

ผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
ชนิด Molt-4



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effect of rutin on apoptotic induction mediated GSK3 β - signaling
in Molt-4 leukemia cells

Miss Boonyawee Nithithariyasophon



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่าน
สัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-
4

โดย

นางสาวบุญยวีร์ นิธิธารีย์โสภณ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ดร.สุพัตริศา ชาญประเสริฐ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวีตร เจนวนรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ดร.ศิริกัลยา ปริมสัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร.สุพัตริศา ชาญประเสริฐ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภคมน จิตประเสริฐ)

บุญยวีร์ นิธิธารีย์โสภณ : ผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 (Effect of rutin on apoptotic induction mediated GSK3 β - signaling in Molt-4 leukemia cells) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร.สุพนธิตรา ชาญประเสริฐ, 89 หน้า.

พลุกวายเป็นพืชพื้นถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทย มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ได้แก่ ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง และมะเร็งเม็ดเลือดขาว คณะวิจัยจึงได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดพลุกวพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 231.21 ± 4.19 mg QE/g dried *H.cordata* และได้ทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดพลุกวด้วยเทคนิค HPLC-MS พบว่ามีสัดส่วนของ isoquercetin 1.10 ± 0.03 , quercetin 0.34 ± 0.02 , hyperin 6.35 ± 0.41 และ rutin 0.88 ± 0.04 (%w/w) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งรูตินมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ยังมีการศึกษาวิจัยค่อนข้างน้อย คณะวิจัยจึงศึกษาผลของรูตินต่อการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี trypan blue exclusion พบว่าที่ $217.12 \mu\text{M}$ เป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ Molt-4 ตายลงครึ่งหนึ่ง และวิธี microscopic analysis พบรูปแบบการหดตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นรูปแบบการเกิดอะโพโทซิสใน Molt-4 ที่ $130 \mu\text{M}$ และเมื่อทดสอบการบ่มรูตินกับเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ารูตินสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโพลไซโตมิเตอร์ และทำการศึกษาผลของรูตินต่อการชักนำการเกิดอะโพโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β พบว่าทำให้ p-Ser9 GSK3 β สูงขึ้น และ GSK3 β ลดลง ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเกิดการยับยั้งของ GSK3 β (GSK3 β inhibition) และชักนำเซลล์มะเร็งเกิดการอะโพโทซิสได้ในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลเชิงลึกเพิ่มเติมต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

5676655637 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES

KEYWORDS:

BOONYAWEE NITHITHARIYASOPHON: Effect of rutin on apoptotic induction mediated GSK3 β - signaling in Molt-4 leukemia cells. ADVISOR: SUPANTITRA CHANPRASERT, Ph.D., 89 pp.

Houttuynia cordata Thunb (*H.cordata*), a local plant in Northern Thailand, has a wide range of biological activities such as anti-inflammatory, anti-leukemic and anti-cancer activities. We determined total flavonoids of *H.cordata* crude extract by aluminium chloride colorimetric assay. Total flavonoids content was 231.21 ± 4.19 mg QE/g dried *H.cordata*. We studied components of *H.cordata* crude extract by HPLC-MS. It consists of several components including isoquercetin 1.10 ± 0.03 , quercetin 0.34 ± 0.02 , hyperin 6.35 ± 0.41 and rutin 0.88 ± 0.04 (%w/w). Currently, there are few studies involving anti-leukemic activity of rutin. In this study, we aimed to investigate whether rutin has anti-leukemic effects and induce apoptosis mediated GSK3 β -signaling in Molt-4 (human acute T lymphoblastic cells). In cytotoxic testing, using trypan blue exclusion method, we found that rutin inhibited Molt-4 cell growth with IC₅₀ values of 217.12 μ M. Also, by microscopic analysis, blebbing pattern of cell apoptosis was found in cells treated with rutin (130 μ M) for 48 h. In order to confirm apoptotic activity we found that rutin induced Molt-4 cell death through apoptosis at 48 h after analyzed by flow cytometry. Furthermore, the pro-apoptotic effects of rutin involved the decrease of GSK3 β and the increase of inactive GSK3 β (p-Ser9) by Western blot analysis. In conclusion, these results indicated that rutin has anti-leukemic activity and apoptotic induction mediated GSK3 β - signaling in Molt-4 leukemia cells.

Department: Clinical Microscopy

Student's Signature

Field of Study: Clinical Hematology
Sciences

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี จากความกรุณาของ อาจารย์ ดร. สุพนัธิตรา ชาญ ประเสริฐ ที่ท่านได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมไปถึงการให้วิชาความรู้ มุมมอง คำแนะนำในการ ทำวิจัย การแก้ปัญหา ตลอดจนการให้กำลังใจเมื่อพบกับความท้อถอยและอุปสรรคในชีวิต

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา บริมสัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล และผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.ภคมน จิตประเสริฐ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ใน ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2556 ที่ ได้มอบทุนอุดหนุนการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัย ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 29 ครั้งที่ 4 และทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบทุนอุดหนุนในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์พัฒนาและวิจัยทางโลหิตวิทยา ระดับโมเลกุล จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยและภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ และอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณทุกกำลังใจ และมิตรภาพ ในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย ที่ได้ให้กำลังใจยามเหนื่อยล้า หรือเมื่อต้องเจอกับ ปัญหาและอุปสรรคต่างๆ เป็นแรงผลักดันที่ทำให้สามารถก้าวเดินต่อไป และประสบความสำเร็จ ได้ในวันนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	52
รายการอ้างอิง	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	89

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1	
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2	
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว: การแบ่งประเภท สาเหตุ อากาการ การรักษา.....	4
พลูควา.....	20
ฟลาโวนอยด์.....	21
ฟลาโวนอล: เคออสิติน รูติน.....	23
การตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส (apoptosis).....	25
วิถีสัญญาณวินท์ (WNT signaling).....	27
สัญญาณ GSK3 β	29

บทที่	หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....32
	กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ.....32
	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....33
	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....36
	วิธีการวิจัย.....38
	การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว.....38
	การตรวจวิเคราะห์หองค์ประกอบสารสกัดพลูคาว.....39
	การเตรียมสารรูติน.....40
	อะเลียงการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพ.....40
	การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของรูตินในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงด้วยวิธี trypan blue exclusion method.....40
	การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของรูตินในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงด้วยวิธี microscopic analysis.....42
	การตรวจการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ด้วยเทคนิค flow cytometry.....43
	การตรวจการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี Western blot analysis.....45
	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....51
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....52
	ผลการตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว.....52
	ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดพลูคาว.....53

บทที่	หน้า
4 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินในการยับยั้งการเจริญของมะเร็ง เม็ดเลือดขาวด้วยวิธี trypan blue exclusion method.....	54
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินในการยับยั้งการเจริญของมะเร็ง เม็ดเลือดขาวด้วยวิธี microscopic analysis.	56
ผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ด้วยเทคนิค flow cytometry.....	57
ผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ด้วยวิธี Western blot analysis.....	60
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	64
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	64
ข้อเสนอแนะ.....	69
รายการอ้างอิง.....	70
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแบ่งชนิดของ ALL ตาม FAB Classification.....	13
2	การแบ่งชนิดของ ALL ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปีค.ศ. 2008)WHO classification(.....	14
3	การแบ่งชนิดของสารพลาไวโนอยด์.....	22
4	ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจล.....	47
5	Primary antibodies ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	50
6	ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพลาไวโนอยด์ในสารสกัดพลูควา ด้วยเทคนิค HPLC-MS.....	53
7	% Cell viability ของ Molt-4 cells เมื่อทดสอบกับรูตินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion.....	84

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	อัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุของมะเร็งแต่ละชนิดในเพศชาย ประเทศไทย ค.ศ.2008.....5
2	อัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุของมะเร็งแต่ละชนิดในเพศหญิง ประเทศไทย ค.ศ.2008.....6
3	อัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุของมะเร็งเม็ดเลือดขาวจำแนกตามเพศ และจังหวัดที่มีการจัดทำทะเบียนมะเร็ง ค.ศ. 2008.....7
4	การจำแนกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเพศชาย ตามแต่ละจังหวัดในประเทศไทย.....8
5	การจำแนกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเพศหญิง ตามแต่ละจังหวัดในประเทศไทย.....9
6	ลักษณะของ Peripheral blood smear ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL.....12
7	ลักษณะของ Philadelphia chromosome ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีน ABL บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ไป เชื่อมต่อกับยีน BCR บนโครโมโซมคู่ที่ 22.....18
8	ลักษณะของต้นพลุควา.....20
9	โครงสร้างของ Quercetin.....23
10	โครงสร้างของ Rutin.....24
11	วิถีสัญญาณอะพอโทซิส.....26
12	การควบคุมการเจริญของ T cells โดยวิถีสัญญาณวินท์.....27
13	สัญญาณวินท์)WNT signaling(ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นในเซลล์ปกติ.....28
14	โครงสร้างของ Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β).....30
15	วิถีสัญญาณอะพอโทซิสภายใน)intrinsic apoptotic pathway(.....31
16	สารสกัดพลุควาที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์.....32
17	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Molt-4.....33

ภาพที่	หน้า
18	การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS.....39
19	ช่องตารางสำหรับตรวจนับเซลล์ของ Hemocytometer Cell Counting Chamber..... 42
20	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระยะ early และ late apoptosis.....44
21	บริเวณเซลล์ในแต่ละระยะอะพอโทซิส เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยโพลไซโตมิเตอร์.....45
22	ลักษณะการประกบของtransfer sandwich.....48
23	ผลการคำนวณค่าIC ₅₀ ของรูติน ภายหลังจากการทดสอบ Molt-454
24	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt-4 ต่อ % cell viability ของเซลล์ Molt-4 ด้วยวิธี trypan blue exclusion method.....55
25	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรูตินในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ด เลือดขาว Molt-4 ด้วยวิธี microscopic analysis.....56
26	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรูติน ต่อการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์ Molt-4 ด้วยเทคนิค flow cytometry58
27	กราฟแสดงผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณ apoptotic cells ในระยะต่างๆ.....61
28	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรูตินต่อการแสดงออกของโปรตีน GSK3 β หลังจากทดสอบ Molt-4 ด้วยรูติน และนำมาวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis.....63
29	แผนภูมิแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และบทบาทของรูตินต่อการชักนำการตายแบบ อะพอโทซิส และการยับยั้ง pro-survival pathway ในสัญญาณ GSK3 β68
30	ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของรูติน ต่อเซลล์ Molt-4 โดยวิธี XTT assay.....81
31	กราฟแสดงความเข้มข้นต่างๆของสารรูติน และ% cell viability ของเซลล์ Molt-4 เมื่อทำการทดสอบผลของสารรูตินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์.....82

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยทั้งไทยและต่างประเทศเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวกันสูงขึ้น โดยในประเทศไทยพบว่าอัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุ (age standardized incidence rate, ASR) ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเพศชายเท่ากับ 3.9 รายต่อประชากร 100,000 ราย และในเพศหญิงเท่ากับ 3.2 รายต่อประชากร 100,000 ราย และมีอัตราการตายจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวประมาณ 2.7 ถึง 3.0 ราย ต่อประชากร 100,000 ราย โดยเพศชายมีอัตราการตายมากกว่าเพศหญิง ส่วนอัตราการรอดชีวิตพบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายมัยอีลอยด์ (Acute myelocytic leukemia, AML) (มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตตั้งแต่ 3.45-10.34 เดือน ขณะที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมโฟยด์ (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) (มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตต่ำกว่า โดยมีค่าอยู่ที่ 2.18-8.34 เดือน ทั้งนี้ขึ้นกับการรักษาและการเข้าถึงบริการทางการแพทย์ (1)

ทั้งนี้การใช้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) (เป็นวิธีที่ใช้รักษามะเร็งเม็ดเลือดขาววิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่ง (2) แต่ได้ผลกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ยาเคมีบำบัดยังไม่สามารถไปถึงบางอวัยวะ เช่น สมอง และไขสันหลังได้ จึงมีการใช้รังสีรักษา (Radiotherapy) (ร่วมกับการใช้ยาเคมีบำบัด แต่การรักษาด้วย 2 วิธีนี้มีผลข้างเคียงกับผู้ป่วย คือ มีผลกระทบกับเซลล์ปกติของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว และหลังการรักษาอาจทำให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ภายหลังจากโรคสงบและหยุดยา (3) และนอกจาก 2 วิธีนี้ อาจทำการปลูกถ่ายไขกระดูก (Bone marrow transplantation) เพื่อช่วยให้ผู้ป่วย (โดยจะต้องใช้ไขกระดูกหายขาดจากโรคมามากขึ้น แต่กระบวนการที่ทำความซับซ้อนและต้องใช้เวลา โที่เข้ากันได้กับผู้ป่วยเท่านั้น และยังอาจเกิดโรคแทรกซ้อนได้สูง เพราะต้องมีการกดภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยไว้ ดังนั้นการนำการรักษาทางเลือก (Alternative medicine) มาใช้ควบคู่กับการรักษาผู้ป่วย (พัฒนาแนวทางการรักษาจากสารซึ่งเป็นแผนปัจจุบัน คือการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษา และเพื่อองค์ประกอบหลักของสมุนไพรใช้ในการรักษาหรือร่วมรักษา ช่วยให้ผู้ป่วยมีการหายขาดของโรคดีขึ้น และ อาจทำให้ผู้ป่วยได้รับผลข้างเคียงจากยาลดลง (4)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่ได้จากพลูควาว ซึ่งคณะผู้วิจัยได้มีการสกัดก่อนหน้านี้ (5) ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (HPLC-MS) และพบว่ารูตินเป็น (1 ในองค์ประกอบหลักของสารสกัดพลูควาว

โดยพบมากเป็นลำดับที่ 3 แต่สืบเนื่องมาจากการศึกษาเกี่ยวกับสารรูตินและการศึกษาวิจัยในเชิงลึกเกี่ยวกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้นำรูตินมาทดสอบ เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเจริญเติบโตของมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยมุ่งเน้นในด้านการลดการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และศึกษาความเกี่ยวข้องของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวผ่านทางสัญญาณ GSK3 β ซึ่งหากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ จะนำมาซึ่งการพัฒนาองค์ความรู้ของพืชสมุนไพรไทยและนำมาใช้ร่วมรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์และประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่ได้จากพลูควา ด้วยเทคนิค HPLC-MS
2. เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ของรูตินในการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ (ALL) (หรือ Molt-4 cells)
3. เพื่อศึกษาบทบาทของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ ผ่านสัญญาณ GSK3 β

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ด้วยเทคนิค Aluminium chloride colorimetric assay และทำการศึกษาองค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์หลักในสารสกัดหยาบจากพลูควาด้วยเทคนิค HPLC-MS ศึกษาฤทธิ์ของรูตินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt-4 เป็นต้นแบบในการศึกษา โดยจะประเมินจากการตรวจลักษณะของเซลล์ และการลดลงของปริมาณของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง ด้วยวิธี trypan blue exclusion method และ microscopic analysis ตรวจวัดการเกิดอะพอโทซิสโดยการย้อมด้วย Annexin V และ Propidium iodide (PI) และตรวจวัดด้วยเครื่องโพลไซโตมิเตอร์ รวมทั้งศึกษาบทบาทของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง โดยวิธี Western blot analysis

ข้อจำกัดของการวิจัย

) เร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในเซลล์มะ*in vitro* model(ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง)*in vivo* model(เพื่อให้มีความใกล้เคียงกับภาวะจริงมากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.ทราบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และองค์ประกอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลักในสารสกัดหยาดพุดขาว
2. ทราบถึงบทบาทและกลไกของรูตินในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
3. สารรูตินสามารถนำมาช่วยรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว
4. สร้างองค์ความรู้ใหม่ในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลมฟอยด์ และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชสมุนไพรในด้านของการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

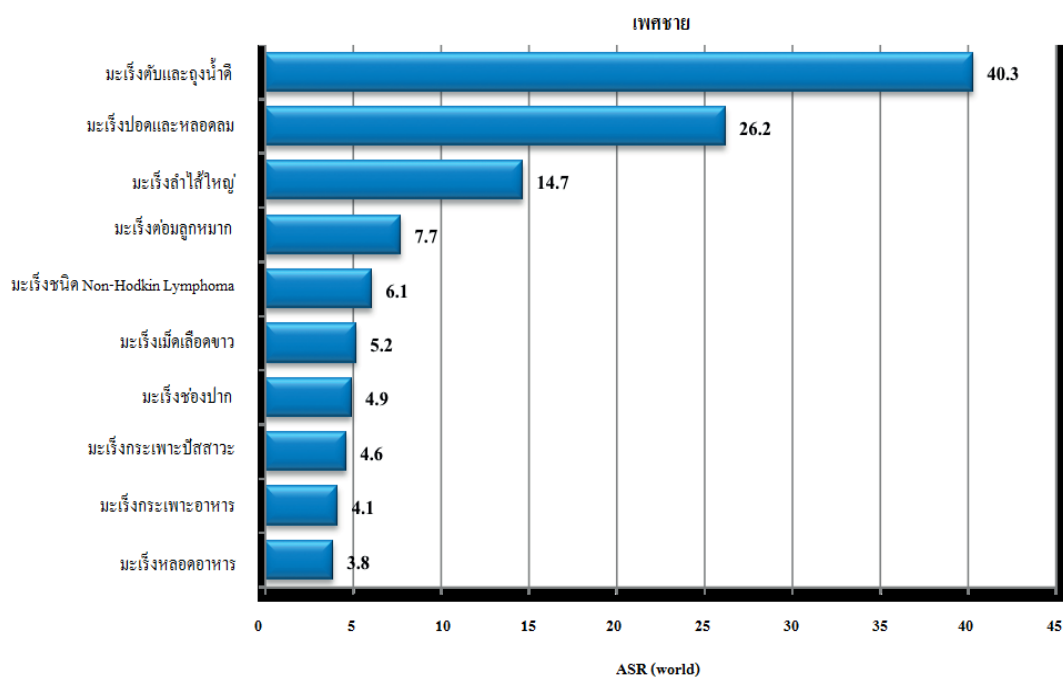
โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว 6), 7(

