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย.)
ผู้ขอใช้บริการ

แบบรายงานผล

เลขที่ 1 / 2554 วันที่ 14 ก.พ. 2554

รายการงานที่ทำ ตรวจระบุชื่อวิทยาศาสตร์ และทำ Voucher Specimen จำนวน 1 ชนิด

ผลการตรวจวิเคราะห์ / สืบค้นข้อมูล

ชื่อไทย : ผักคาวทอง, พลูคาว, ผักคาวตอง, พลูแก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Houttuynia cordata* Thunb.

ชื่อวงศ์ : Saururaceae

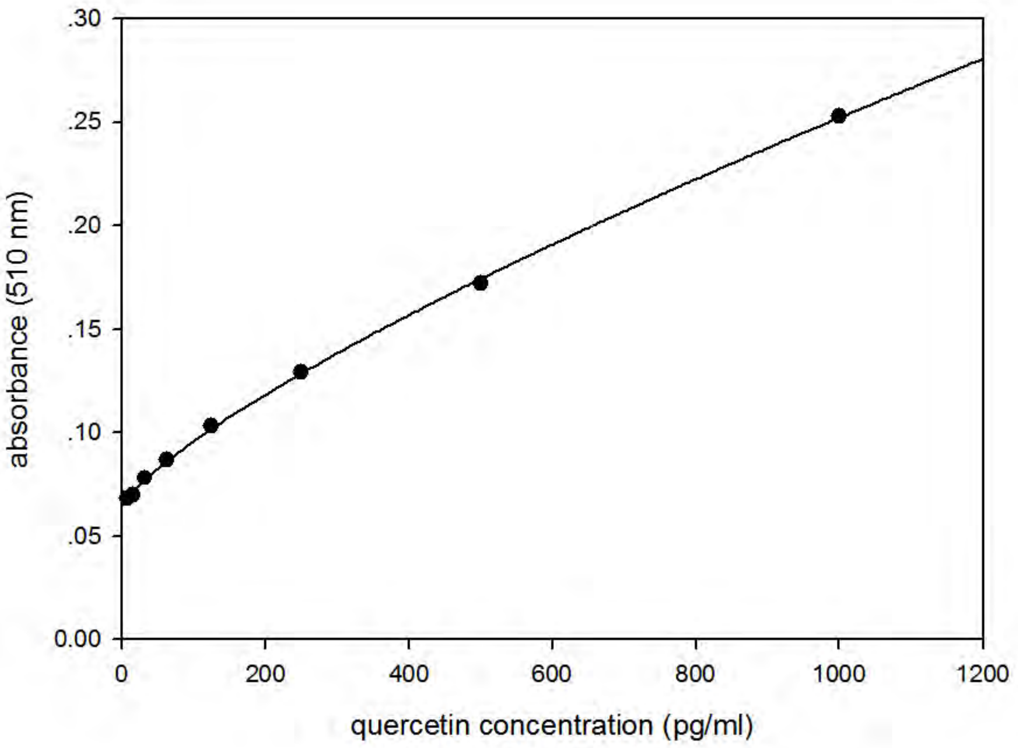
Herbarium Number : 013435 (BCU)

Collector Number : Jaturawat Paweenawongchai 1

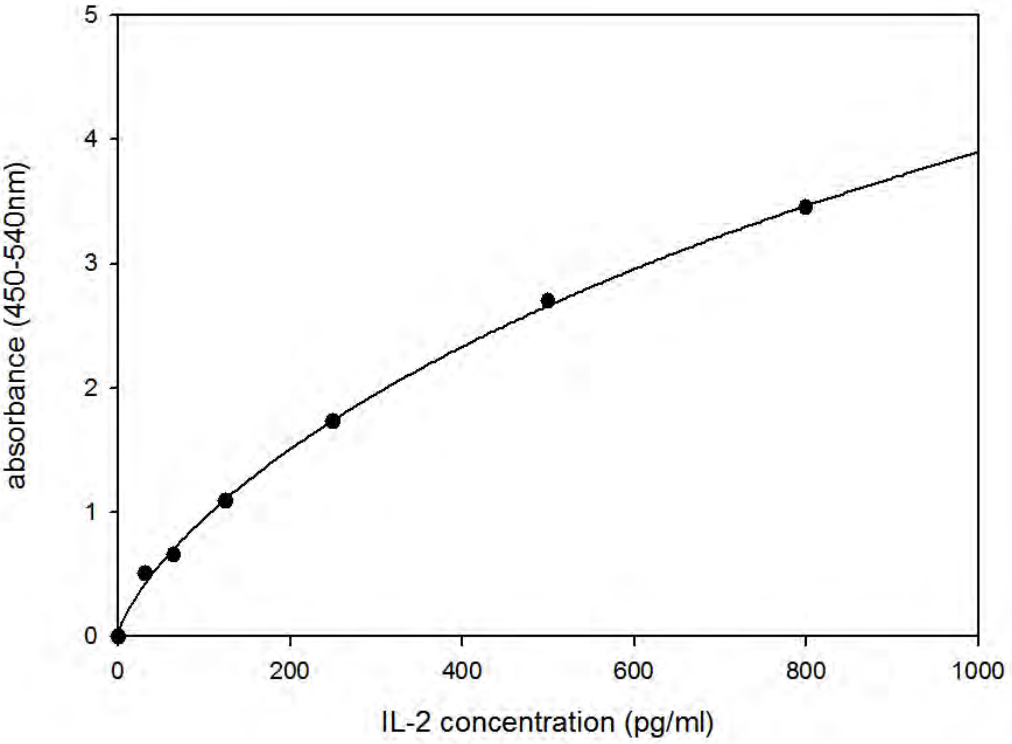
ค่าบริการ 200 บาท (=สองร้อยบาทถ้วน=)