มะเร็งเม็ดเลือดขาว)Leukemia (คือ มะเร็งทางระบบโลหิตวิทยา ที่เกิดความผิดปกติของกระบวนการและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด)hematopoiesisทั้งในการสร้างหรือ (เพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน)blast cell) หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวแก่ (mature leukocytes () สูงผิดปกติ โดยสามารถเกิดได้ทั้งไขกระดูกbone marrow) และในกระแสโลหิต (peripheral blood(8) (

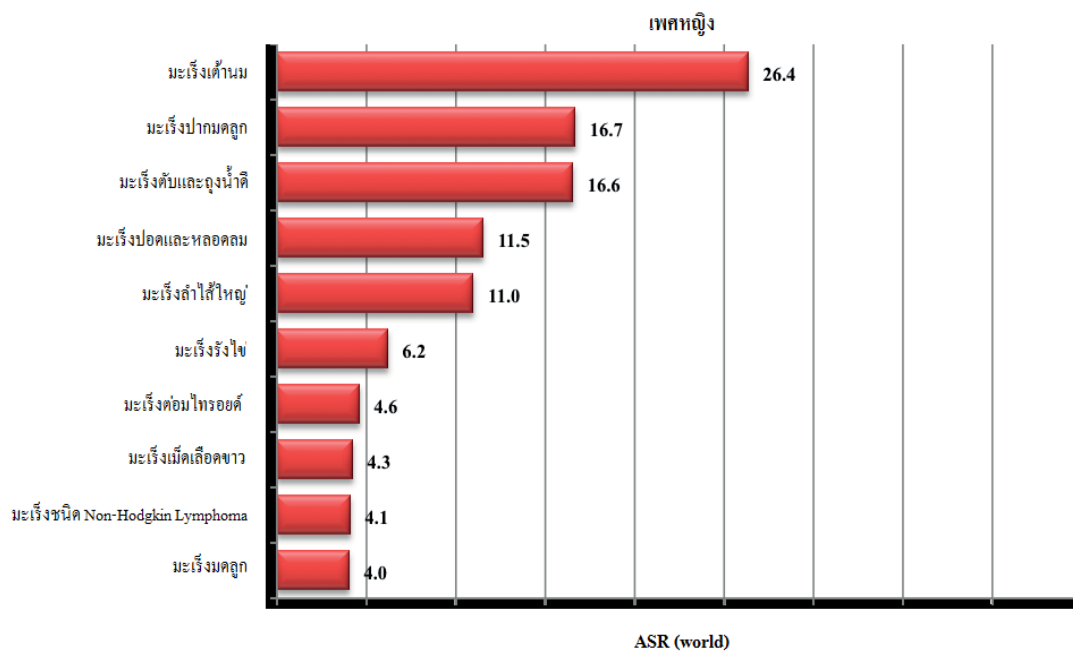
อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว 1), 9(

การประมาณการของ International Agency for Research on Cancer)IARC(พบมะเร็งเม็ดเลือดขาวคิดเป็นร้อยละ 3 ของมะเร็งทั้งหมด โดยในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 255,932 ราย ซึ่งอุบัติการณ์การเกิดของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั่วโลก มีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ โดยมีอัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุ)age standardized incidence rate, ASR(โดยประเทศในแถบยุโรปตะวันตก และประเทศสหรัฐอเมริกา มีอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงกว่าภูมิภาคอื่นๆ โดยในปีค.ศ.2015 ประเทศสหรัฐอเมริกา มีการประมาณการถึงจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่ป่วยด้วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวสายลิมโฟด์ชนิดเฉียบพลัน)ALL(ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ประมาณ 6,250 คน โดยแบ่งเป็นเพศชาย 3,100 คน และเพศหญิง 3,150 คน และมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคนี้อีกประมาณ 1,450 คน จากผู้ป่วย ALL ทั้งหมด โดยแบ่งเป็นเพศชาย 800 คน และเพศหญิง 650 คน โดยความเสี่ยงต่อการเป็นโรคพบว่ามีความเสี่ยงสูงในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ทั้งนี้พบสถิติความเสี่ยงลดลงเมื่ออายุ 20 ปี และจะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากที่อายุ 50 ปี ความเสี่ยงในการเป็นโรคALL จาก 1 ใน 750 คน โดยพบความเสี่ยงในเพศชายสูงกว่าเพศหญิง และในคนผิวขาวสูงกว่าคนผิวดำ (1)

สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นลำดับที่ 6 รองจากมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Non-Hodkin ในเพศชาย ดังแสดงในภาพที่ 1 และลำดับที่ 8 รองจากมะเร็งต่อมไทรอยด์ ในเพศหญิง ดังแสดงในภาพที่ 2

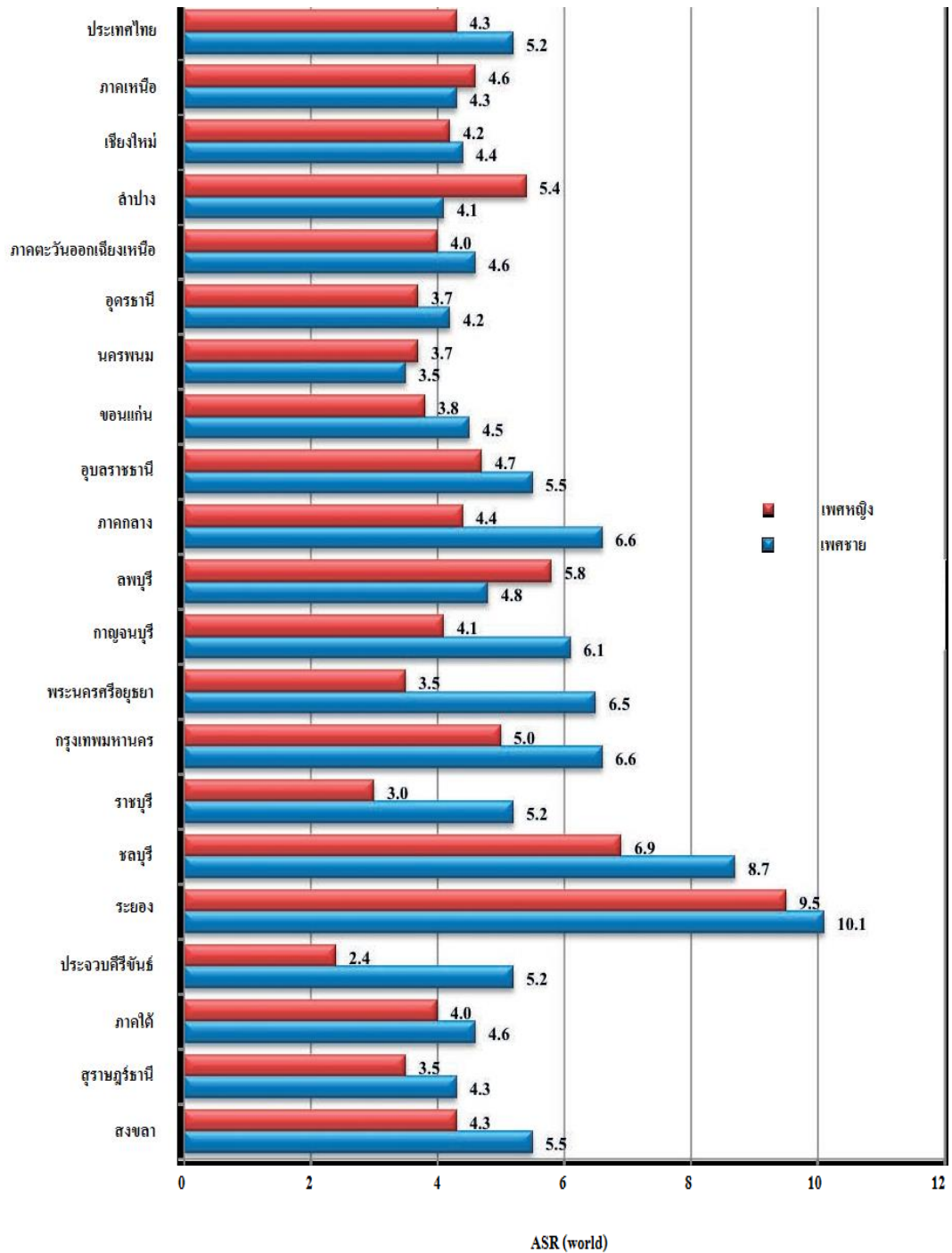


ภาพที่ 1 อัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุของมะเร็งแต่ละชนิดในเพศชาย
ประเทศไทย ค.ศ.2008(9)



ภาพที่ 2 อัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุของมะเร็งแต่ละชนิดในเทศบาลเมือง
ประเทศไทย ค.ศ.2008 (9)

และเมื่อจำแนกตามเพศและจังหวัดในประเทศไทย พบว่าจังหวัดที่พบผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือด
ขาวมาก เป็น 3 ลำดับแรกจากมากไปน้อย ได้แก่ ระยอง ชลบุรี และ กรุงเทพมหานคร ตามลำดับ
ดังแสดงในภาพที่ 3

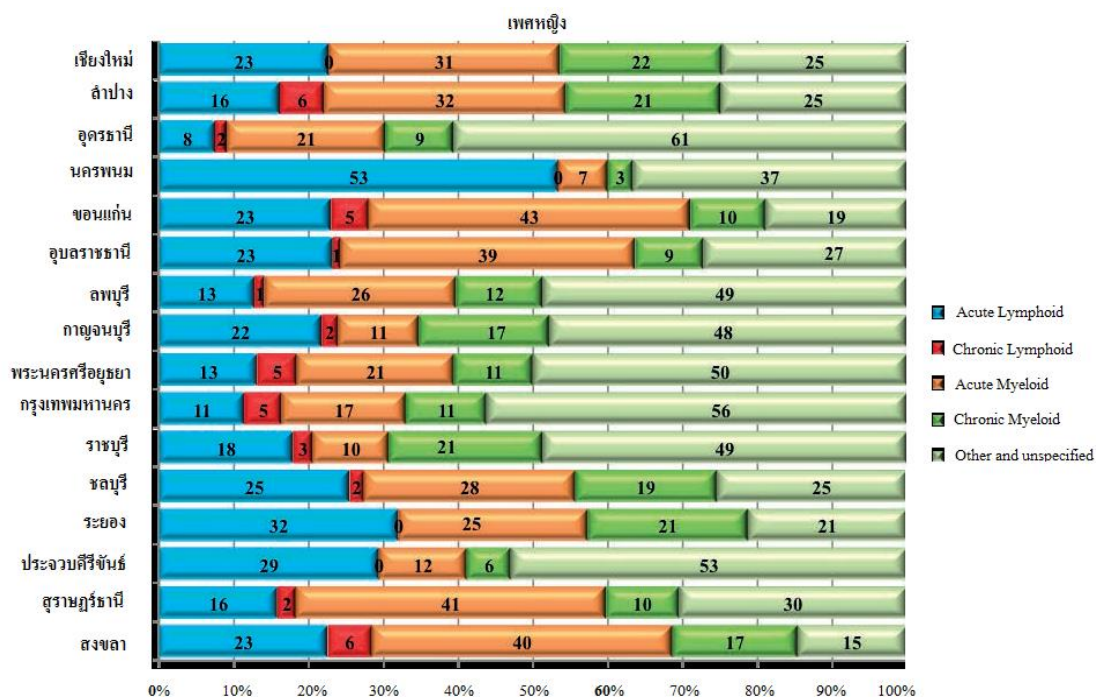


ภาพที่ 3 อัตราอุบัติการณ์ปรับตามมาตรฐานอายุของมะเร็งเม็ดเลือดขาวจำแนกตามเพศและจังหวัดที่มีการจัดทำทะเบียนมะเร็ง ค.ศ. 2008(9)

เมื่อจำแนกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามแต่ละจังหวัดในประเทศไทย สามารถจำแนกได้ดังภาพที่ 4 ในเพศชาย และภาพที่ 5 ในเพศหญิง จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายมัยอีลอยด์ สามารถพบได้สูงพอกัน ซึ่งขึ้นกับแต่ละจังหวัดในประเทศไทย และเมื่อจำแนกมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามชนิดของเซลล์และระยะเวลาในการเกิดโรค พบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายมัยอีลอยด์ (Acute myelocytic leukemia, AML) เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่พบได้บ่อยที่สุดในผู้ใหญ่ ส่วนมะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ชนิดเรื้อรัง (Chronic myelocytic leukemia) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวสายลิมฟอยด์ชนิดเรื้อรัง (Chronic lymphocytic leukemia) พบบ่อยที่สุดในผู้ใหญ่วัยกลางคน และผู้สูงอายุ ในขณะที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) (มีอุบัติการณ์สูงในวัยเด็ก โดยเฉพาะช่วงอายุน้อยกว่า 10 ปี ส่วนผู้ใหญ่พบอุบัติการณ์สูงสุดที่อายุมากกว่า 65 ปี และในเพศชายพบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวสายลิมฟอยด์พบบ่อยกว่าสายมัยอีลอยด์ (9)



ภาพที่ 4 การจำแนกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเพศชาย ตามแต่ละจังหวัดในประเทศไทย (9)



ภาพที่ 5 การจำแนกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเพศหญิงตามแต่ละจังหวัดในประเทศไทย

(9)

สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

สาเหตุที่แท้จริงของมะเร็งเม็ดเลือดขาวยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เมื่อทำการศึกษาและหาความสัมพันธ์ต่างๆแล้ว อาจทำให้สรุปได้ดังต่อไปนี้ คือ

1. สารก่อมะเร็ง (Chemical carcinogen) คือ สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนและข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ รวมถึงยาเคมีบำบัด เช่น benzene, melphalan และ ethylene oxide เป็นต้น
2. สารรังสี (Ionizing radiation) มีบทบาททำให้สารพันธุกรรม คือ DNA แตกหักซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในระหว่างมีการซ่อมแซมสาย DNA
3. เชื้อไวรัสฮิวแมน T- lymphocyte leukemia virus) HTLV(พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิด Adult T-cell leukemia/lymphoma โดยอาจเกิดจากการที่ยีนของไวรัส HTLV ได้แทรกเข้าไประหว่างยีนต่างๆ ของเซลล์เม็ดเลือดจึงทำให้ข้อมูลทางพันธุกรรมผิดไปจากปกติ จนเป็นเหตุให้สูญเสียกลไกในการควบคุมการแบ่งเซลล์)cell differentiation(และการเจริญเติบโตของเซลล์)cell maturationตามวัฏจักรเซลล์ปกติ (
4. ความผิดปกติในการสร้างและการทำงานของโครโมโซม)Chromosomal abberation (

เช่น ผู้ป่วย Down syndrome ซึ่งจะมีความเสี่ยงสูงขึ้นในการพัฒนาเป็นโรค ALL (10)

ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากอาศัยหลักเกณฑ์การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell maturity) แล้ว (ยังสามารถแบ่งตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีอาการ) rate of onset และการ (ดำเนินโรค แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน) acute leukemia (อาการจะเกิดขึ้นเร็วและรุนแรง และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง) chronic leukemia (ซึ่งผู้ป่วย อาจไม่มีอาการใดๆเมื่อเริ่มการวินิจฉัย หรืออาจมีอาการแบบค่อยเป็นค่อยไป ทั้งนี้อาจแบ่งชนิดโดย ขึ้นกับประวัติของโรคหรือการรักษาในอดีตของผู้ป่วย โดยถ้ามีสาเหตุตั้งที่กล่าวไว้แล้วข้างต้นก่อนเกิด มะเร็งเม็ดเลือดขาวจัดเป็น secondary leukemia ถ้าเกิดขึ้นเองโดยไม่มีสาเหตุตั้งที่ได้กล่าวไว้จัดเป็น de novo leukemia หรือการจัดแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของสายการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell lineage) ซึ่งจะทำให้สามารถแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาวออกได้เป็นสองกลุ่ม (คือ กลุ่ม lymphocytic leukemia และกลุ่ม myelocytic leukemia

นอกจากนี้หากแบ่งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว อาศัยทั้งหลักเกณฑ์ของระยะอาการของผู้ป่วย (rate of onset) ควบคู่กับสายการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell lineage) มาจัดจำแนกประเภทของ (มะเร็งเม็ดเลือดขาว จะทำให้สามารถจัดแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ

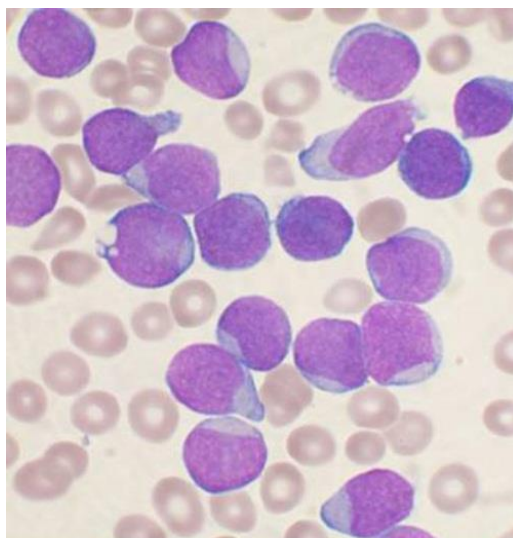
1. Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
2. Acute myeloblastic leukemia (AML)
3. Chronic lymphoblastic leukemia (CLL)
4. Chronic myeloblastic leukemia (CML)

และยังสามารถจัดแบ่งตามระบบของ French-American-British (FAB) classification โดยจำแนก เซลล์ตามลักษณะรูปร่างที่จำเพาะของเซลล์แต่ละชนิด (specific cell type เช่น (Acute myelocytic leukemia)AML(สามารถแบ่งชนิดย่อยได้เป็น M0-M7 ขณะที่ Acute lymphoblastic leukemia)ALL(สามารถจัดแบ่งตามหลักเกณฑ์ของ immunophenotype ได้ เป็น B cells- ALL และ T cells- ALL ซึ่งในงานวิจัยนี้ จะให้ความสำคัญกับ Acute lymphoblastic leukemia เนื่องจากมีอุบัติการณ์การเกิดโรคที่สูงในเด็ก และมีความรุนแรงของโรคสูงขึ้นหลังจากโรค กลับมาเกิดซ้ำ)relapse ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ และหากผู้ป่วยมีความผิดปกติทางโครโมโซม คือตรวจ (พบ Philadelphia chromosome) Ph+ (ซึ่งเกิดจากการรวมกัน)fusion(ของยีน BCR-ABL1 จะมี การพยากรณ์ของโรคไม่ดี โดยแม้ว่าปัจจุบันจะมียาที่เป็น drug targeted therapy เช่น imatinib