ลงชื่อ [signature]
(ปริญญนุช กสินธ์อนันต์)
ผู้ให้บริการ

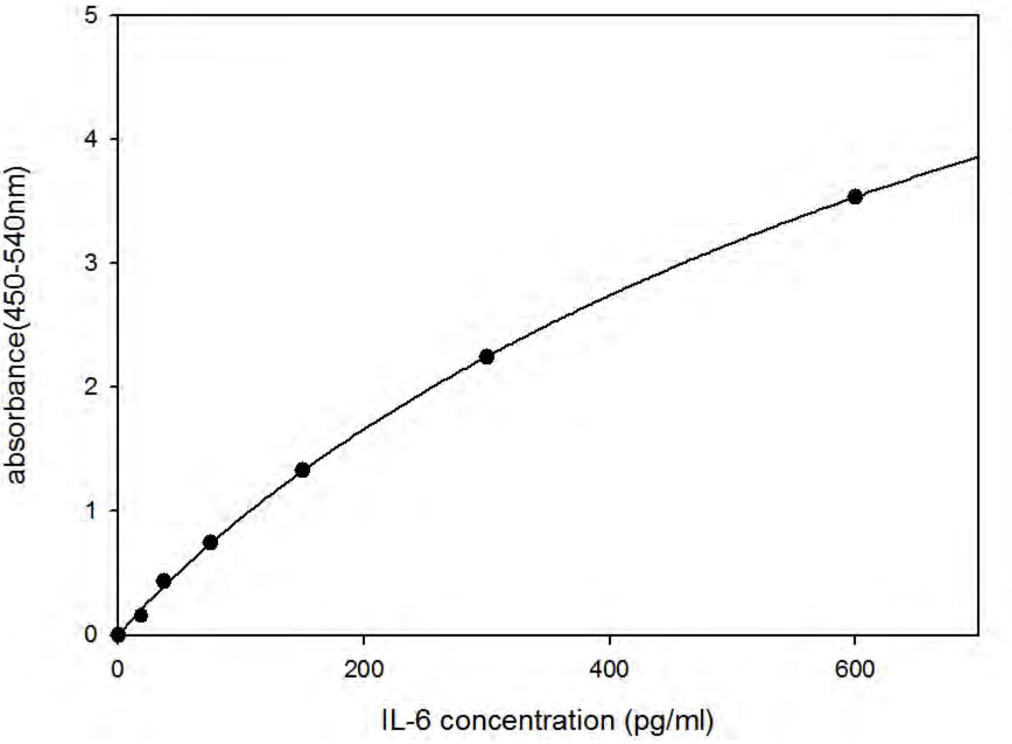
กราฟมาตรฐาน



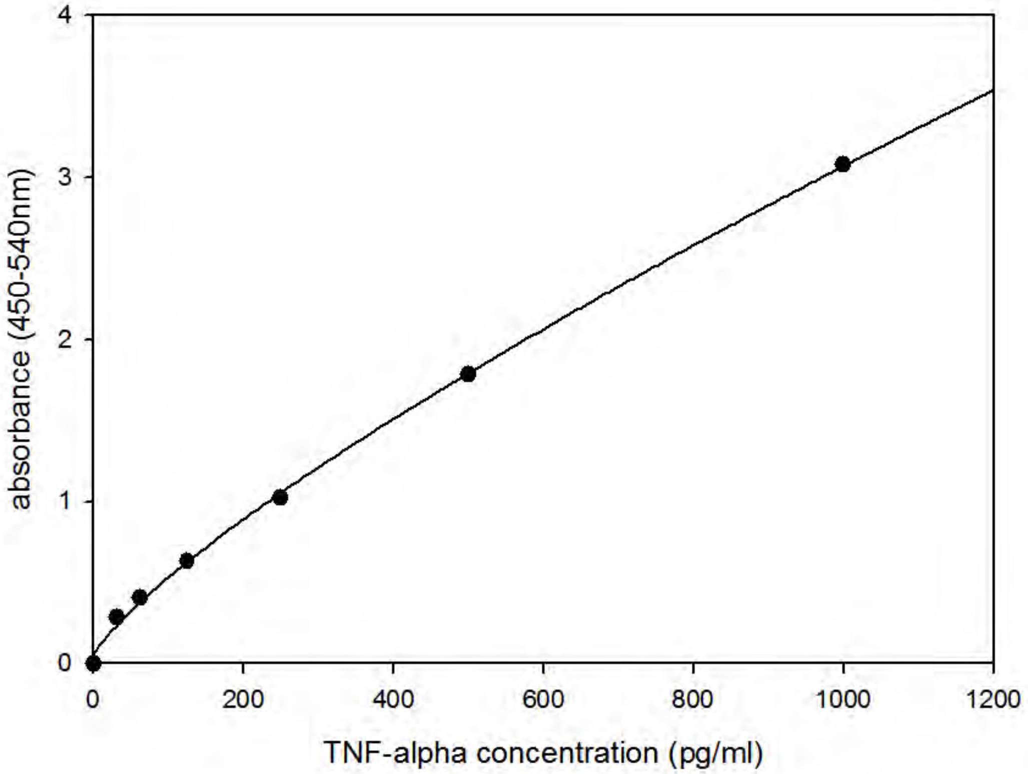
รูปที่ 47 กราฟมาตรฐานของ quercetin



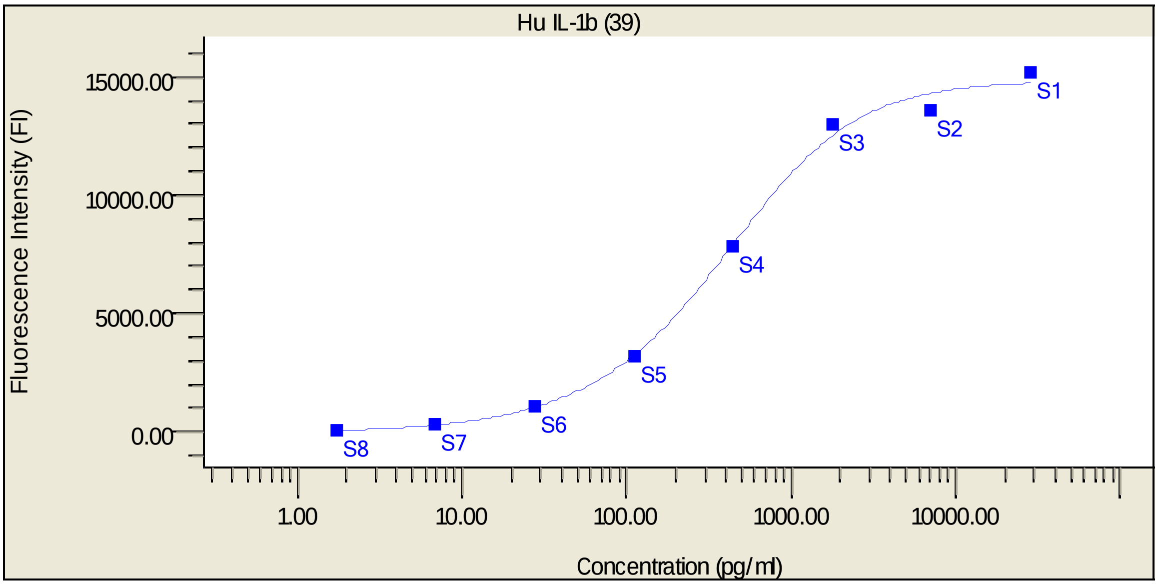
รูปที่ 48 กราฟมาตรฐานของ IL-2 วิธี ELISA



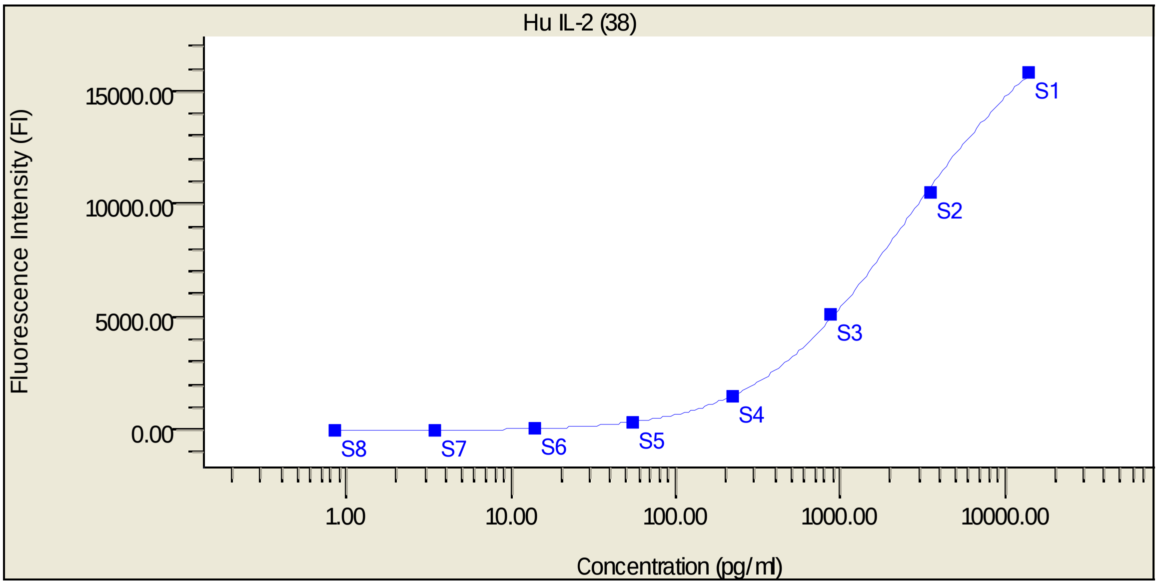
รูปที่ 49 กราฟมาตรฐานของ IL-6 วิธี ELISA



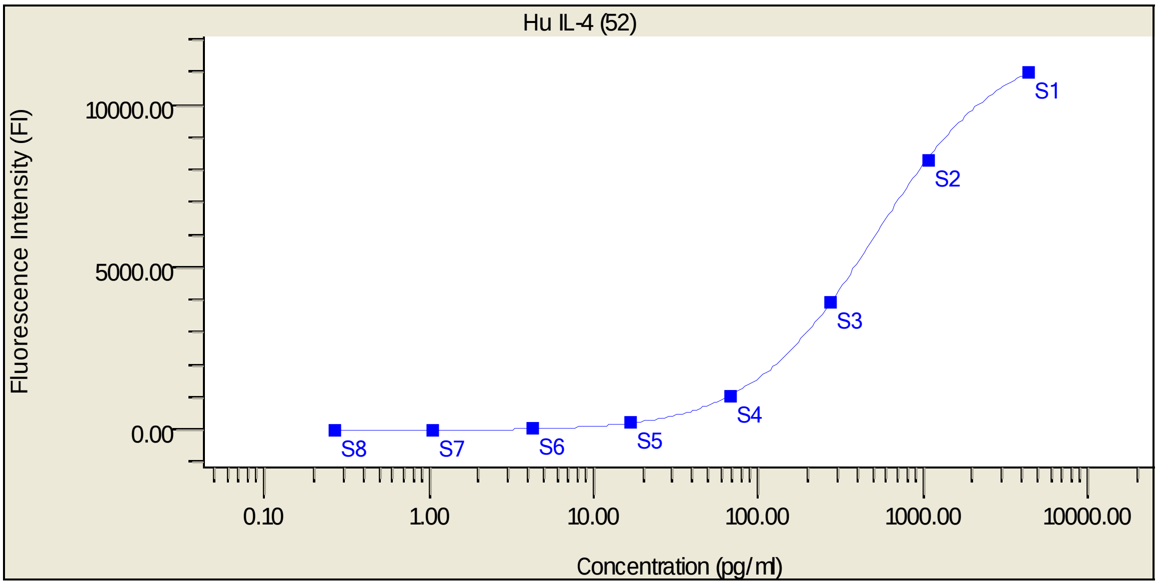
รูปที่ 50 กราฟมาตรฐานของ TNF-α วิธี ELISA