แล้ว แต่เนื่องด้วยอัตราการพบความผิดปกติของโครโมโซมดังกล่าวในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ มีเพียง 3% จากผู้ป่วยทั้งหมดเท่านั้น หรืออาจกล่าวได้ว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ยังไม่มียาที่จำเพาะ หรือแม้มียารักษาที่จำเพาะแล้ว ก็สามารถพบอุบัติการณ์การดื้อยาได้ ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาวิจัยในโรคนี้ (11)

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ 6), 7(

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์ เป็นโรคมะเร็งที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สายลิมฟอยด์ตัวอ่อนอย่างเฉียบพลัน ทำให้พบปริมาณ lymphoblast สะสมอยู่ในไขกระดูกเป็นจำนวนมาก และแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดหรือไปยังอวัยวะอื่นๆได้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็ก ในอดีตจัดว่าเป็นโรคที่รุนแรง สามารถทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้รวดเร็ว แต่ภายหลังได้มีการพัฒนาการรักษาหลายรูปแบบ ทำให้ผลการรักษา ALL ในเด็กมีความปลอดภัยมากขึ้น และมีช่วงที่จะกลับมาเป็นซ้ำนานขึ้น ขณะที่ผู้ใหญ่พบประมาณ 20-25% ของโรค แม้ว่าโรคจะสงบลง แต่ก็พบว่า สามารถมีชีวิตอยู่ต่อได้เพียง 3-5 ปีเท่านั้น



ภาพที่ 6 ลักษณะ Peripheral blood smear ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL (12)

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมโฟยด์)ALL(

แบ่งตาม immunophenotype หรือการแบ่งโดยใช้การตรวจ CD marker บนผิวของเซลล์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ B-ALL)B cell Acute lymphoblastic leukemiaและ (T-ALL)T cell Acute lymphoblastic leukemia (

แบ่งตาม FAB Classification สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. ALL-L1 เซลล์ขนาดเล็กและมีภาพร่างคล้ายกัน (uniform) นิวเคลียสกลม ไฮโดพลาสซึม น้อยและติดสีฟ้าไม่เข้มข้น พบบ่อยสุดในเด็ก
2. ALL-L2 เซลล์ขนาดใหญ่กว่า L1 และมักพบขนาดที่ไม่เท่ากัน นิวเคลียสและโครมาตินไม่ค่อยสม่ำเสมอ และมักเห็นนิวคลีโอลัสได้ตั้งแต่ 1 อันขึ้นไป
3. ALL-L3 เซลล์ขนาดกลางถึงใหญ่ ขนาดค่อนข้างเท่ากัน นิวเคลียสกลม เห็นโครมาตินละเอียด เห็นนิวคลีโอลัสได้ 2-5 อัน ไฮโดพลาสซึมติดสีเข้ม และพบ vacuole จำนวนมาก คล้าย Burkitt's type

ตารางที่ 1 การแบ่งชนิดของ ALL ตาม FAB Classification(13)

ลักษณะ	ALL-L1	ALL-L2	ALL-L3
ขนาดของเซลล์	เล็ก ขนาดเท่าๆกัน	ค่อนข้างใหญ่หลายขนาด	ใหญ่ ขนาดเท่าๆกัน
ภาพร่างนิวเคลียส	กลม	ไม่ค่อยสม่ำเสมอ มักเว้า	กลม หรือรีภาพไข่
ลักษณะโครมาติน	ละเอียด	มีทั้งละเอียด/ไม่ละเอียด	ละเอียด
นิวคลีโอลัส	เห็นได้ไม่ชัดเจน	เห็นได้ชัด มักพบ 1 อัน	เห็นชัดเจน มีหลายอัน
ปริมาณ ไซโตพลาสซึม	น้อยมาก	น้อยถึงปานกลาง	มีมาก
สีไซโตพลาสซึม	ติดสีฟ้าน้อยๆ ไม่เข้ม	ติดสีฟ้าถึงสีน้ำเงินเข้ม	ติดสีน้ำเงินเข้มมาก
แวคคิวโอล	มีหรือไม่มีก็ได้	มีหรือไม่มีก็ได้	มีได้มาก/เด่น

หรือแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมโฟยด์ (ALL (ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก The World Health Organization)WHO(classification ปีค.ศ. 2008 ได้จัดให้ ALL อยู่ในกลุ่มprecursor lymphoid neoplasms ซึ่งสามารถแยกได้เป็นชนิดหลัก คือ B lymphoblastic leukemia/lymphoma ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS และ B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities และ T lymphoblastic leukemia/lymphoma ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแบ่งชนิดของ ALL ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปีค.ศ. 2008)WHO classification (14) (

Precursor lymphoid neoplasm
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); <i>BCR-ABL1</i>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22); <i>TEL-AML1</i>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy (hypodiploid ALL)
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;q13.3); <i>E2A-PAX1</i>
T lymphoblastic leukemia/lymphoma

อาการแสดงทางคลินิกมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมโฟยด์)ALL(

อาการโดยส่วนใหญ่ มีสาเหตุมาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนอย่างลิมโฟบลาสต์)lymphoblast(ในไขกระดูกอย่างเฉียบพลัน เมื่อระบบควบคุมการทำงานผิดปกติส่งผลให้ไขกระดูกล้มเหลว เซลล์ที่ผลิตออกมาไม่สามารถเจริญเป็นตัวแก่)mature cell(ได้ อีกทั้งกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดปกติลดลง ผู้ป่วยจึงมาพบแพทย์ด้วยอาการ ปวดศีรษะ อาเจียน ซีด ใจสั่น อ่อนเพลีย เนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำ อาจพบจุดเลือดออกเนื่องจากเกล็ดเลือดต่ำ และอาการไข้ และติดเชื้อได้ง่ายเป็นผลจากการสร้างเม็ดเลือดขาวปกติลดลง และบางรายพบว่ามีต่อมน้ำเหลืองโต เนื่องจากเซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายไปถึงระบบน้ำเหลืองและไขสันหลัง

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์)ALL(15) (

ในกรณีผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงไม่ได้หมายถึง ผู้ป่วยจะต้องเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หากแต่เป็นปัจจัยสนับสนุนให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้มากขึ้น หรือมีความเสี่ยงในการเกิดโรคสูงกว่าผู้อื่น ได้แก่

1. เคยได้รับการฉายรังสี x-rays หรือฉายแสง (radiation)เมื่อแรกเกิด
2. เคยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) มาก่อน
3. มีความผิดปกติของโครโมโซม หรือยีน
4. มีความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น Down syndrome, Neurofibromatosis type 1, Shwachman syndrome และ Ataxia-telangiectasia

การวินิจฉัย (15)

การวินิจฉัยแยกมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ออกจากโรคอื่น มักจะเริ่มต้นจากการชักประวัติ และการตรวจร่างกายอย่างละเอียด โดยแพทย์จะส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด)complete blood count าวที่สูงแล้วมักจะพบปริมาณเม็ดเลือดข (ผิดปกติ และเมื่อทำการย้อมเสมียร์เลือดจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดตัวอ่อนปริมาณสูง และเพื่อเป็นการยืนยันผลของการตรวจ อาจทำการเจาะไขกระดูกเพื่อให้ได้ผลการวินิจฉัยที่แน่นอน

การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมฟอยด์)ALL (

หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL การรักษาหลักที่ใช้คือ ยาเคมีบำบัด)Chemotherapy(, การปลูกถ่ายไขกระดูก)Transplantationส่วนการรักษาอื่นๆ ()เพิ่มเติม ได้แก่ การผ่าตัดSurgery(, การฉายรังสีรักษา)Radiation therapy(, การใช้แอนติบอดี)Monoclonal antibodies(หรือยาที่จำเพาะกับมะเร็ง)Targeted therapyซึ่งจะใช้รักษาในกรณี (ที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติของยีนหรือโครโมโซมร่วมด้วย (15)

การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด)Chemotherapy ((6)

การรักษาผู้ป่วย ALL ส่วนใหญ่ จะรักษาด้วยยาเคมีบำบัด)Chemotherapyแบบใช้ยา () ร่วมกันหลายตัวcombination of anti-cancer drugsและทำ (การรักษาเป็นระยะเวลานาน การให้ยาเคมีบำบัดสามารถให้ในรูปแบบฉีดหรือรับประทาน โดยยาจะเข้าสู่กระแสเลือดและตรงไปสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีอยู่ทั่วร่างกาย แต่บางบริเวณ เช่น สมองและไขสันหลัง ยาจะไม่สามารถผ่านได้ อาจต้องใช้วิธี intrathecal chemotherapy คือการฉีดเข้าสู่ cerebrospinal fluid อีกทั้งการใช้ chemo regimens ในปริมาณสูงเพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อการรักษา ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วย เช่น ผมร่วง เจ็บบริเวณปาก ไม่อยากอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น ผู้ป่วยจึงจำเป็นต้องได้รับยาอื่นเพิ่มเติม เพื่อช่วยป้องกันหรือรักษาอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้น การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดแบ่งเป็น 3 ระยะด้วยกันคือ Induction, Consolidation และ Maintenance

1. Induction มีเป้าหมายเพื่อให้ภาวะโรคสงบ)Remission(ซึ่งหมายถึงการตรวจไม่พบ leukemic cell ในตัวอย่างที่ได้จากไขกระดูก และผู้ป่วยมีไขกระดูก และ blood count ปกติกลับคืนมา ระยะนี้จะให้ยาเคมีบำบัดที่รุนแรง ยาส่วนใหญ่ที่ใช้อาจเป็นตัวเดียว หรือร่วมกันก็ได้ ได้แก่ Vincristine, Dexamethasone หรือ Prednisone , Doxorubicin และ Daunorubicin เป็นต้น หรือผู้ป่วย ALL ที่มี Philadelphia chromosome สามารถนำ targeted drug อาทิ imatinib มาใช้ในการรักษาได้ ซึ่งให้ผลดี แต่ leukemic cells ก็อาจจะยังคงมีอยู่ที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย จึงจำเป็นที่จะต้องให้การรักษาต่อไป สิ่งหนึ่งที่ควรระวังคือการเกิด CNS prophylaxis จึงจำเป็นต้องทำการรักษาโดยการฉีดยาเคมีบำบัดอย่าง methotrexate หรือ cytarabine เข้าสู่ไขสันหลัง หรือร่วมกับการฉายรังสี)Radiation(บริเวณสมองและไขสันหลังด้วย

2. Consolidation เมื่อโรคดำเนินเข้าสู่ภาวะสงบ ในระยะต่อมาก็ยังคงให้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดระยะสั้นตามข้างต้นต่อไป แต่ในผู้ป่วยบางราย ที่มี subtype ของ ALL ชนิดต่างๆหรือมี poor prognostic factors ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการกลับมาเป็น leukemia อีกครั้ง)Relapse(แพทย์จะแนะนำให้ทำการปลูกถ่ายไขกระดูกแบบ Allogenic stem cell transplantation ซึ่งเป็นการปลูกถ่ายไขกระดูกของผู้บริจาคที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของผู้ป่วย โดยทำการตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากพี่น้องร่วมสายโลหิต หรือผู้บริจาคที่ได้ขึ้นทะเบียนบริจาคไว้ ทั้งนี้ผู้ป่วยควรศึกษาข้อมูลเพื่อเตรียมตัวรับการรักษาต่อไป

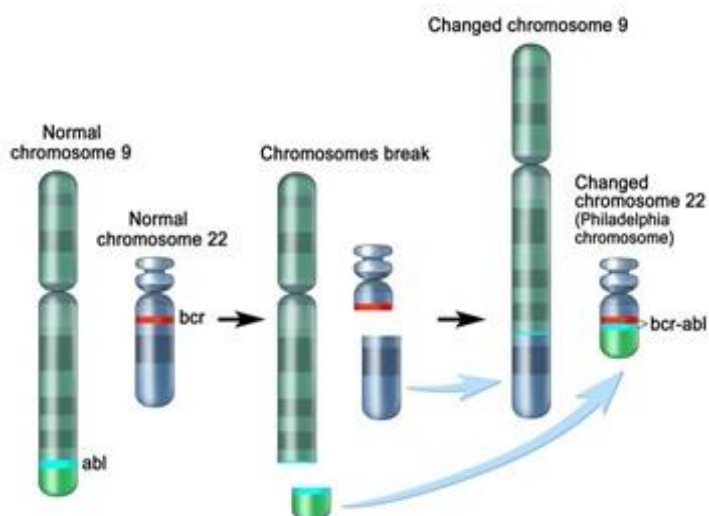
3. Maintenance เป็นระยะการรักษาที่ติดตามผลการรักษา โดยผู้ป่วยยังคงได้รับยาเคมีบำบัด อาทิ methotrexate และ 6-mercaptopurine)6-MP(หรือผู้ป่วยบางรายอาจได้รับยา

เพิ่มเติมอย่างเช่น vincristine และ prednisone ด้วย ซึ่งการรักษาจำเป็นต้องทำต่อไปประมาณ 2 ปี เพราะ CNS prophylaxis ยังเกิดขึ้นได้

Vincristine เป็นยาเคมีบำบัดในกลุ่ม Plant Alkaloids หรือ Vinca Alkaloid ที่สกัดได้จากพืชและนำมาพัฒนาเป็นตัวยาเช่นเดียวกับ Vinblastine โดย Vincristine เป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษา มะเร็งชนิดต่างๆ โดยเฉพาะใน ALL จัดเป็น microtubule-depolymerizing agent คือ ยาจะเข้ายับยั้งการทำงานของ microtubule ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ การรักษารูปร่างของเซลล์ ตลอดจนการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัว โดยเซลล์จะหยุดเจริญอยู่ในระยะ M phase ของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) และอีกส่วนหนึ่งเข้ากระตุ้นวิถีการตายแบบอะพอโทซิสผ่านวิถีภายใน ทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด โดยเมื่อ Vincristine เข้าสู่ร่างกายแล้ว จะผ่านกระบวนการ metabolism โดยอาศัย cytochrome P450 3A4 (cyp 3A4) ในตับเป็นตัวช่วยกำจัดพิษยา ผู้ป่วยอาจได้รับพิษอย่างรุนแรงจาก vincristine เมื่อถูกใช้ร่วมกับ cyp 3A4 inhibitors ได้ ส่วนผลข้างเคียงหากได้รับยานี้เป็นเวลานานคือ ทำให้ระบบประสาทเสื่อม แขนขาไม่มีแรง เป็นต้น (16)

ยาที่จำเพาะกับชนิดของมะเร็ง (drug targeted therapy (

ปัจจุบันมีการพัฒนายาที่จำเพาะกับโรคมะเร็งชนิดต่างๆมากขึ้น ซึ่งการทำงานของยาที่เป็น drug targeted therapy มีความจำเพาะต่อการรักษาความผิดปกติของโครโมโซมผู้ป่วย ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลมฟอยด์ที่ตรวจพบว่ามี Philadelphia chromosome ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีน (translocation) ในโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 22 ทำให้เกิดการหลอมรวมกันของยีน BCR จากโครโมโซมคู่ที่ 9 และยีน ABL จากโครโมโซมคู่ที่ 22 (t(9;22)(q34;q11) (ส่งผลให้มีการสร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวมากผิดปกติ พบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังสายลมฟอยด์ (CML) ด้วย กลุ่มยาที่ผลิตขึ้นมาจึงเรียกรวมว่า (เป็น tyrosine kinase inhibitors (TKIs เช่น (imatinib, dasatinib และ nilotinib เป็นต้น ยานี้จะช่วยให้ผู้ป่วยเข้าสู่ภาวะโรคสงบ และป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำ โดยผู้ป่วยต้องรับประทานยาทุกวัน ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือ บวมบริเวณรอบดวงตา คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เป็นต้น (11)



ภาพที่ 7 ลักษณะของ Philadelphia chromosome ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของ ยีน ABL บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ไป เชื่อมต่อกับยีน BCR บนโครโมโซมคู่ที่ 22 (17)

แอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

เป็นกระบวนการผลิตยาที่อาศัยหลักการของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เช่น ยา Blinatumomab เป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B-cell type การทำงานของยาสามารถจับกับโปรตีน 2 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้ในเวลาเดียวกัน คือ สามารถจับกับ CD19 ซึ่งพบบน B cells ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ leukemia และ lymphoma และจับกับ CD3 ที่พบบน T cells การจับกันของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเข้ามาทำลายเซลล์มะเร็งได้ สำหรับการใช้ยานี้จะให้ยาทางหลอดเลือดดำต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน และให้ซ้ำอีกครั้งหลังจากพักไป 2 สัปดาห์ เนื่องจากในรอบแรก ผู้ป่วยมักเกิดอาการข้างเคียงที่รุนแรง เช่น ชัก พุดลำบาก สับสน และติดเชื้อง่าย จึงจำเป็นต้องติดตามการรักษาที่โรงพยาบาลในช่วงแรกที่ได้รับการรักษา (15)

การปลูกถ่ายไขกระดูก (Transplantation)

เนื่องจากการทำ Autologous stem cell transplantation เป็นการนำเซลล์ของผู้ป่วยปลูกถ่ายคืนกลับเข้าไปในไขกระดูก แต่ stem cell ของผู้ป่วยในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งแล้วจึงยากต่อการรักษา ดังนั้น การปลูกถ่ายไขกระดูกแบบ Allogeneic stem cell transplantation จึงเป็นวิธีที่นิยมที่สุด โดยรับจากผู้บริจาค (donor) (ที่มีความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อกับผู้ป่วย) recipient (มากที่สุด เพื่อป้องกันปัญหาที่เกิดจากความเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อ โดยทั่วไป

ผู้บริจาคที่เป็นพี่น้องร่วมสายเลือด จะมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อมาก แต่หากเข้ากันไม่ได้ ต้องขอรับจากอาสาสมัครที่มาบริจาคเสตีมเซลล์ แต่การรักษาด้วยวิธีนี้อาจพบผลข้างเคียงที่รุนแรงในผู้ป่วยสูงอายุ หรือผู้ที่มีปัญหาสุขภาพอยู่ก่อน เนื่องจากก่อนการปลูกถ่ายไขกระดูกจะต้องให้ยากดภูมิคุ้มกัน ทำให้เสี่ยงกับการติดเชื้อได้ง่าย หรือเนื่องมาจากร่างกายมีการสร้างแอนติบอดีต่อสิ่งแปลกปลอมหลายชนิดเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น (15)

การฉายรังสีรักษา)Radiation therapy(

เป็นการนำรังสีพลังงานสูงมาทำลายเซลล์มะเร็ง ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL จะใช้วิธีที่เรียกว่า External beam radiation therapy และจะนำมาใช้ก็ต่อเมื่อ ต้องการรักษามะเร็งที่แพร่เข้าสู่สมอง และน้ำไขสันหลัง การฉายรังสีทั่วร่างกายหลังจากการปลูกถ่ายไขกระดูก อีกทั้งยังสามารถลดความเจ็บปวดของกระดูกที่เซลล์มะเร็งบุกรุกเข้ามาอีกด้วย ผลข้างเคียงที่พบได้คือ ผิวบริเวณที่ฉายรังสีอาจวมแดง ไหม้ หรือผมร่วง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดลดลง ทำให้อ่อนเพลียและติดเชื้อได้ง่าย (15)

ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรหลายชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่น Pupalia lappace พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 (18) และมีรายงานก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย ว่าสารสกัดจากพลูคาว และสารฟลาโวนอยด์มาตรฐานอย่าง quercetin, rutin และ isoquercetin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Jurkat, K562, U937 ได้และมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ด้วย (5)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้นำ พลูคาว ซึ่งเป็นพืชพื้นถิ่นทางภาคเหนือของไทยมาทำการศึกษาองค์ประกอบหลักที่พบในพลูคาว โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค HPLC-MS และได้นำรูตินมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อทราบถึงบทบาทและกลไกการออกฤทธิ์ของสารชนิดนี้ในเชิงลึก

พลู่ควา 19), 20(



ภาพที่ 8 ลักษณะของต้นพลู่ควา

พลู่ควา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Houttuynia cordata* Thunb อยู่ในวงศ์ *Satutaceae* ชื่ออื่นๆคือ ผักคาวตอง ผักเข้าตอง ผักคาวทอง ผักก้านตอง (ไทย), *houttuynia* (ทั่วไป), *Yu xing cao*(จีน) ลักษณะเป็นพืชสมุนไพรที่มีกลิ่นหอมและมีลำต้นเลื้อยขนานไปกับพื้นดิน ลำต้นเจริญเต็มที่อยู่สูงเหนือดิน 20-50 เซนติเมตร ลำต้นใต้ดินเป็นปล้องสั้นสีน้ำตาล มีรากแตกจากข้อโดยรอบเพื่อยึดเกาะ แผ่นใบรูปไข่กว้างประมาณ 8-4 เซนติเมตร ยาว 3-ปหัวใจ ขอบใบเซนติเมตร ปลายใบแหลมมาก โคนใบรู 6 เรียบ เส้นใบ 5-7 เส้น แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มกว่าใต้ใบ ช่อดอกออกตามยอด หรือซอกใบใกล้ยอด อับเรณูสีเหลือง ดอกออกมากในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม

จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้นี้พบว่าพลู่ความีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ)anti-inflammation(21) (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)anti-oxidative(22) (ฤทธิ์ต้านเบาหวาน)anti-diabetes(23) (ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อและเสริมภูมิคุ้มกันต้านทาน ฤทธิ์ต้านมะเร็ง)anti-cancer(24) (รักษาอาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้เคมีบำบัด ยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (4) โดยมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้นี้พบว่าสารสกัดพลู่ควาสามารถชักนำการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 ได้ (25)

สารออกฤทธิ์สำคัญในพลู่ความี 6 ชนิดหลัก คือ (26)

- .1Flavonoids ได้แก่ Quercetin, Rutin, Quercitrin, Hyperin, Isoquercetin
- .2Polyphenolic acids คือ 4- β -D-glucopyranosyloxy(-3-hydroxy-benzoic acid
- .3Volatile oil ได้แก่ β -myrcene, β -pinene, α -terpineol, n-decanoic acid

4. Fatty acid ได้แก่ Capric acid, Methyl oleate, Methyl linoleate
5. Sterol ได้แก่ 1-Terpinen-4-ol, Decanol
6. Alkaloids ได้แก่ Aristolactam A, Aristolactam B, Aristolactam A II, Pipenolactan A, Norcepharadione, Splendidin, Cepharradione B

สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (27) (

สารฟลาโวนอยด์เป็นสารประเภท polyphenolic compounds มีส่วนประกอบของโครงสร้างเป็น 15-carbon basic skeleton หรือที่เรียกว่า phenylbenzopyrone structure (C6-C3-C6) นอกจากพบสารฟลาโวนอยด์ในพืชควแล้ว (19) ยังสามารถพบได้ในพืชผัก และผลไม้ทั่วไปได้อีกด้วย โดยสามารถแบ่งชนิดของสารฟลาโวนอยด์ได้เป็น 6 ชนิดหลัก ดังแสดงใน ตารางที่ 3



ตารางที่ 3 การแบ่งชนิดของสารฟลาโวนอยด์ (28)

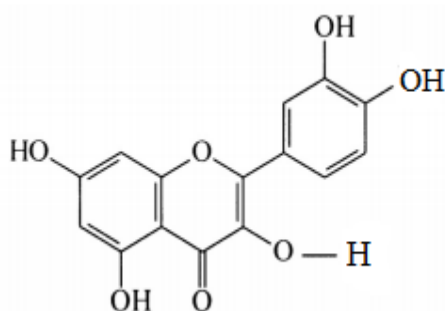
Flavonoid subgroup	Representative flavonoids	Examples
Flavonols	quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin, morin, fisetin, rutin	onions, spinach, cucumbers
Flavanones	hesperetin, naringenin, naringin, eriodictyol, homoeriodictyol, poncirin, silibinin, bavachinin	oranges, grapes
Flavones	apigenin, luteolin, diosmetin, baicalein, wogonin, amentoflavone, biapigenin, baicalin, flavopiridol, isovitexin, ochnaflavone, acacetin sesame, celery	parsley, thyme, peppers,
Chalcones	butein, 2'-hydroxychalcone, resveratrol, tris(methoxymethoxy)chalcone, xanthohumol	grapes, red wine
Isoflavonoids	daidzein, genistein, glycitein, vitexin, irigenin, glabridin, equol, biochanin A, formononetin, coumestrol, nobiletin	soybeans, barley, cauliflower, chickpeas
Anthocyanidins	cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin	berries, grapes

สารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติหลากหลาย ได้แก่ ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant), ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ป้องกันการทำลายของเซลล์ตับ (hepatoprotective), ใช้ขับปัสสาวะ (diuretic), ยาระงับประสาท (sedative), เพิ่มลักษณะฮอร์โมนเพศหญิง (estrogenic) เป็นต้น (นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังถูกนำมาใช้กับวงการแพทย์ในการรักษาโรคต่างๆ ไม่ใช่แค่เพียงรักษา

แต่ยังมีประสิทธิภาพในการป้องกันและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคบางโรค ได้แก่ ภาวะระบบประสาทเสื่อม โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคมะเร็งอีกด้วย (29)

ควอซีติน)Quercetin(และอนุพันธ์ของ Quercetin (32-30)

Quercetin)3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone และอนุพันธ์ของ (Quercetin เช่น Rutin, Isoquercetin, Hyperin, Quercitrin เป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนอล)flavonols(30) (ในธรรมชาติ Quercetin มักอยู่ในภาพที่จับกับน้ำตาล, phenolic acids หรือ แอลกอฮอล์ แต่เมื่อบริโภคเข้าไปร่างกายจะ hydrolyzed และถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารในรูปของ Quercetin สำหรับอนุพันธ์ของ Quercetin ที่พบมากในรูปที่จับกับน้ำตาล คือ Rutin (Quercetin 3- β -D-glucose) isoquercetin และ Hyperin (31)



Quercetin

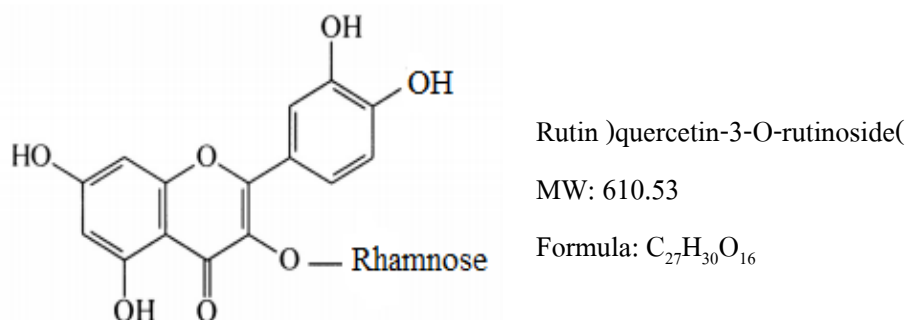
MW: 302.24

Formula: $C_{15}H_{10}O_7$

ภาพที่ 9 โครงสร้างของ Quercetin (32)

รูติน)Rutin (39-33) (

Rutin)quercetin-3-O-rutinoside, Rutoside, sophorin(เป็นฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งในกลุ่มฟลาโวนอล พบได้ในผักและผลไม้หลายชนิดเช่น เมล็ดบัควีท)buckwheat seeds(ผลไม้ตระกูลส้ม)citrus fruits(แอปเปิ้ล และชา โดยระหว่างที่มีการย่อยอาหาร rutin จะถูกดูดซึมได้ช้ากว่า quercetin โดยจะถูก metabolized เป็น aglycone quercetin ก่อนการดูดซึม ซึ่ง rutin มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ)anti-inflammation(, ลดความดัน)anti-hypertension(, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง)anti-cancer(, ฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว)anti-leukemic(, ป้องกันการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวและอุดตัน)atherogenesis prevention(, ลดความเป็นพิษของการออกซิไดส์ไขมันชนิด LDL ที่มีต่อเซลล์)oxidized LDL-cholesterol cytotoxicity reduction(, ฤทธิ์ป้องกันระบบประสาท)neuroprotection(และสามารถจับกับโลหะหนักแล้วทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้)chelate metal ions(



ภาพที่ 10 โครงสร้างของ Rutin (39)

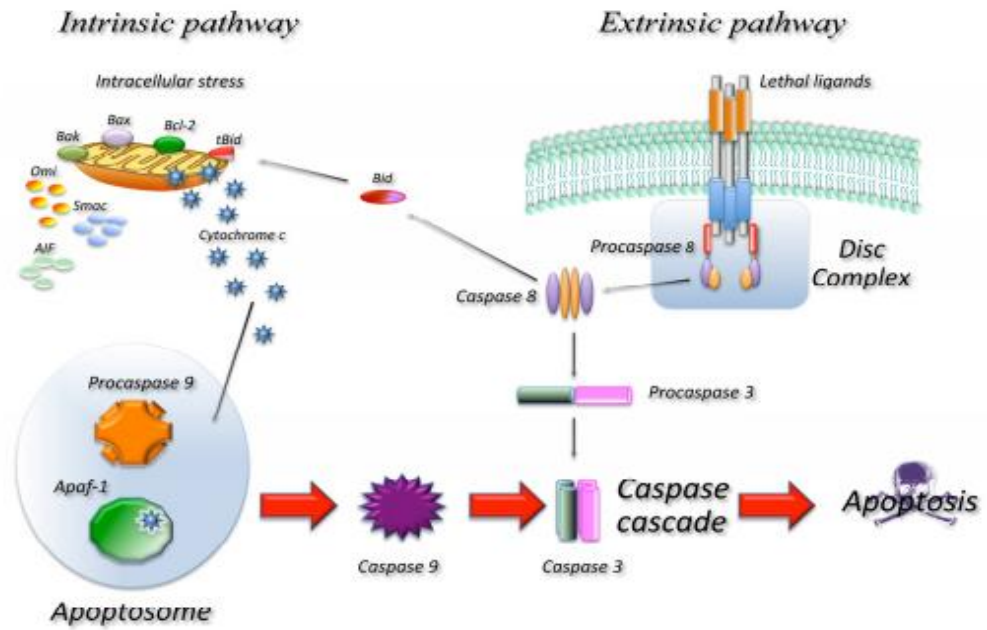
นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้นำรูตินมาทดสอบกับเซลล์ที่เกิดการอักเสบ และเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่ารูตินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการบาดเจ็บของปอดแบบเฉียบพลัน (Acute lung injury) ผ่านการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ blood gas และ neutrophil infiltration อีกทั้งยังลดการแสดงออกของ MIP-2 และ MMP-9 ผ่านการยับยั้งของ Akt phosphorylation(34) หรือจะเป็นฤทธิ์ของรูตินด้าน neuroprotection จากงานวิจัยของ M Sahar และคณะ ในปี 2014 พบว่ารูตินสามารถยับยั้งการทำงานของ A β -amyloid (1-42) ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาท และช่วยฟื้นฟูความจำผ่านการกระตุ้นสัญญาณ MAPK และ BDNF และยังสามารถลด oxidative stress ในสมองของหนูได้ (35) นอกจากนี้ ได้มีการนำรูตินมาทดสอบกับ leukemic stem cells (LSCs) ของ AML พบว่ารูตินสามารถยับยั้งการอยู่รอดของ adherent leukemic progenitor cells (CD34+CD38-CD123+) แต่ไม่ทำลาย normal progenitor cells (CD34+CD38-)(33) และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Jurkat โดยยับยั้งการทำงานของสัญญาณ NF- κ B และ AKT และยังมีฤทธิ์ทดสอบผลของรูตินกับสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถลดการอักเสบจากการฉายรังสี UVB บริเวณผิวหนังของ nude mice โดยไปออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน phosphorylated form ของ STAT3 (38) อีกทั้งยังพบว่ารูตินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ (HL-60) ที่ปลูกถ่ายให้กับหนู โดยมีผลทำให้ปริมาณของก้อนมะเร็งลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control ได้ (36) และพบว่าผลของรูตินต่อการอะพอโทซิสสัมพันธ์กับการลดลงของ active GSK-3 β และตัวยับยั้ง GSK-3 β ที่ทำให้เกิด cytotoxicity (37)

อะพอโทซิส (apoptosis) (40) (41)

อะพอโทซิส (apoptosis) เป็นรูปแบบการตายของเซลล์ () programmed cell death () ที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตในระดับเซลล์ สามารถแบ่งวิถีอะพอโทซิสได้ 2 แบบ คือ

1. วิถีจากภายนอก (Extrinsic pathway) เริ่มจากมีกระตุ้นสัญญาณจากภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดการจับกันของ Death Initiation Signalling Complex (DISC) และ death ligand FAS/CD95 แล้วทำให้ Fas ไปจับกับ death domain (DD) (เกิดเป็น Fas associated protein with a DD) FADD ซึ่ง (FADD มีส่วนของ conserved protein domain คือ Death Effector Domain) DED (DED จะไปจับกับ procaspase 8 เกิดการกระตุ้น caspase 8 และกระตุ้น caspase ที่เป็น downstream เช่น caspase 3 และทำให้เซลล์อะพอโทซิสได้ในที่สุด (42)

2. วิถีจากภายใน (Intrinsic pathway or Mitochondrial pathway) ถูกชักนำโดย (ปัจจัยกระตุ้น เช่น Oxidative stress, DNA เกิดความเสียหาย แล้วกระตุ้นให้ Bax และ/หรือ Bak ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein ใน Bcl-2 family เข้ามาจับกันเป็น homodimer ที่ผนังของไมโทคอนเดรีย) mitochondrial membrane (ทำให้เกิดการปล่อย cytochrome C ออกมาภายนอกไมโทคอนเดรีย โดยเมื่อ cytochrome C ออกมาสู่ cytosol จะรวมตัวกับ Apaf-1 และ procaspase-9 เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า อะพอโทโซม (apoptosome) โดยใช้พลังงานในรูปของ (ATP ในการรักษาโครงสร้างให้เสถียร ซึ่ง caspase-9 จะกระตุ้นการทำงานของ effector caspase ได้แก่ caspase-3, caspase-6, และ caspase-7 แล้วทำให้เซลล์นั้นตายแบบอะพอโทซิส ทั้งนี้การตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์เป็นการตายที่มีลักษณะจำเพาะ) Morphological hallmark of apoptosis (โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปตามลำดับกล่าวคือ จะมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ โดย phosphatidylserine (PS) ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์จะเคลื่อนที่ออกมายังด้านนอกของเยื่อหุ้ม () เซลล์ (Loss Asymmetric of membrane) เซลล์จะสูญเสียปริมาตร (loss of cell volume) เยื่อหุ้ม () เซลล์เกิดการหดตัวและยึดตัวออกนอกผิวเซลล์ (plasma membrane blebbing) (นิวเคลียสจะรวมตัวกันแน่น) nuclear condensation) เกิดการเกาะกลุ่มของโครมาติน (Chromatin aggregation) ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายเป็นชิ้นเล็ก (DNA fragmentation) และเกิดเป็น (apoptotic body) (41)

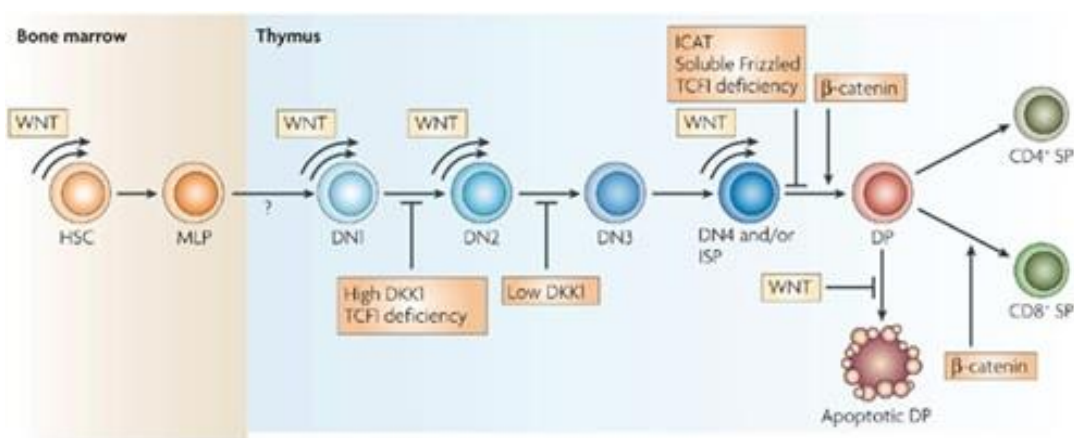


ภาพที่ 11 วิธีสัญญาณอะโพโทซิส (42)



วิถีสัญญาณวินท์ (Wnt signaling pathway) (45-43)