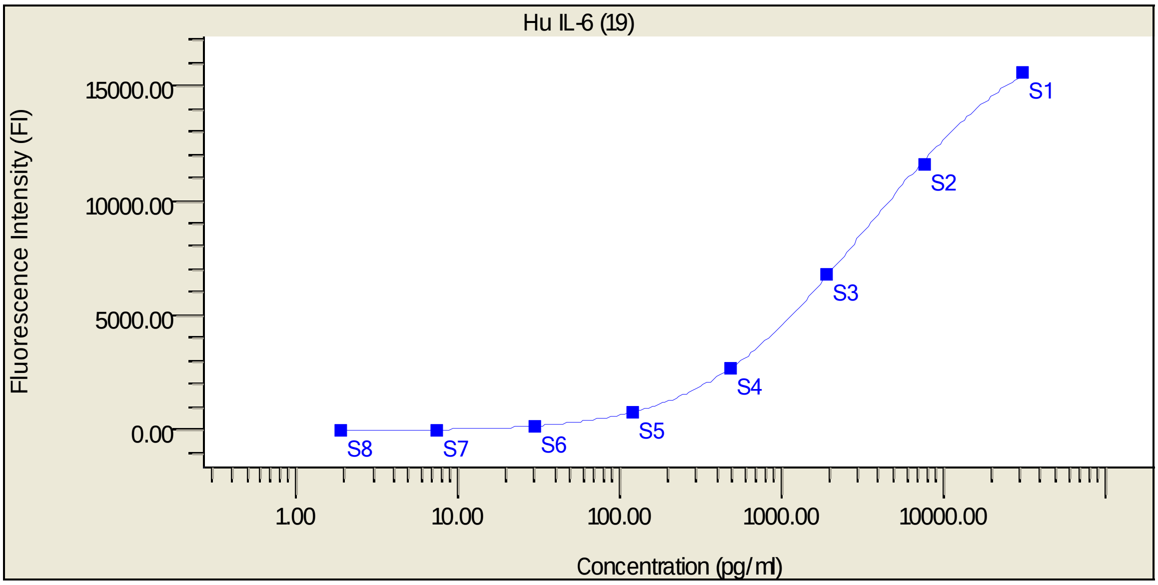
รูปที่ 51 กราฟมาตรฐานของ IL-1β วิธี Bio-Plex



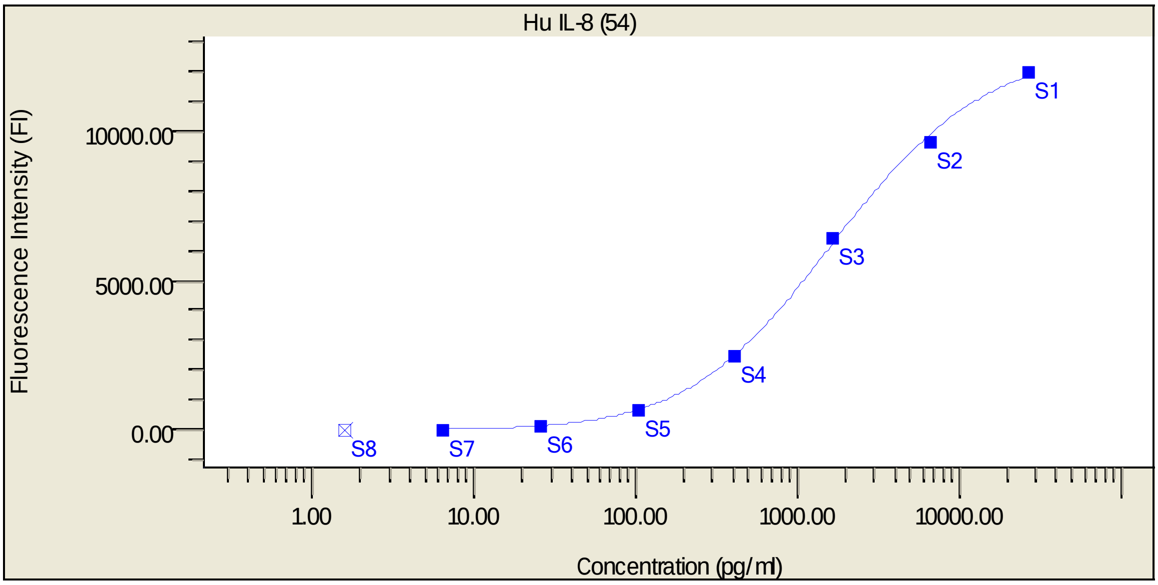
รูปที่ 52 กราฟมาตรฐานของ IL-2 วิธี Bio-Plex



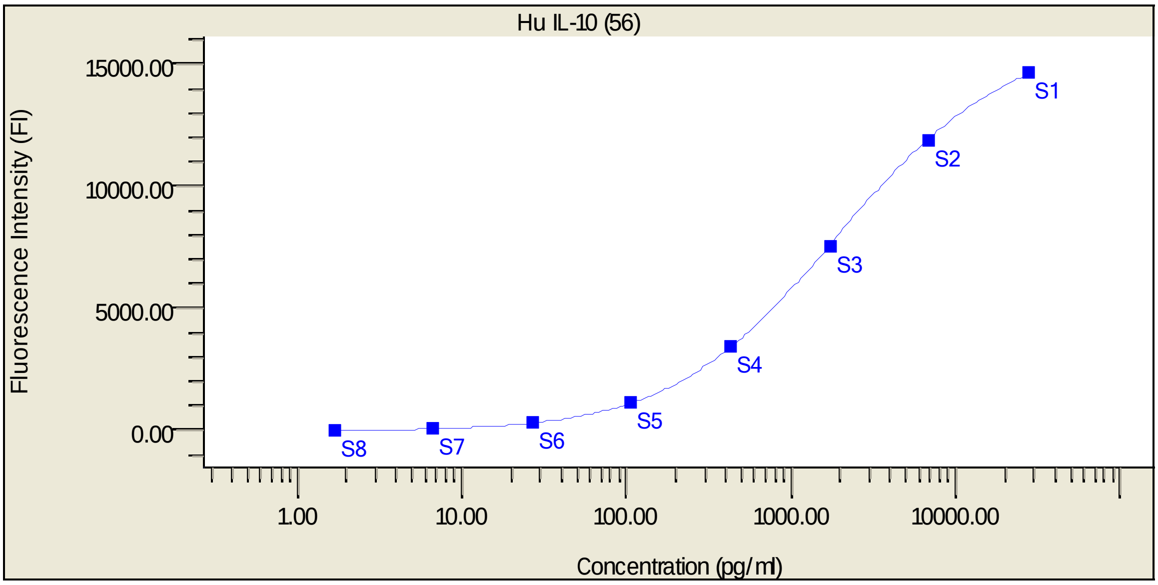
รูปที่ 53 กราฟมาตรฐานของ IL-4 วิธี Bio-Plex



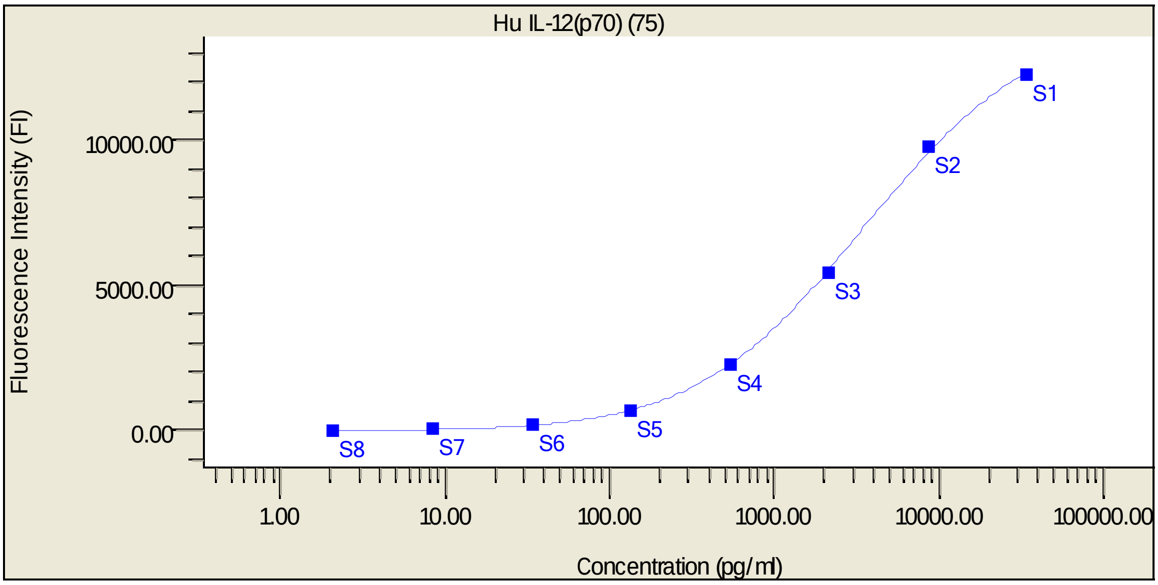
รูปที่ 54 กราฟมาตรฐานของ IL-6 วิธี Bio-Plex



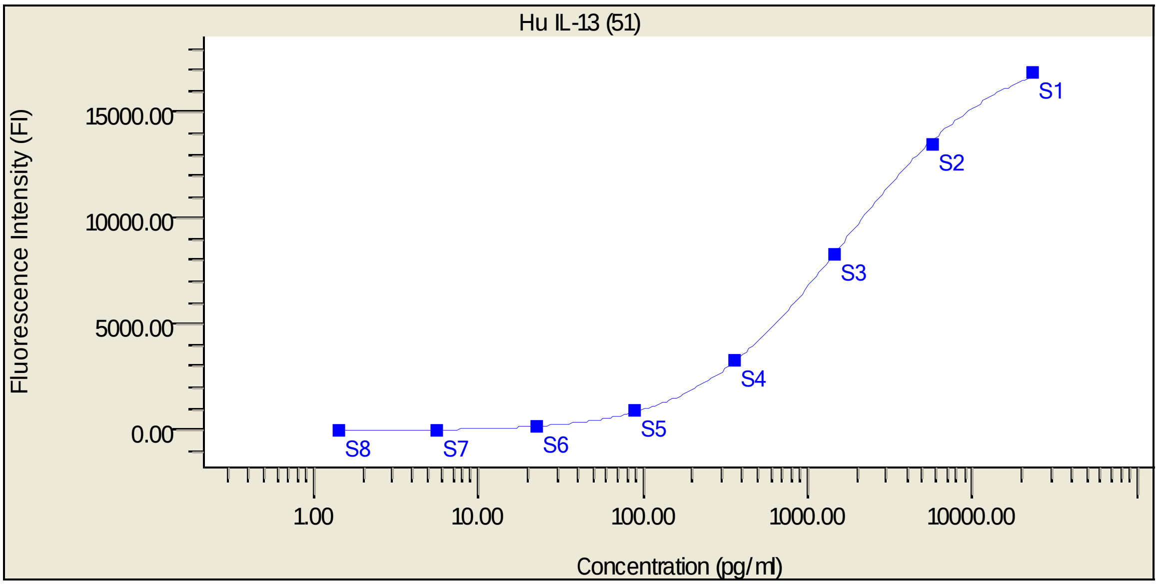
รูปที่ 55 กราฟมาตรฐานของ IL-8 วิธี Bio-Plex