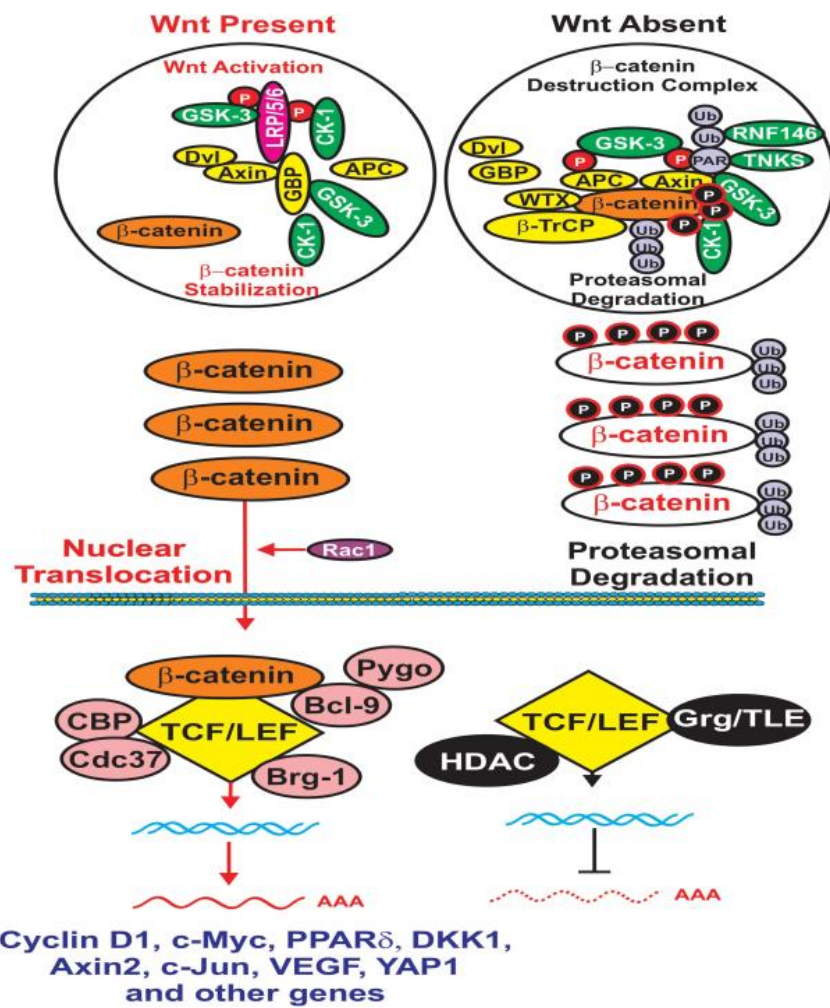
วิถีสัญญาณวินท์ (Wnt signaling pathway) มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาการของ เซลล์ต้นกำเนิด เอ็มบริโอ การรักษาสสมดุลของเนื้อเยื่อ และมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการเจริญของ T cells ใน thymus ทั้งระยะที่เป็น double negative (CD4-CD8-DN) (ให้มีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ และในระยะที่เป็น single positive (SP) (มีบทบาทในกระบวนการคัดเลือกเซลล์) positive selection และช่วยให้ (thymocytes) อยู่รอดและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น



ภาพที่ 12 การควบคุมการเจริญของ T cells โดยวิถีสัญญาณวินท์ (45)

สามารถแบ่ง Wnt pathway ออกได้เป็น วิธีหลัก คือ 2 Canonical Wnt pathway และ Noncanonical Wnt Pathway โดย Noncanonical Wnt Pathways เป็นวิธีที่ไม่อาศัย β -catenin เป็นตัวกลาง แต่จะอาศัย Jun N-terminal kinase (JNK) หรือ Calcium เป็นตัวกลาง ซึ่งจะควบคุมการเคลื่อนไหวของเซลล์ และช่วยควบคุมการทำงานของยีน ตามลำดับ (46) แต่ในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาไปที่ สัญญาณวินท์แบบ Canonical Wnt pathway ซึ่งอาศัย β -catenin เป็นตัวกลาง และมีโปรตีนสำคัญหลายตัวมาควบคุมการทำงานของ β -catenin โดย Canonical Wnt pathway จะทำงาน โดยการกระตุ้นสัญญาณ จากการจับกันระหว่าง Wnt ligands และ Frizzled receptor (Fz) ที่บริเวณผิวเซลล์ (cell surface) ทำให้ Dvl เป็นโปรตีนใน cytoplasm ยับยั้งการทำงานของ GSK-3 β โดยการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นจะเกิดขึ้นเองภายในเซลล์ หรือโดยการใช้ GSK-3 β inhibitor ทำให้ไม่เกิด β -catenin phosphorylation เมื่อไม่เกิด β -catenin phosphorylation ทำให้ β -catenin มีความเสถียร มีการสะสมเพิ่มมากขึ้น และย้ายเข้าสู่นิวเคลียส แล้วเข้าไปจับกับ transcription factors และทำให้เกิดการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และสร้างเซลล์ในลักษณะเดิมทดแทน

ตัวเองได้ (self-renewal) แต่ถ้า Canonical Wnt pathway ไม่ถูกกระตุ้นการทำงาน จะทำให้โปรตีน Dishevelled (Dsh) ใน cytoplasm กระตุ้นการทำงานของ protein complex ที่ประกอบด้วย Axin, adenomatous polyposis coli gene (APC) และ glycogen synthase kinase (GSK-3 β) เมื่อ GSK-3 β ถูกกระตุ้นการทำงาน จะเกิด β -catenin phosphorylation ทำให้ β -catenin ไม่มีความเสถียร และเกิด proteosomal degradation ทำให้ β -catenin ไม่เกิดการย้ายเข้าสู่นิวเคลียส ส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญแบ่งตัว

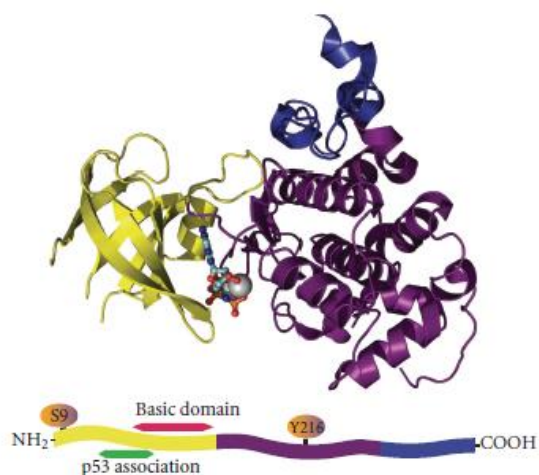


ภาพที่ 13 สัญญาณวินท์ (WNT signaling) ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นในเซลล์ปกติ (43)

ดังนั้นหากองค์ประกอบหลักในวิถีวินท์ (Wnt pathway) (เกิดการผ่าเหล่า) mutation (สูญเสียการทำงานที่ผิดปกติไป หรือมีการแสดงออกที่มากเกินไป) overexpression (พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม และมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น และในมะเร็งโลหิตวิทยา ก็พบว่าเกี่ยวข้องกับทั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายมัยอีลอยด์และลิมโฟบลาสต์) AML, ALL และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังสายมัยอีลอยด์และลิมโฟบลาสต์ (CML, CLL (47) (โดยวิถีสัญญาณวินท์) Wnt signaling pathway (ที่เสียการควบคุมไปในมะเร็งโลหิตวิทยาเป็นชนิด Canonical Wnt pathway ซึ่งอาศัย β -catenin) cytoplasmic protein (เป็นตัวกลาง โดยโปรตีนหลักที่มีบทบาทควบคุมการทำงานของ β -catenin ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คือ GSK-3 β)

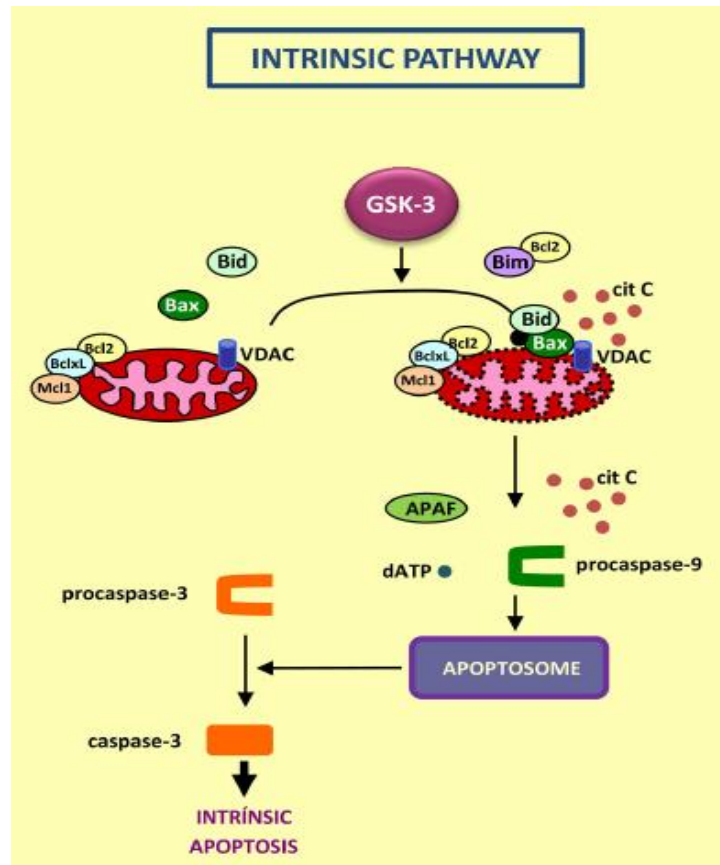
สัญญาณ GSK3 β) GSK3 β - signaling (44, 48, 49)

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) เป็น serine/threonine kinase ที่มีบทบาทควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน (glycogen synthesis), การดำเนินวัฏจักรเซลล์ (cell cycle progression), การจัดเรียงตัวของโครงสร้างเซลล์ (cytoskeletal rearrangement) และกระบวนการอักเสบ (inflammation) โดยเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) (พบว่า มี 2 isoform คือ GSK-3 α และ GSK-3 β และพบว่า GSK-3 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมวิถีสัญญาณของ Notch, Hedgehog และ Wnt ซึ่งเป็นวิถีสัญญาณที่สำคัญในการพัฒนาการของ T cell (T cell development) (50) (โดยในวิถีวินท์) Wnt pathway (GSK-3 จะควบคุมการเข้าสู่นิวเคลียสของ β -catenin ผ่านกระบวนการ phosphorylation จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า GSK-3 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิด อย่างเช่น มะเร็งรังไข่ (52) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (53) มะเร็งตับอ่อน (54) และเมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกและการทำงานของ GSK-3 พบว่าทำให้การเจริญแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) ลดลง และทำให้เซลล์มะเร็งเหล่านั้นอะพอโทซิสไป ส่วน (มะเร็งทางโลหิตวิทยา พบว่า GSK-3 α จัดเป็น target ของ AML เนื่องจากได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ small-molecule และ small hairpin RNA (shRNA) (ยังซึ่งเป็นตัวยับ) GSK-3 α ในการตรวจสอบ (การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไป แล้วเหนี่ยวนำ HL-60 และ U937 เกิดการ differentiation ส่วน GSK-3 β พบว่าสามารถ promote ฤทธิ์ของยา imatinib แล้วทำให้ LSCs ใน CML อะพอโทซิสไป แต่ไม่พบใน HSCs ที่ปกติ นอกจากนี้ GSK-3 β ยังมีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีน NF- κ B และความอยู่รอดของเซลล์ เมื่อมีการยับยั้ง GSK-3 β ใน B-CLL จึงเหนี่ยวนำทำให้เซลล์มะเร็งอะพอโทซิสไป หรือใน ALL ก็ให้ผลลักษณะเช่นเดียวกัน (55)



ภาพที่ 14 โครงสร้างของ Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)(49)

โดยมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สัญญาณ GSK-3 β มีความเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณอะพอโทซิสภายใน (intrinsic apoptotic pathway) โดยเมื่อเกิดความเสียหายของ (DNA หรือภาวะ oxidative stress) ขึ้น จะชักนำให้เกิดการปลดปล่อยของ cytochrome c จาก mitochondria มาจับกับ Apaf-1, ATP และ procaspase 9 แล้วเกิดเป็น apoptosome โดยสัญญาณ GSK-3 β จะกระตุ้น target ในวิถีสัญญาณอะพอโทซิส อย่าง Bax, Bim และ VDAC ซึ่งจะนำไปสู่การกระตุ้น caspase จนทำให้เกิดอะพอโทซิสได้ (56) ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาสัญญาณ GSK-3 β เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดวิถีสัญญาณอะพอโทซิสภายใน



ภาพที่ 15 วิธีสัญญาณอะพอโทซิสภายใน (intrinsic apoptotic pathway); GSK-3 ทำหน้าที่เป็น pro-apoptotic โดยมี targets เป็น Bax, Bim และ VDAC ในท้ายที่สุดทำให้เกิดการปลดปล่อย cytochrome C จากไมโทคอนเดรีย และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (56)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

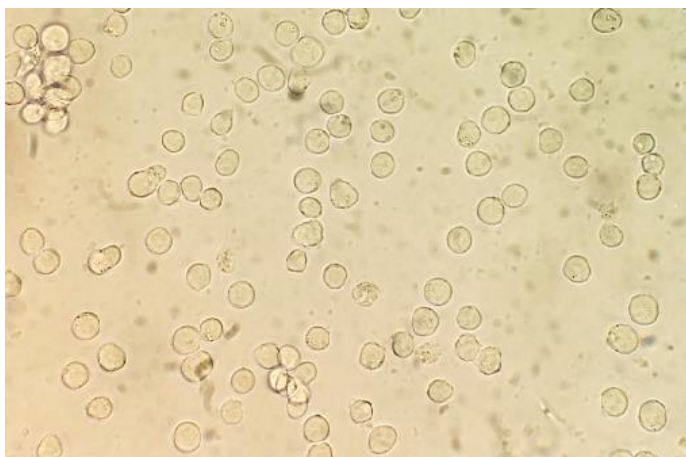
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารสกัดพลูควาด้วยแอลกอฮอล์ โดยการนำพลูควาแห้งของคณะผู้วิจัยที่ได้ทำการสกัดไว้ก่อนหน้านี้ มาแช่ลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่อง evaporator เพื่อเตรียมสารให้เข้มข้น และระเหิดแห้งด้วย lyophilization เพื่อเตรียมสารให้แห้งโดยผ่านเครื่อง Freeze dryer จนได้เป็นสารสกัดแห้งของพลูควา



ภาพที่ 16 สารสกัดพลูควาที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์

2. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบ คือ Molt-4 (ATCC[®] CRL-1582[™]) เป็นเซลล์ชนิด Human acute T lymphoblastic leukemia ลักษณะโดยธรรมชาติของเซลล์เป็น cell suspension เจริญได้ใน RPMI-1640 medium ที่มี fetal bovine serum และควรเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน



ภาพที่ 17 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Molt-4



สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้การวิจัย

สารเคมีและน้ำยา

Acrylamide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ammonium persulfate)NH ₄ (₂ S ₂ O ₈	Bio Basic, แคนาดา
Annexin V-Alexa 488/ Propidium iodide)PI(Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Beta-actin primary antibodies	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Blocking buffer)Skim milk, แอนลีนโกลด์(แอนลีน, ประเทศไทย
Bovine serum albumin)BSA(Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Coomassie brilliant blue R-250	Bio Basic, แคนาดา
Dimethyl sulfoxide)DMSO(Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dye reagent concentrate	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
1,4-Dithiothreitol)DTT(Merk, เยอรมนี
ECL [™] start Western blotting detection reagent	GE Healthcare, อังกฤษ
Fetal bovine serum)FBS(Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Glycine, NH ₂ CH ₂ COOH	Ajax Finechem, ออสเตรเลีย
GSK-3beta primary antibodies	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
HRP-conjugated secondary antibodies	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Hydrochloric acid)HCL(Merk, เยอรมนี
In vitro toxicology assay kit)TOX2(Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
5x loading dye	Fermentas
Methyl Alcohol	Tedia, สหรัฐอเมริกา
N,N'-methylene-bis-acrylamide	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Nonidet-P40	AppliChem, เยอรมนี

สารเคมีและน้ำยา (ต่อ)

Penicillin/Streptomycin	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
p-GSK-3beta primary antibodies	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Phenylmethanesulfonyl fluoride)PMSF(Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride)KCL(Merk, เยอรมนี
Protein ladder	Thermo Scientific, ลิทัวเนีย
Rutin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Roswell Park Memorial Institute medium-1640)RPMI medium-1640(Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Sodium Chloride)NaCl(Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium dodecyl sulfate)SDS(Vivantis, สหรัฐอเมริกา
<i>N,N,N',N'</i> -tertramethylene diamine)TEMED(Bio Basic, แคนาดา
Tris	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
Trypan blue	The British Drug House, อังกฤษ
Tween20	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Vincristine	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์และเครื่องมือ

-20°C freezer	Sanyo, ญี่ปุ่น
-80°C freezer	ilshin Lab, เนเธอร์แลนด์
4°C refrigerator	Mitsubishi, ญี่ปุ่น
6, 24 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autoclave	Tommy, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 µl	Gilson, ฝรั่งเศส
Autopipette 10-100 µl	Gilson, ฝรั่งเศส
Autopipette 100-1000 µl	Gilson, ฝรั่งเศส
Beaker)50, 100 ml(Schott Duran, เยอรมนี
Cell culture flask)25, 75 cm ² (Corning, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Kokusan, ญี่ปุ่น
Centrifuge tube)14, 50 ml(Falcon, สหรัฐอเมริกา
Cylinder)20, 100 ml(Witeg Diffico, เยอรมนี
CO ₂ incubator	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube	SPL life science, เกาหลี
DC Power supply รุ่น PS 500XT	Hofer, สหรัฐอเมริกา
Differential counter	Modulus, สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette) 10 ml(SPL life science, เกาหลี
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Flow cytometer	BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา
Gel doc)G:BOX(Syngene, สหรัฐอเมริกา
Gel Electrophoresis unit	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Glass bottles	Schott Duran, เยอรมนี
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์และเครื่องมือ (ต่อ)

Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Inverted microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow	Faster, อิตาลี
Liquid Nitrogen tank	Air Liquide, ฝรั่งเศส
Magnetic stirrer	LabTech, เกาหลี
Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
Pasture pipette	Tarsons, อินเดีย
pH meter	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Pipette boy	Scilogex, สหรัฐอเมริกา
Plate shaker	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Protein transfer equipment	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
รุ่น)Mini-PROTEAN tetra System(
PVDF membrane	Millipore, สหรัฐอเมริกา
Sterile tips)200,1,000 µl(Santa Cruz, สหรัฐอเมริกา
Tips)10, 20, 100, 1000 µl(Sorenson, สหรัฐอเมริกา
Volumetric flask)100, 1000 ml(Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	Labnet, สหรัฐอเมริกา
Water bath	Mgw Lauda, เยอรมนี
Whatman Filter Papers	GE Healthcare, อังกฤษ
UV/VIS spectrophometer	PG instruments, อังกฤษ

วิธีการวิจัย

1. การตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพลูควา

การตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูควา จะทำการตรวจวัดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay ตามวิธีของ Shoib A (57) และคณะ โดย aluminium chloride จะทำปฏิกิริยากับ C-4 keto group และ C-3 หรือ C-5 hydroxyl group ของฟลาโวนอยด์ กลุ่ม flavones และ flavonols เกิดเป็นสารประกอบ complex สีเขียวที่ทนต่อกรด และทำปฏิกิริยากับ ortho-dihydroxyl group ในวงแหวน A- หรือ B- ของสารฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสารสีเขียวที่ไม่ทนต่อกรด โดยสีจะแปรผันตามปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัด โดยในวิธีนี้ใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน ค่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะรายงานในหน่วย mg เมื่อเทียบกับ quercetin ต่อน้ำหนักของพลูควาแห้ง)mg QE/mg dried *H.cordata* extract(

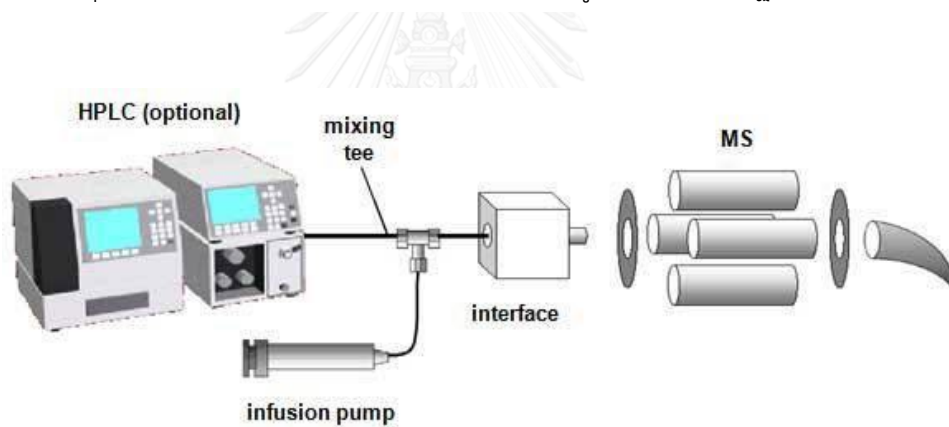
1.1 ทำการเตรียมสารละลายก่อนการทดลอง ดังนี้

- 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 $\mu\text{g/ml}$

1.2 ผสมสารสกัดพลูควาที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 0.2 มิลลิลิตร กับน้ำ distilled deionized water ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเติม NaNO_2 5% w/v ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา ทำการเติม AlCl_3 10% w/v ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร ในนาทีที่ 6 ทำการเติม NaOH 1 M ลงไปปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และน้ำ distilled deionized water ปริมาตร 0.48 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยการเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน quercetin

2. วิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดหยาบจากพญาคาวด้วยเทคนิค HPLC-MS

นำสารสกัดหยาบจากพญาคาวมาละลายใน DMSO และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค HPLC)High Performance Liquid Chromatography(เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบ ระหว่างเฟส 2 เฟส คือ Stationary Phase เฟสอยู่กับที่ (column) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพา โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็วจะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า จะถูกแยกออกมาทีหลัง จากนั้นสารที่ออกจากคอลัมน์จะเข้าสู่ตัวตรวจวัดคือ แมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้หลักการ MS) Mass Spectrometry(ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนในสภาวะที่เป็นสุญญากาศ แล้ววัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) และนำมาเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของสารมาตรฐาน



ภาพที่ 18 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS(58)

3. การเตรียมสารรูตินที่ความเข้มข้นต่างๆ

นำสารรูติน \leq 94% rutin hydrate (20 มิลลิกรัม มาละลายใน DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการเจือจางต่อใน RPMI-1640 ให้ได้ความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

4.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 (Human acute T lymphoblastic leukemia (ATCC[®] CRL-1582[™]) เพาะเลี้ยงใน RPMI-1640 ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ penicillin G 100 unit/ml และ streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C สภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และควรเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

4.2 การเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง เมื่อต้องการนำเซลล์ไปทดสอบในขั้นตอนต่างๆ ต้องตรวจนับจำนวนเซลล์ เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion method โดยเซลล์ที่จะนำไปทำการทดสอบต่อ ต้องมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 90%

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินในการต้านโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของรูติน ในด้านการต้านการแบ่งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt-4 จะทำการทดสอบ 2 วิธี คือ วิธี trypan blue exclusion method และ วิธี microscopic analysis

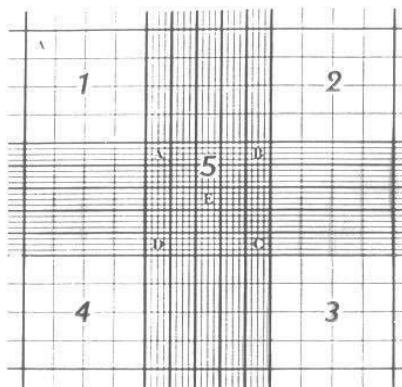
5.1 วิธี trypan blue exclusion method

เป็นการทดสอบทาง cytotoxicity ที่อาศัยหลักการว่าในเซลล์ที่ยังมีชีวิต จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่แข็งแรง จึงไม่ยอมให้ trypan blue ซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ จึงเห็นเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม วาวใส ขณะที่เซลล์ตาย เยื่อหุ้มเซลล์จะเสียสภาพหรือถูกทำลายไป สีย้อมจึงซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย เซลล์จึงมีลักษณะติดสีน้ำเงิน

มีวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมเซลล์ที่จะทำการทดสอบให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5×10^5 เซลล์/ทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิดมิลลิลิตร ๗๙๖ หลุม (๙๖ wells plate โดยใส่เซลล์ในแต่ละหลุมจำนวน (90 ไมโครลิตร จากนั้นเติมรูตินที่ระดับความเข้มข้น 20, 40, 80, 160 และ 320 μM โดยในแต่ละหลุมจะมีสารรูตินหลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมคือ RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine เป็น positive control จากนั้นนำไป incubate ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 และ 2 วัน เมื่อครบเวลานำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (cell suspension มาเจือจางกับ (trypan blue ใส่ลงใน hemocytometer ข้างละ 10 μl และนำไปตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า นับเซลล์ในช่อง 1, 2, 3 และ 4 ดังภาพที่ 20 นับทั้งสองข้าง นับรวมทั้งหมด)4 ช่อง นำมาหาค่าเฉลี่ยต่อ (1 ช่อง แล้วคำนวณกลับเพื่อหาปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต) % cell viability(

$$\text{จากสูตร } \% \text{ cell viability} = \frac{\text{Viable cells}}{\text{Total cells}} \times 100$$

จากนั้นนำค่า % cell viability มาสร้างกราฟสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration ของรูติน โดยจะเลือกความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} มาทดสอบกับเซลล์ Molt-4 ด้านต่างๆ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และเกิดความเป็นพิษกับเซลล์ข้างเคียงน้อยที่สุด โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่อไป



ภาพที่ 19 ช่องตารางสำหรับตรวจนับเซลล์ของ Hemocytometer Cell Counting Chamber (59)

5.2 วิธี microscopic analysis

เป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 โดยการตรวจดูปริมาณของเซลล์ และลักษณะของเซลล์ (cell morphology) จากกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

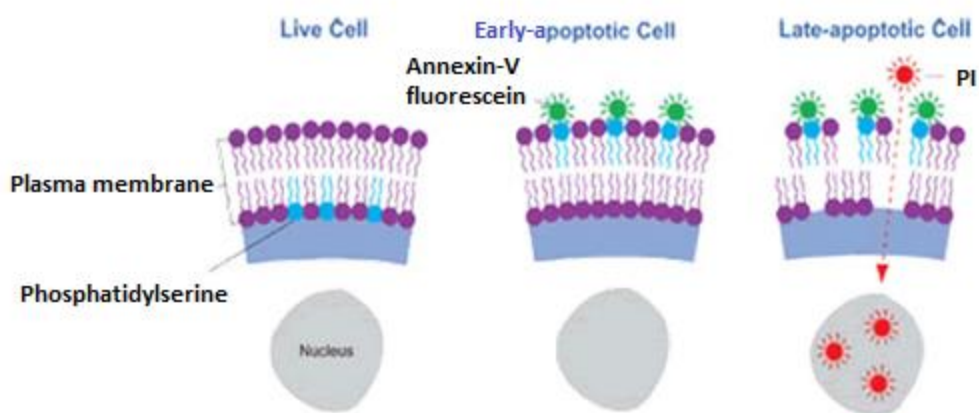
โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมเซลล์ที่จะทำการทดสอบให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ มิลลิลิตร ทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด/96 หลุม (96 wells plate) โดยใส่เซลล์ในแต่ละหลุม (จำนวน 90 ไมโครลิตร จากนั้นเติมรูตินที่ระดับความเข้มข้น 130 μM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม) จากการทดสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion โดยมีค่าต่ำกว่าค่า IC_{50} ประกอบกับการศึกษา งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นด้วยสารรูตินโดยในแต่ละหลุมจะมีสารรูตินหลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมคือ RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine เป็น positive control จากนั้นนำไป incubate ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 และ 2 วัน เมื่อครบกำหนดของแต่ละช่วงเวลา นำจานเพาะเลี้ยง ออกมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X เพื่อดูปริมาณ และลักษณะความแตกต่างของ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

6. ศึกษาด้านการตายของเซลล์ ด้วยการตรวจวัดการเกิดอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์

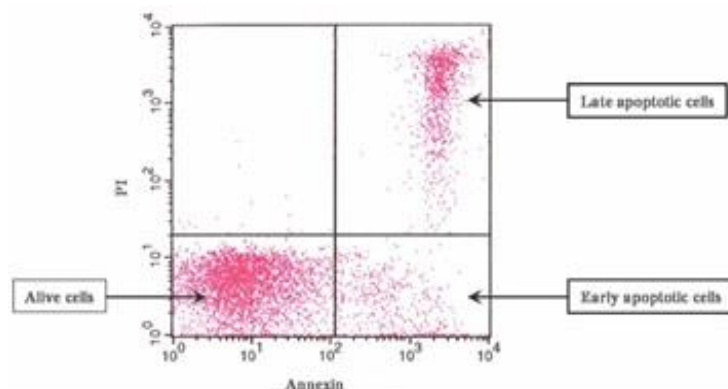
การตรวจวัดการอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับสารรูติน โดยวิธีย้อมสี Annexin V และ Propidium iodide) PI (เพื่อวิเคราะห์หาระดับความแตกต่างของการอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับรูติน

) ทั้งนี้ระยะเริ่มเกิดอะพอโทซิส Early apoptosis เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ (โดย phosphatidylserine) PS ซึ่งอยู่ด้านในจะเคลื่อนที่ออกมาด้านนอก (องเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ Annexin V สามารถจับกับประจุลบของ phosphatidylserine ได้ แต่ในระยะนี้ PI ยังไม่สามารถผ่านเข้ามาจับกับ DNA ได้ ต่อมาเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติ และภายในเซลล์เกิด chromatin condensation และ DNA Fragmentation ทำให้ให้ สี PI มาจับกับ DNA ได้ สามารถตรวจสอบการตายแบบอะพอโทซิสด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ดังนั้นเมื่อใช้ Annexin V-fluorescein เนื่องจาก Annexin V เป็นสารที่ไม่มีสีจึงต้องทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ในที่นี้คือ fluorescein เป็นสารเรืองแสงสีเขียว ร่วมกับ (PI จะทำให้สามารถแบ่งเซลล์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์มีชีวิต) Annexin V negative/PI negative กลุ่ม (Early apoptotic cell) Annexin V positive/ PI negative และกลุ่ม (Late apoptotic cell) Annexin V positive/ PI positive ดังแสดงในภาพที่ (20-21 โดยขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ มีดังนี้

1. เตรียม Molt-4 cells จำนวน 1.0×10^6 เซลล์ต่อหลุม ของ 6 wells plate ปริมาตรหลุมละ 1.8 มิลลิลิตร
2. ทดสอบฤทธิ์รูดินที่ระดับความเข้มข้น $130 \mu\text{M}$ และ RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine 1 nM เป็น positive control ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม
3. นำไป incubate ที่ 37°C และ 5% CO_2 ในความชื้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลา transfer cell ใส่ tube ปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที)rpm เป็นเวลา (5 นาที แล้วปั่นล้างด้วย cold PBS 2 ครั้ง จากนั้น resuspend ด้วย 1X binding buffer 100 ไมโครลิตร
5. เติม Annexin V- Alexa488 5 ไมโครลิตร และ PI 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเติม 1X binding buffer 400 ไมโครลิตร
7. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer)BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา (โดยใช้โปรแกรม Cell Quest) BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา(



ภาพที่ 20 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระยะ early และ late apoptosis (60)



ภาพที่ 21 บริเวณเซลล์ในแต่ละระยะอะพอโทซิส เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยโพลีไซโตมิเตอร์ (61)

7. ศึกษาความเกี่ยวข้องของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ด้วยวิธี Western blot analysis

ในการศึกษาผลของรูติน ต่อการอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ผ่านสัญญาณ GSK3 β โดยวิธี Western blot analysis แบ่งเป็น 7 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

7.1 การสกัดโปรตีน (Protein Extraction)

ในการสกัดโปรตีนมีขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. นำเซลล์แต่ละหลุมใน 6-wells plate ของ Molt-4 cells ที่เป็น untreated (negative control) และที่ treat ด้วย vincristine) positive control (ที่ความเข้มข้น 1 nM และรูติน ความเข้มข้น 130 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใส่ใน pre-cooled microcentrifuge tube ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นตกตะกอน และล้างเซลล์ด้วย Cold PBS 2 ครั้ง
2. เติม Cold NP-40 lysis buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม เพื่อสกัดโปรตีนจากเซลล์
3. นำไปเขย่าด้วยความเร็วคงที่ โดยใช้เครื่อง shaker เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
4. นำมา centrifuge ต่อเป็นเวลา 20 นาที ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. จากนั้น aliquot แบ่งส่วนใส่ pre-cooled microcentrifuge tube 10 ไมโครลิตร เพื่อวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ส่วนที่เหลือเก็บใส่ microtube ที่ -20°C

7.2 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay เป็นเทคนิควิธีทาง Colorimetric method เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนในสารละลาย โดยหลักการของวิธีนี้อาศัยการจับกันของสี Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (Serva Blue G) กับโปรตีน โดยสีจะมี 3 รูปแบบคือ cationic, neutral และ anionic ในสถานะที่เป็นกรด สีจาก red cationic form จะเปลี่ยนเป็น blue anionic form เมื่อมีการจับกับโปรตีน และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ anionic form ที่ 595 nm ซึ่งในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. เตรียม working solutions ประกอบด้วย

- Bradford working buffer 1X ที่กรองแล้ว
- Bovine Serum Albumin (BSA) เพื่อใช้เป็น สารโปรตีนมาตรฐาน (Protein standard ที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml หลุมละ 10 μ l
- โปรตีนตัวอย่าง (Protein samples) (ที่สกัดได้ 10 μ l ผสมน้ำกลั่น 90 μ l) 1:10 หลุมละ (10 μ l

2. เติม Bradford working buffer 1X ปริมาตร 200 μ l ลงใน สารโปรตีนมาตรฐาน (Protein

standard สร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) และ สารโปรตีนที่ต้องการทดสอบ (Protein samples) เพื่อวัดปริมาณโปรตีน โดย incubate ที่ room temperature เป็นเวลา 10 นาที และนำไป

วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm โดยสามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้จากกราฟมาตรฐาน และปรับให้ได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 30 ng/mL

7.3 การแยกโปรตีน (Protein separation) โดย (Gel electrophoresis)

การแยกโปรตีนโดย Gel electrophoresis เป็นเทคนิควิธีที่ใช้แยกสาร โดยขึ้นกับประจุ ขนาด และรูปร่างของสาร สารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวแตกต่างกัน ทำให้เคลื่อนตัวผ่านสนามไฟฟ้าด้วยความเร็วแตกต่างกัน นิยมใช้แยกสารที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เป็นเทคนิควิธีแยกโปรตีนโดยอาศัยขนาดของโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยมี SDS ซึ่งเป็น detergent ที่ช่วยให้โปรตีนอยู่ในสถานะ denaturing และมี DTT (1,4-Dithiothreitol) (ที่เติมลงไป ช่วยให้โปรตีนแยกตัวออกเป็นสายเดี่ยว สามารถเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า จากขั้วลบ

)Cathode(ไปยังขั้วบวก)Anode ผ่าน (discontinuous polyacrylamide gel ประกอบด้วย gel 2 ชนิด คือ stacking gel และ separating gel โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1.เตรียมสารที่ใช้ในการวิจัย)working solutions(

1.1 นำโปรตีนตัวอย่าง (Protein samples) มาเติม DTT loading dye (อัตราส่วน1:1) และนำไป incubate ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที

1.2 เตรียม 5% stacking gel และ 10% separating gel ตามตารางที่ 4

1.3 เตรียม 1X running buffer pH 8.75

2. Load โปรตีนแต่ละตัวอย่าง และ Ladder protein ลงหลุมเจล และรันแยกโปรตีนบน stacking gel โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 70 V เป็นเวลา 30 นาที

3. แยกโปรตีนเป้าหมาย)target proteins(บน separating gel ที่ 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

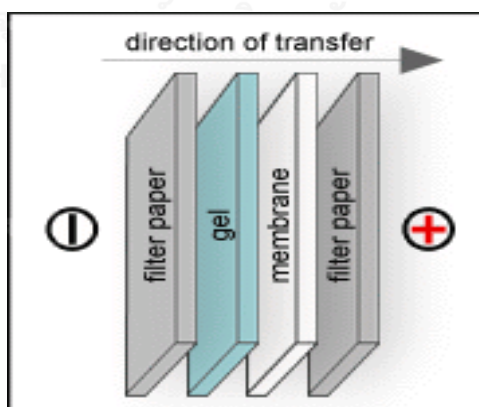
ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม stacking gel และ separating gel

สารเคมี	5% stacking gel (ml)	10% separating gel (ml)
Milli Q water	2.149	4.788
40% Acrylamide	0.375	2.5
1.0 M Tris, pH 6.8	0.38	-
1.0 M Tris, pH 8.8	-	2.5
10% SDS	0.03	0.1
10% Ammonium persulfate (APS)	0.06	0.1
<i>N,N,N',N'</i> -tertramethylenediamine (TEMED)	0.004	0.008

7.4 การโอนถ่ายโปรตีน)Protein transfer(โดย Electrotransfer

หลังแยกโปรตีนด้วยgel electrophoresis โปรตีนบนแผ่นเจลจะถูกเคลื่อนย้ายต่อไปยังแผ่น polyvinylidene difluoride)PVDF(membrane เพื่อตรวจสอบด้วย specific antibodies ที่จำเพาะต่อไป โดยการโอนถ่ายโปรตีนมีขั้นตอนดังนี้

1. นำ PVDF membrane มาแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างใน cold transfer buffer
2. นำกระดาษกรอง และแผ่นฟองน้ำ มาแช่ใน cold transfer buffer เป็นเวลา 10 นาที
3. นำแผ่นเจลที่แยกโปรตีนแล้ว มาตัดตามขนาดของโปรตีนเป้าหมาย ใช้ transfer buffer หล่อเจลไว้ไม่ให้แห้ง
4. นำมาประกบรวมกันเป็น transfer sandwich ดังภาพที่ 24 โดยประกบจากฝั่งขั้วลบ cathode)-(หรือฝั่งสีดำ ไปยังฝั่งขั้วบวก anode)+(หรือฝั่งสีแดง
5. นำตัว transfer sandwich ที่ประกบเสร็จใส่ลงใน transfer chamber และเติม transfer buffer ที่แช่เย็นไว้ เพื่อรักษาอุณหภูมิให้ต่ำ เนื่องจากระหว่างการ transfer จะเกิดความร้อนสูงมาก เป็นสาเหตุทำให้โปรตีนถูกทำลายได้
6. transfer protein ด้วยความต่างศักย์ 120 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจาก transfer โปรตีนจะถูกย้ายจาก separating gel มายังแผ่น PVDF membrane นำแผ่น membrane มาแช่ใน TBS-T buffer เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการ blocking ต่อไป



ภาพที่ 22 ลักษณะการประกบของ transfer sandwich (62)

7.5 Blocking

เป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากบนแผ่น membrane หลังจากการ transfer มีพื้นที่ให้ antibodies มาจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific มาก การนำ (5% non-fat dry milk มาใช้จึงช่วย block สิ่งที่อยู่บนพื้นที่ว่างบนแผ่น membrane ได้ ช่วยป้องกันการเกิดการจับกันระหว่างโปรตีน และ antibodies แบบ non-specific ซึ่งขั้นตอนการ blocking มีวิธีดังต่อไปนี้

1. นำแผ่น PVDF membrane มาแช่ใน 5% non-fat dry milk (ที่ dilute ใน 1X TBS-T) ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน shaker
2. เมื่อครบเวลา ล้างแผ่น PVDF membrane ด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

7.6 Primary/Secondary antibody probing

โปรตีนเป้าหมาย (target proteins) จะตรวจพบได้จากการ probe ด้วย primary และ secondary antibodies โดย Primary antibody จะจับกับโปรตีนเป้าหมาย และการจับกันนี้จะเองจะเป็น target ให้ secondary antibody ที่ conjugate ด้วย horseradish peroxidase (HRP) มาจับ ได้ โดยขั้นตอนการ probe มีดังต่อไปนี้

1. ทำการเตรียม BSA ละลายใน TBS-T เพื่อใช้ในการ dilute antibodies
2. เตรียม Primary antibodies (1:2000) = primary antibodies 2.5 μ l + BSA 5 ml และ Secondary antibody 1:2000(= secondary antibody 2.5 μ l + BSA 5 ml เก็บไว้ที่ 4°C
3. นำแผ่น PVDF membrane มา probe แช่ใน Primary antibody solution ที่อุณหภูมิ 4°C

overnight

4. เมื่อครบเวลา นำแผ่น PVDF membrane มาล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
5. และนำแผ่น PVDF membrane มาแช่ใน secondary antibody solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 45 นาที

ตารางที่ 5 Primary antibodies ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

Primary antibodies	Molecular weight (kDa)	ชนิดของ antibodies
β -actin (13E5)	45	Rabbit
GSK-3 β (D5C5Z)	46	Rabbit
Phospho-GSK3- β (Ser9) (D85E12)	46	Rabbit

7.7 Detection and Analysis

หลังการ probe ด้วย primary และ secondary antibodies แล้ว ทำการตรวจวัดการ แสดงออกของโปรตีน โดยใช้ Chemiluminescence detector และใช้ beta actin เป็น internal control โดยมีวิธีการดังนี้

1. เตรียม Chemiluminescence detection reagent = Solution A Luminol enhancer และ Solution B Peroxide solution อัตราส่วน)1:1(
2. หยด detection reagent ที่เตรียมไว้ลงบนแผ่น PVDF membrane แล้วนำเข้าเครื่อง gel doc และอ่านผลโดยใช้โปรแกรม GeneSnap)SynGene version 7.12.06(บันทึกภาพ band โปรตีน
3. ทำการวัด band intensity เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนเชิงปริมาณโดยใช้ โปรแกรม GeneTools)SynGene(

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากพลูควาจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย)Mean±SEM (

2. การทดสอบฤทธิ์ของรูตินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ด้วยวิธี trypan blue exclusion จะวิเคราะห์ค่าความแตกต่างระหว่างเซลล์ในกลุ่มทดสอบ และกลุ่มควบคุม คือ negative control ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 สถิติที่ใช้ทดสอบคือ One-way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05) $p < 0.05$ (

3. การทดสอบฤทธิ์ของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ด้วยเทคนิค flow cytometry จะวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเซลล์ในกลุ่มทดสอบ และกลุ่มควบคุม คือ negative control ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 สถิติ One-way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05) $p < 0.05$ (

4. การแสดงออกของโปรตีน GSK-3 β และ p-Ser9 GSK-3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ภายหลังจากการทดสอบด้วยรูติน ด้วยวิธี Western blot จะแสดงผลเป็นภาพถ่าย chemiluminescent จากนั้นทำการวัดขนาด band intensity ด้วยโปรแกรม GeneTools และแสดงค่าความสัมพันธ์เป็นจำนวนเท่าของโปรตีน

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. ผลการตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว

สารสกัดพลูคาวด้วย 95% แอลกอฮอล์ เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 510 nm โดยค่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะรายงานในหน่วย mg โดยคำนวณเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin/ น้ำหนักของพลูคาวแห้ง)mg QE/g dried *H.cordata* extract(พบว่ามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพลูคาวเท่ากับ 231.21 ± 4.19 mg QE/g dried *H.cordata*

2. ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูควาดด้วยเทคนิค HPLC-MS

จากการวิเคราะห์สารสกัดพลูควาด (63) และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบและวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิคHPLC-MS พบว่าสารสกัดพลูควาด มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ อันได้แก่ quercetin และอนุพันธ์ กล่าวคือ hyperin, isoquercetin และ rutin ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูควาดด้วยเทคนิค HPLC-MS

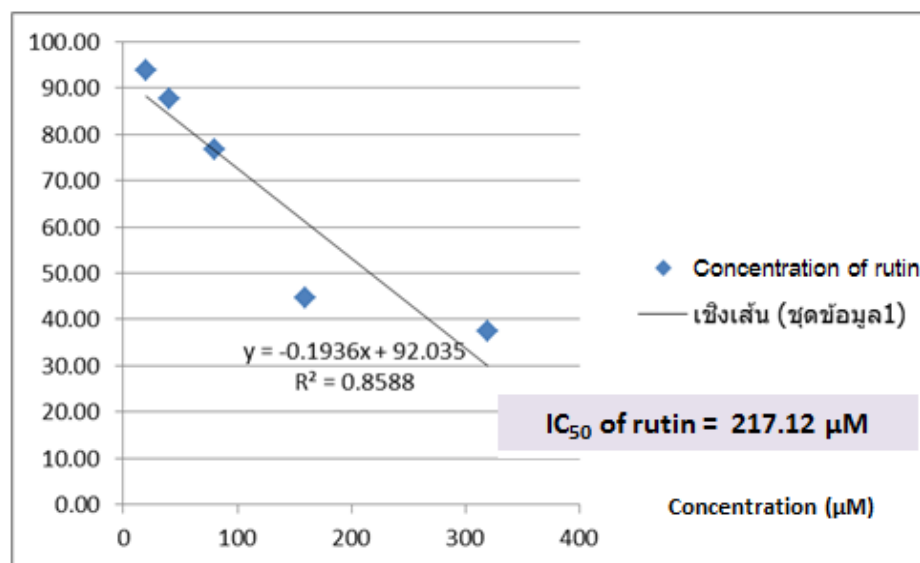
องค์ประกอบ	%w/w
Quercetin	0.34±0.02
Isoquercetin	1.10±0.03
Hyperin	6.35±0.41
Rutin	0.88±0.04

จะเห็นได้ว่า rutin พบปริมาณมากเป็นลำดับที่ 3 รองจาก hyperin และ isoquercetin ตามลำดับ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกสารรูตินมาทดสอบฤทธิ์ด้านต่างๆต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 เนื่องจากมีรายงานการวิจัยที่พบว่า hyperin ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แม้จะมีปริมาณมากที่สุดจากองค์ประกอบทั้งหมด แต่มีรายงานการวิจัยพบว่า รูตินมีความเกี่ยวข้องต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ยังมีการศึกษาในเชิงลึกกันน้อยมาก จึงได้เลือกรูตินมาทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ในด้านต่างๆต่อไป

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt-4

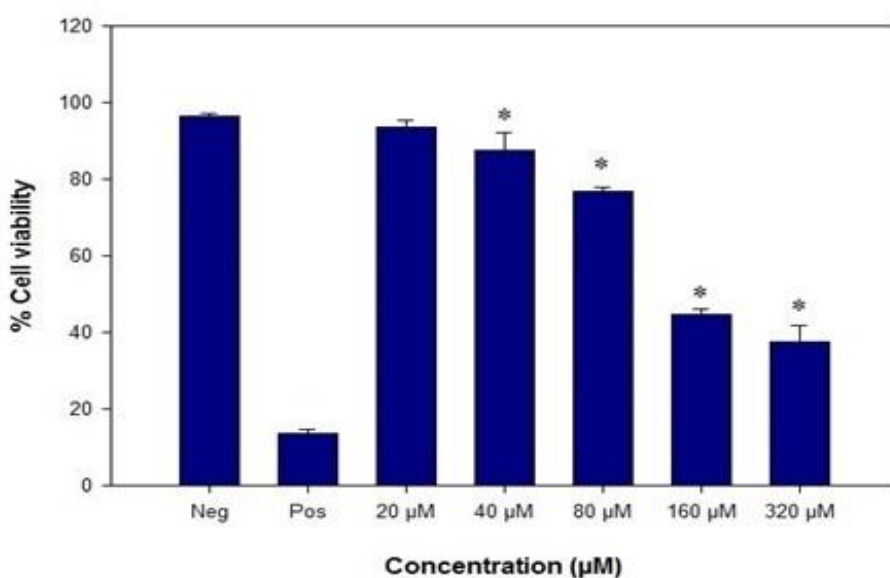
3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt-4 ด้วย trypan blue exclusion method

จากการนำ Molt-4 ไปทดสอบในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 wells plate) ด้วยสารรูตินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 20, 40, 80, 160 และ 320 μM โดยมีกลุ่มควบคุมคือ RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine 1 nM เป็น positive control ทำการ incubate ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตรวจนับด้วย trypan blue แล้วคำนวณหาค่า % Cell viability โดยสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรง พบว่าค่า IC_{50} ของรูตินอยู่ที่ 217.12 μM ดังภาพที่ 23 แต่เลือกใช้ความเข้มข้นของรูตินที่ 130 μM ในการทดสอบด้านต่างๆต่อไป เนื่องจากมีการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพิ่มเติมใน XTT assay ภาคผนวก) และมีผลการศึกษารูตินที่ให้ค่าความเข้มข้นของรูตินใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 23 ผลการคำนวณค่า IC_{50} ของรูติน จากสมการเส้นตรง ภายหลังจากการทดสอบสารรูตินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อ % cell viability ของเซลล์ Molt-4 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

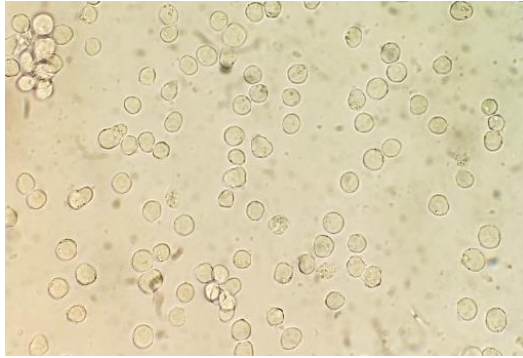
จากนั้นนำค่า % Cell viability จากวิธี trypan blue exclusion มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA พบว่าความเข้มข้นของรูตินที่ 40, 80, 160 และ 320 μM มี % Cell viability ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control ดังภาพที่ 24 หรืออาจกล่าวได้ว่ารูตินที่ความเข้มข้นดังกล่าว มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ได้



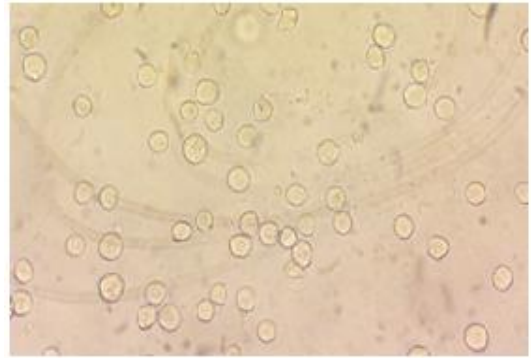
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูตินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt-4 ต่อ % cell viability ของเซลล์ Molt-4 ด้วยวิธี trypan blue exclusion โดย * แสดงระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p -value ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control

3.2 ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารรูติน โดยการนำเซลล์มาทดสอบกับสารรูตินที่ความเข้มข้น 130 μM ด้วยวิธี microscopic analysis ภายหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำเซลล์ไปตรวจดูด้วยกล้อง inverted microscope พบว่าในกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเซลล์ที่มี 0.1% DMSO negative control จะมีปริมาณของเซลล์มาก ขณะที่กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารรูติน จะมี (การลดลงของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง และสามารถพบลักษณะ membrane blebbing ของเซลล์ได้เช่นเดียวกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ vincristine 1 nM) positive control (โดยจะมีปริมาณของเซลล์ลดลงมากเมื่อเทียบกับ negative control ลักษณะ membrane blebbing ของเซลล์ที่ชัดเจน โดยในกลุ่มของ positive control ยังอาจพบเศษเซลล์ปริมาณมากภายหลังจากการตายแบบอะพอโทซิส ดังแสดงในภาพที่ 25

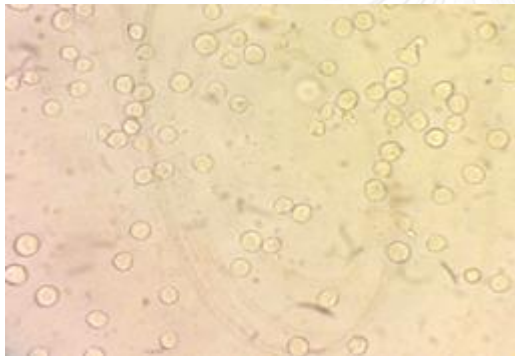
ก. Molt-4 ที่ไม่ได้รับสาร)negative control(
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



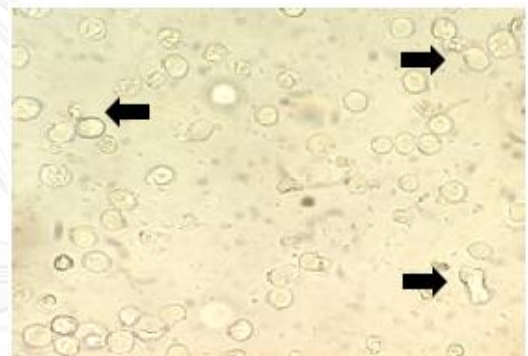
ง. Molt-4 ที่ไม่ได้รับสาร)negative control(
เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ข. Molt-4 ที่ได้รับ vincristine 1nM
)positive control(เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

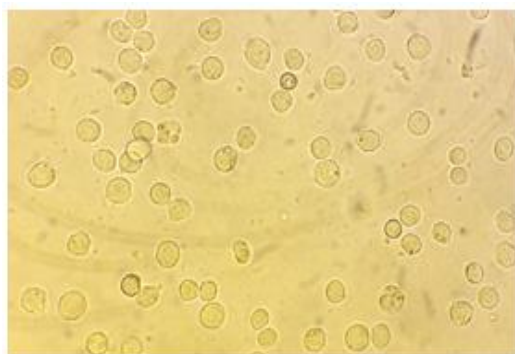


จ. Molt-4 ที่ได้รับ vincristine 1nM
)positive control(เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



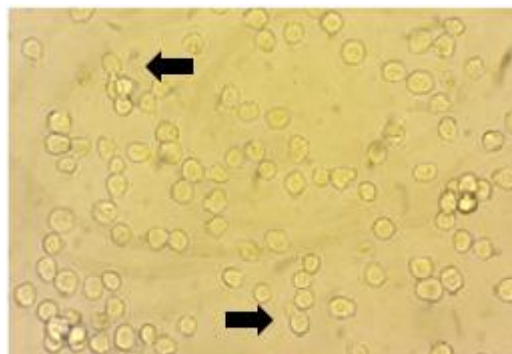
ค. Molt-4 ที่ได้รับสารรูตินิน 130 μM

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ฉ. Molt-4 ที่ได้รับสารรูตินิน 130 μM