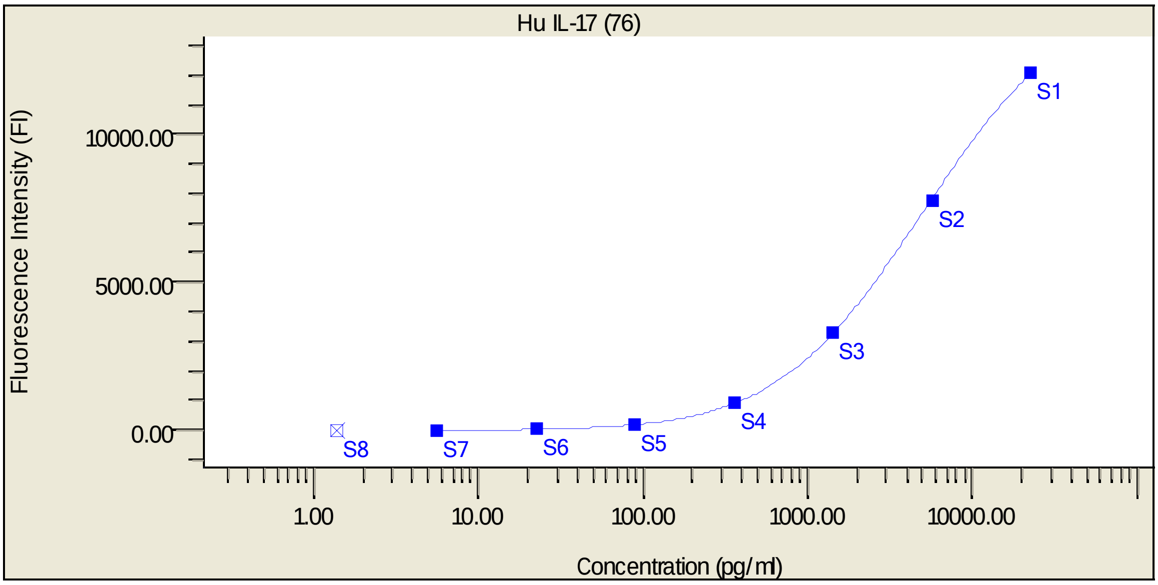
รูปที่ 56 กราฟมาตรฐานของ IL-10 วิธี Bio-Plex



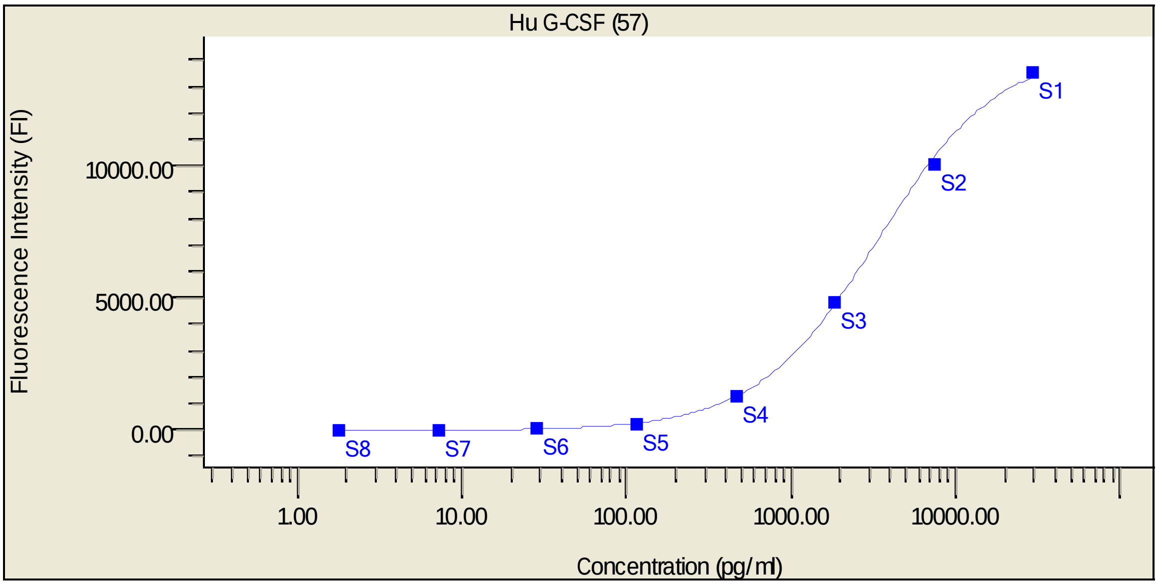
รูปที่ 57 กราฟมาตรฐานของ IL-12 วิธี Bio-Plex



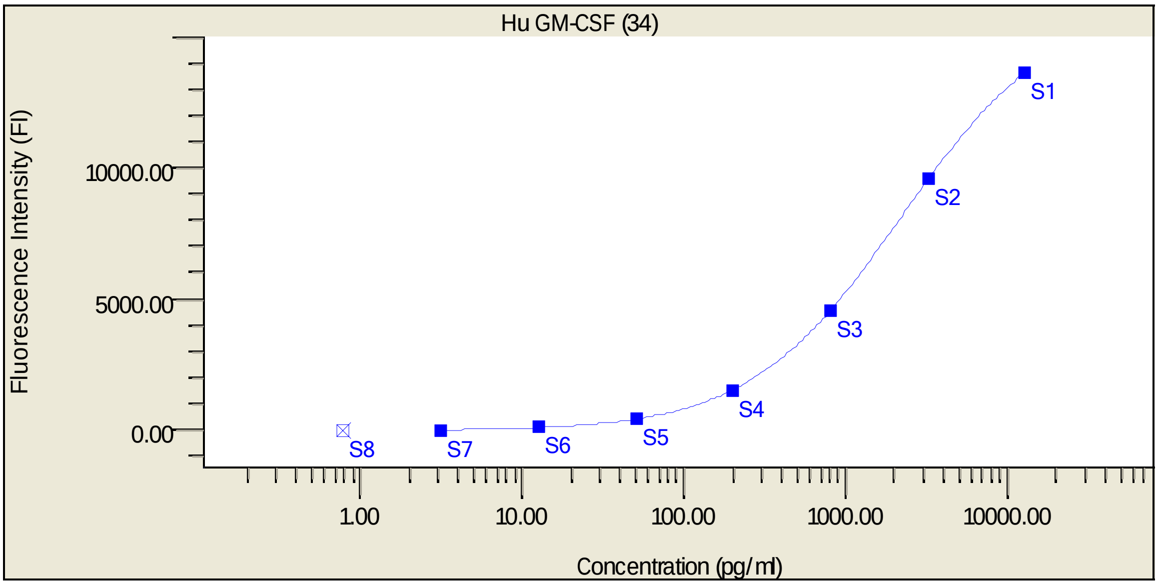
รูปที่ 58 กราฟมาตรฐานของ IL-13 วิธี Bio-Plex



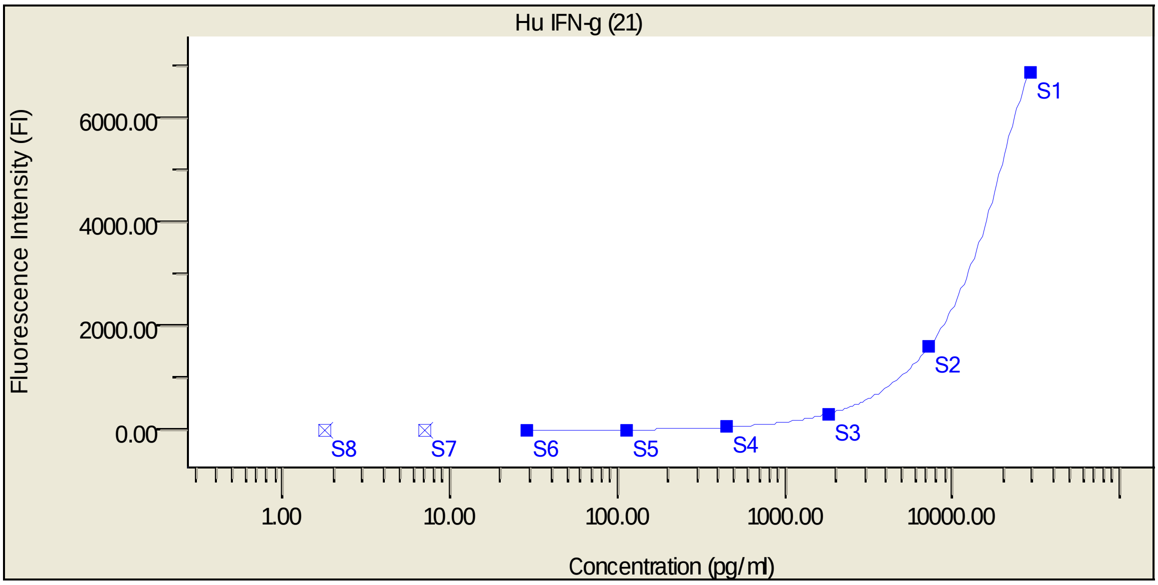
รูปที่ 59 กราฟมาตรฐานของ IL-17 วิธี Bio-Plex



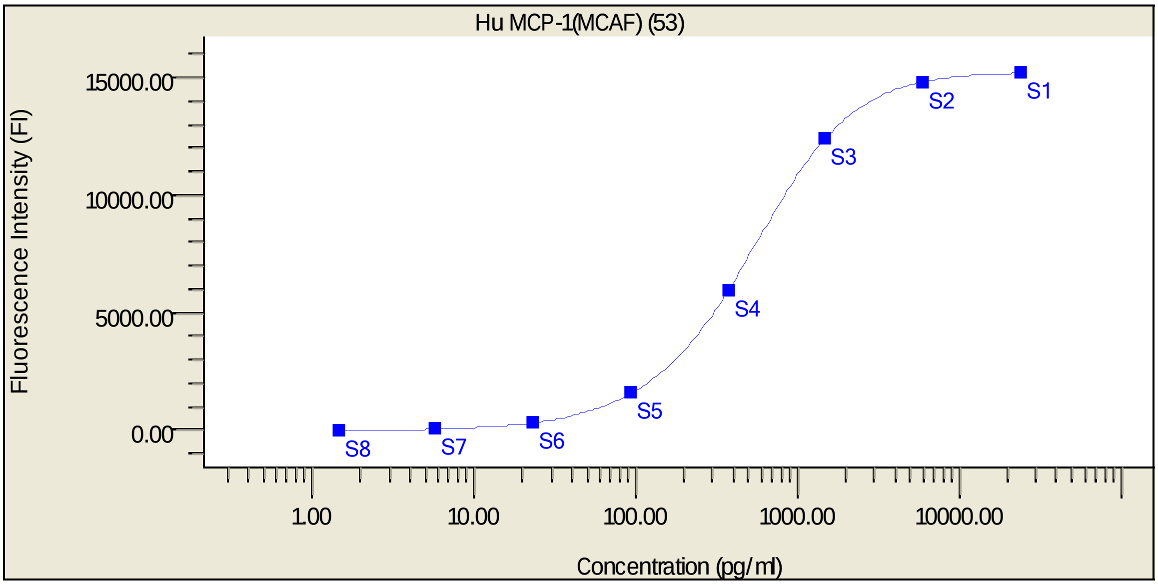
รูปที่ 60 กราฟมาตรฐานของ G-CSF วิธี Bio-Plex