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



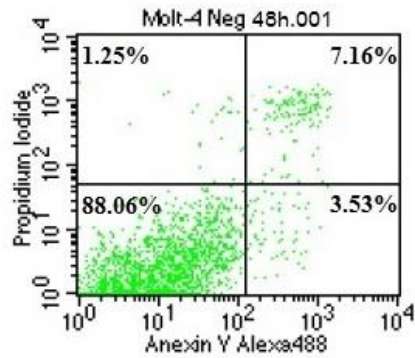
ภาพที่ 25 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรูตินินในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ด้วยวิธี microscopic analysis ภายหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงถึงลักษณะของ membrane blebbing ของ Molt-4 cells

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ของรูตินินในการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Molt-4 ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

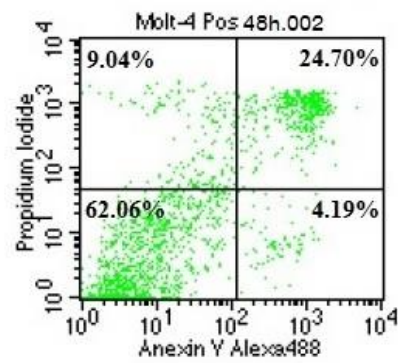
เมื่อทำการทดสอบบ่มเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสภาวะที่มีรูตินิน 130 μM และ RPMI -1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine 1nM เป็น positive control เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อครบเวลานำมาข้อมด้วย Annexin V-Alexa Flour 488 และ Propidium iodide แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ สามารถแบ่งกลุ่มเซลล์ได้เป็น กลุ่มเซลล์ที่มีชีวิต)Annexin V-/PI-(, กลุ่ม early apoptotic cell)Annexin V+/PI-(และกลุ่ม late apoptotic cell)Annexin V+/PI+(โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งไม่ขึ้นต่อกัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ที่ได้รับรูตินิน เกิดการอะพอโทซิสของเซลล์สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น negative control ดังแสดงในภาพที่ 26

ครั้งที่ 1

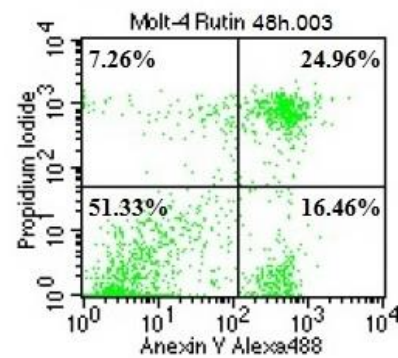
Negative control (0.1% DMSO)



Positive control (Vincristine 1nM)



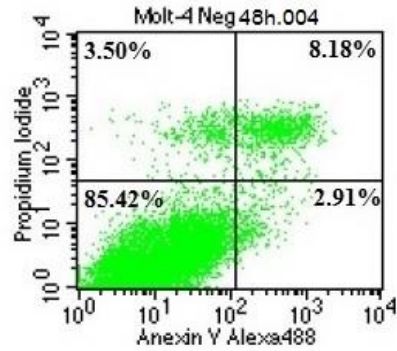
Rutin (130µM)



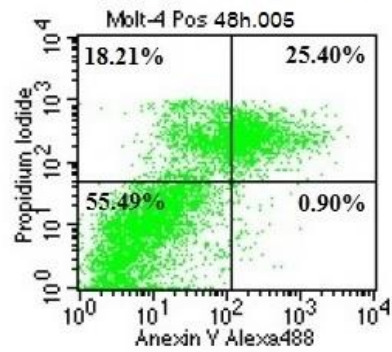
ภาพที่ 26-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิส ด้วยเทคนิค Flow cytometry แสดงปริมาณ apoptotic cells ของเซลล์ Molt-4 ภายหลังจากการทดสอบด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ครั้งที่ 1

ครั้งที่ 2

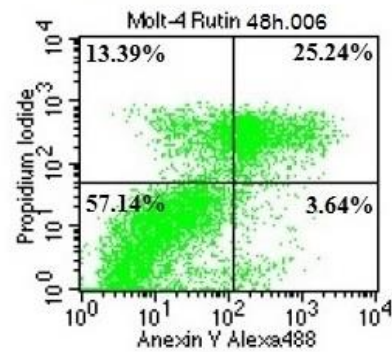
Negative control (0.1% DMSO)



Positive control (Vincristine 1nM)



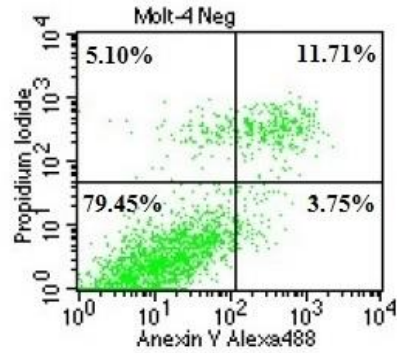
Rutin (130µM)



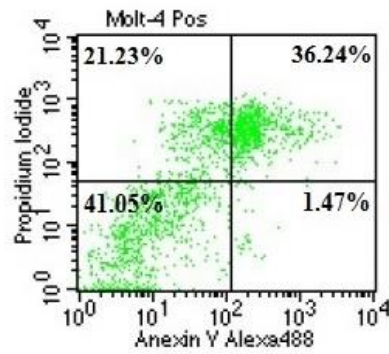
ภาพที่ 26-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิส ด้วยเทคนิค Flow cytometry แสดงปริมาณ apoptotic cells ของเซลล์ Molt-4 ภายหลังจากการทดสอบด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ครั้งที่ 2

ครั้งที่ 3

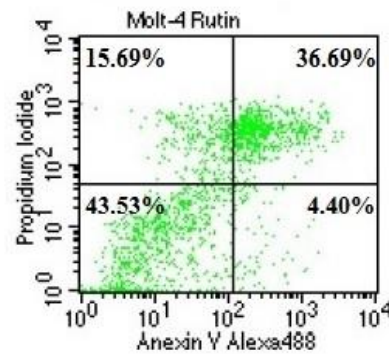
Negative control (0.1% DMSO)



Positive control (Vincristine 1nM)

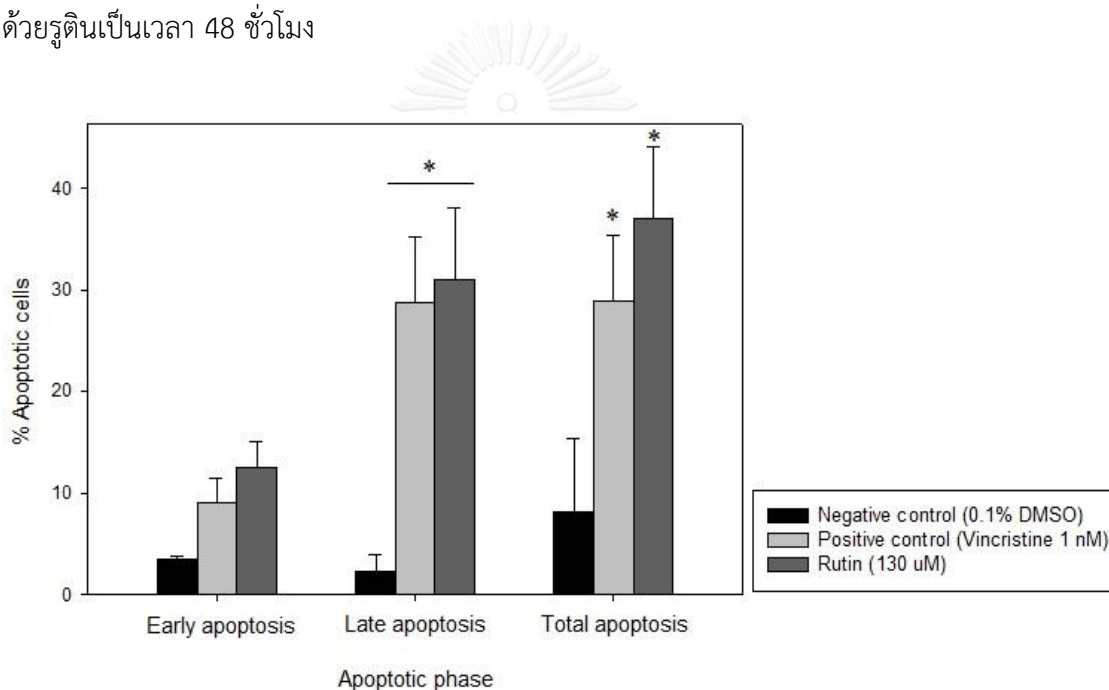


Rutin (130µM)



ภาพที่ 26-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะโพโทซิส ด้วยเทคนิค Flow cytometry แสดงปริมาณ apoptotic cells ของเซลล์ Molt-4 ภายหลังจากการทดสอบด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ครั้งที่ 3

จากนั้นนำค่า % apoptotic cells มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย One-way ANOVA พบว่าภายหลังจากการทดสอบผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสของ Molt-4 cells เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน early apoptosis ทั้งกลุ่ม positive control และ กลุ่มที่ทดสอบด้วยรูติน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ % apoptotic cells เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ขณะที่ late apoptosis และ Total apoptosis พบว่าทั้งกลุ่ม positive control และ กลุ่มที่ทดสอบด้วยรูติน พบว่า % apoptotic cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control แต่ในระหว่างกลุ่ม positive control และกลุ่มที่ทดสอบด้วยรูติน พบว่า % apoptotic cells ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ดังภาพที่ 27 หรือกล่าวได้ว่า รูตินสามารถชักนำการเกิดอะโพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt-4 ได้ภายหลังจากการทดสอบด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

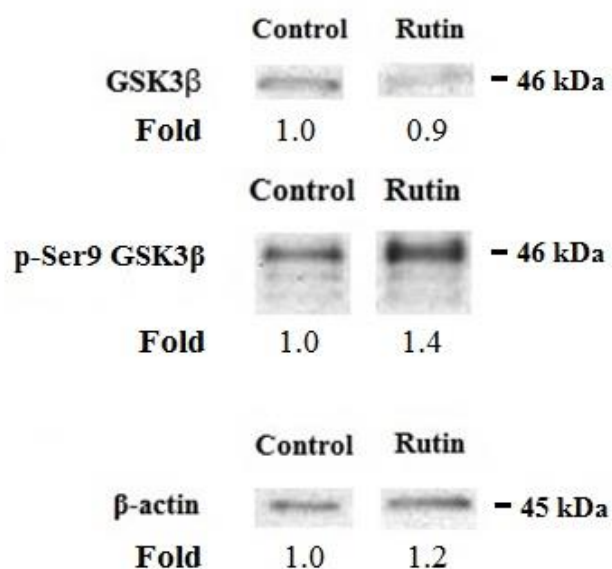


ภาพที่ 27 กราฟแสดงปริมาณ apoptotic cells ภายหลังจากการทดสอบเซลล์ Molt-4 ด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p -value ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control

5. ผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt-4 ด้วย Western blot analysis

จากการศึกษาวิจัยการแสดงออกของโปรตีน GSK3 β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt-4 หลังทำการ treat ด้วยรูติน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis และทำการวัดสัดส่วนการแสดงออกของโปรตีน)band intensity(โดยมี β -actin เป็น internal control

ภายหลังการทดสอบด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของ GSK3 β ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็น negative control (0.1% DMSO) โดยมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า)fold(เท่ากับ 0.9 เท่า แต่การแสดงออกของ GSK3 β)p-Ser9เพิ่มขึ้น โดยมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า)fold(เท่ากับ 1.4 เท่า เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น รูตินสามารถชักนำการตายแบบอะพอโทซิส โดย induce GSK3 β ให้เข้ามามีส่วนร่วมในการทำงานในกระบวนการอะพอโทซิสได้ ทำให้มีการแสดงออกของ GSK3 β ที่ลดลง ในขณะที่เซลล์ส่วนใหญ่ถูกชักนำให้เกิดอะพอโทซิสไป ทำให้ GSK3 β)p-Ser9 คงมีปริมาณสูงอยู่ใน (cytoplasm เมื่อเทียบกับกลุ่ม negative control ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า ดังแสดงผลได้ในภาพที่ 28



ภาพที่ 28 ผลการแสดงออกของโปรตีน GSK3β และ p-Ser9 GSK3β ภายหลังจากทดสอบ Molt-4 cells ด้วยรูตินที่ความเข้มข้น 130 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis เพื่อศึกษาผลรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3β ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt-4

โดย GSK3β = Glycogen synthase kinase-3β
 p-Ser9 GSK3β = Phosphorylation กรดอะมิโน Serine ตำแหน่งที่ 9 ของ Glycogen synthase kinase-3β

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในปัจจุบันทั้งการปลูกถ่ายไขกระดูก การใช้ยาเคมีบำบัด และรังสีรักษา จัดว่าเป็นวิธีการรักษาหลักสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL) Acute lymphoblastic leukemia แต่ให้ผลข้างเคียงกับผู้ป่วยที่สูง (โดยปลูกถ่ายไขกระดูก ต้องหาผู้บริจาคที่มีความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ แล้ว ขณะทำก่อนทำการรักษา ยังต้องให้ยากดภูมิคุ้มกัน ทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย ส่วนการให้ยาเคมีบำบัด นอกจากจะทำลายเซลล์มะเร็งแล้ว ยังทำลายเซลล์ปกติของผู้ป่วย ดังจะเห็นได้จากอาการของผู้ป่วย ได้แก่ ผมร่วง อาเจียน ท้องเสีย อ่อนเพลีย และติดเชื้อได้ง่าย หรือการฉายรังสีพลังงานสูง อาจทำให้ผู้ป่วยแพ้บริเวณผิวหนังได้ ทั้งในผู้ป่วยบางรายต้องใช้วิธีการรักษาหลายวิธีร่วมกัน ทำให้ปัจจุบันสมุนไพรได้เข้ามามีบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งต่างๆมากขึ้น เช่น สารสกัดจาก *Catharanthus roseus* หรือ แพงพวยฝรั่ง ได้ถูกนำมาสกัดเป็นสารตั้งต้นหลักของการทำยาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันอย่าง vincristine และ vinblastine เป็นต้น (64) โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid) ในสารสกัดพลูควาด้วย (แอลกอฮอล์ 95% โดยวิธี aluminium chloride colorimetric assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 231.21 ± 4.19 mg QE/g dried *H.cordata* ซึ่งให้ปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย พบว่าสารสกัดพลูควาด้วยแอลกอฮอล์ 95% ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 258.12 ± 8.78 mg QE/g dried *H.cordata* และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (5) และเมื่อทราบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูควาด้วยแล้ว จึงทำการศึกษาองค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์หลักที่พบในสารสกัดพลูควาด้วยเทคนิค HPLC-MS พบว่ามีสาร quercetin และอนุพันธ์ กล่าวคือ hyperin, isoquercetin, rutin และ quercetin เป็นองค์ประกอบโดยมีสัดส่วน %w/w จากมากไปน้อยตามลำดับ โดยพบว่า rutin มีสัดส่วนมากเป็นลำดับ 3 โดยมีปริมาณ 0.88 ± 0.04 %w/w ขององค์ประกอบทั้งหมด รองจาก hyperin และ isoquercetin ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Ryun Hee Kwon และ Bae Jin Ha ในด้านชนิดของสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบของพลูควาด้วย ประเทศเกาหลี โดยพบว่ามี rutin, quercetin และอนุพันธ์ของ quercetin เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ในด้านของการนำมาศึกษาต่อกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ผู้วิจัยจึงนำrutinซึ่งเป็นสารสังเคราะห์มาทำการศึกษา เนื่องจากจะให้ผลที่

ชัดเจน อีกทั้งการนำรูตินที่วิเคราะห์แล้วพบว่า เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดพลูควานั้น จะต้องผ่านกระบวนการ purification ก่อน จึงจะสามารถนำมาใช้ได้เป็นลำดับต่อไป ทั้งนี้รูตินเป็นสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีรายงานว่ามียุทธศาสตร์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง แต่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ (normal cells)(65) โดยจากการศึกษาวิจัยของ Alonso-Castro และคณะพบว่า รูติน มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งลำไส้ SW480 ในหนู nude mice โดยลดปริมาตรและน้ำหนักของก้อนมะเร็งลงได้ (66) แต่อย่างไรก็ตาม ในด้านของโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยานั้น ยังมีรายงานวิจัยค่อนข้างจำกัด และยังขาดการศึกษาในเชิงลึก

ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของรูตินต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลมฟอยด์ชนิด T cells)T-ALL(ซึ่งเป็นโรคที่เกิดขึ้นจาก Thymocyte ใน Thymus มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง เกิดการสร้างเซลล์ชนิดลิมโฟบลาสต์ตัวอ่อน)lymphoblast(ออกมามากกว่าปกติ และไม่สามารถเจริญเป็นตัวแก่)mature(ได้ ทำให้ไปเบียดการสร้างเซลล์เม็ดเลือดปกติทุกชนิดทั้งเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด เป็นโรคที่พบได้บ่อยในเด็ก ซึ่งสามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่ในผู้ใหญ่มักพบการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ทั้งยังพบอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็ง หรือเกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (41) จากการศึกษาฤทธิ์ของรูตินต่อการยับยั้งการเจริญของ Molt-4 ด้วยวิธี trypan blue exclusion method พบว่ารูตินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งในสายลมฟอยด์ และสายลมยอิลอยด์ได้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดในสายลมฟอยด์ เมื่อเวลาผ่านไป จัยขชั่วโมงได้ สอดคล้องกับงานวิ 48อง Ezzeddine Bourogaa และคณะ ที่พบว่ารูตินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสาย myeloid ได้เช่นกัน (33)

เลือดขาวจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของรูตินในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ด ด้วยวิธีmicroscopic analysis พบว่าเซลล์ที่ได้รับรูตินที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ)negative control(และพบว่าที่ 48 ชั่วโมง สารรูตินให้ลักษณะ membrane blebbing เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก)positive control(ที่ให้ (vincristine อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลของพืชสมุนไพร *Pupalia lappacea* ที่พบว่ามียุทธศาสตร์หลักในสารสกัดเป็นสารรูติน โดยทำให้ K562 leukemia cell เกิดการ blebbing ของ membrane เมื่อตรวจด้วย inverted microscope เช่นเดียวกัน (18)

ทั้งนี้เมื่อทราบว่ารูตินสามารถยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 จึงศึกษาผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะโพโทซิส)apoptosis ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 ด้วยเทคนิค flow cytometry โดยการย้อมสี Annexin V-Alexa 488 และ Propidium