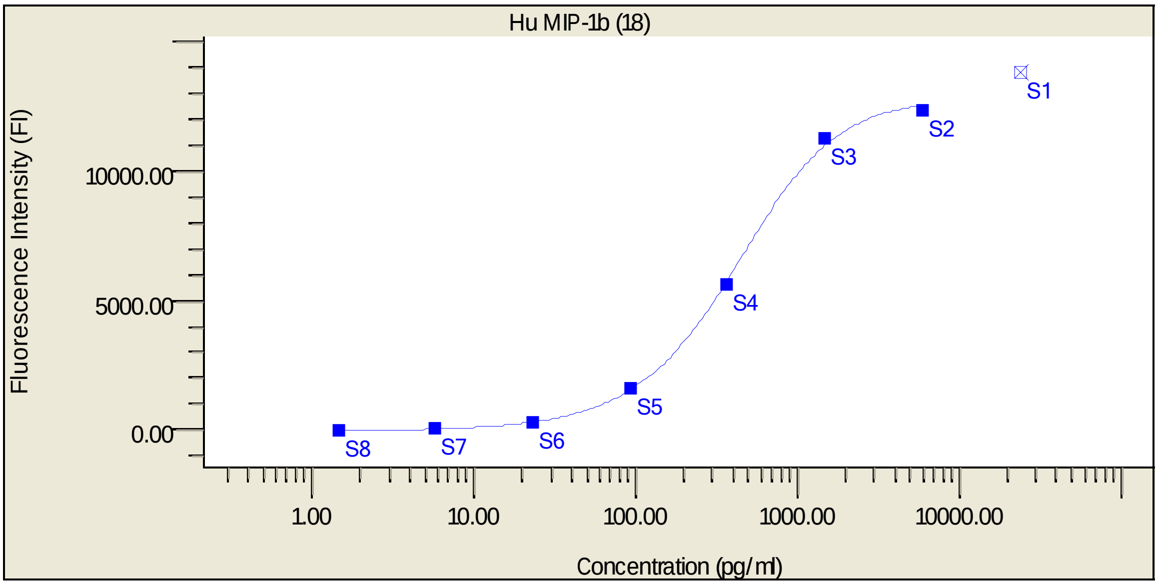
รูปที่ 61 กราฟมาตรฐานของ GM-CSF วิธี Bio-Plex



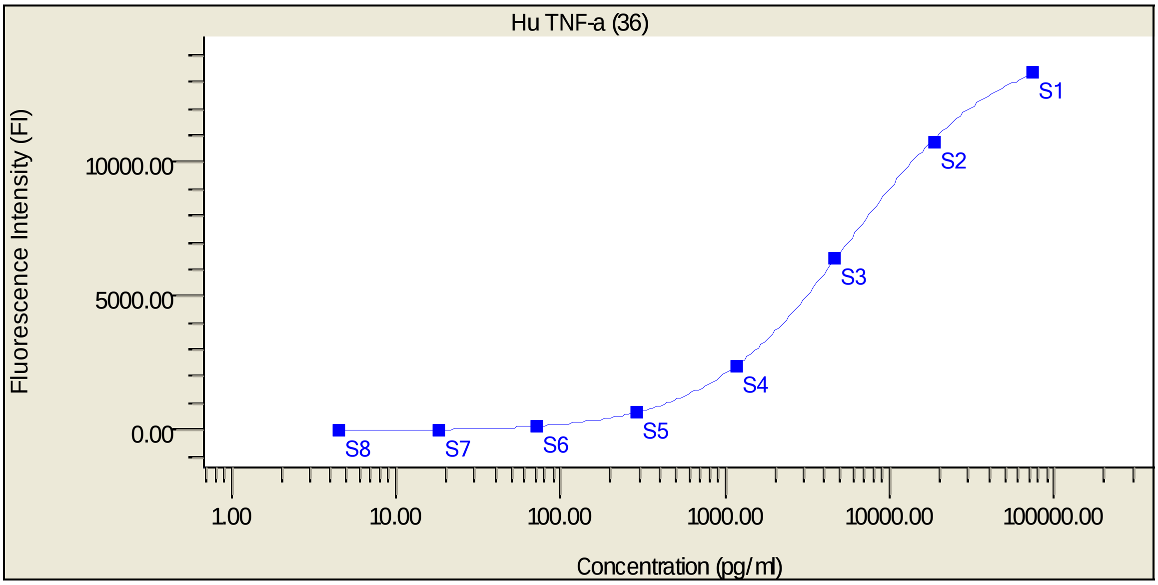
รูปที่ 62 กราฟมาตรฐานของ IFN-γ วิธี Bio-Plex



รูปที่ 63 กราฟมาตรฐานของ MCP-1 วิธี Bio-Plex



รูปที่ 64 กราฟมาตรฐานของ MIP-1β วิธี Bio-Plex



รูปที่ 65 กราฟมาตรฐานของ TNF-α วิธี Bio-Plex

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายจตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัยเกิดเมื่อวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนค่าลงทะเบียนเรียน และทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอน จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย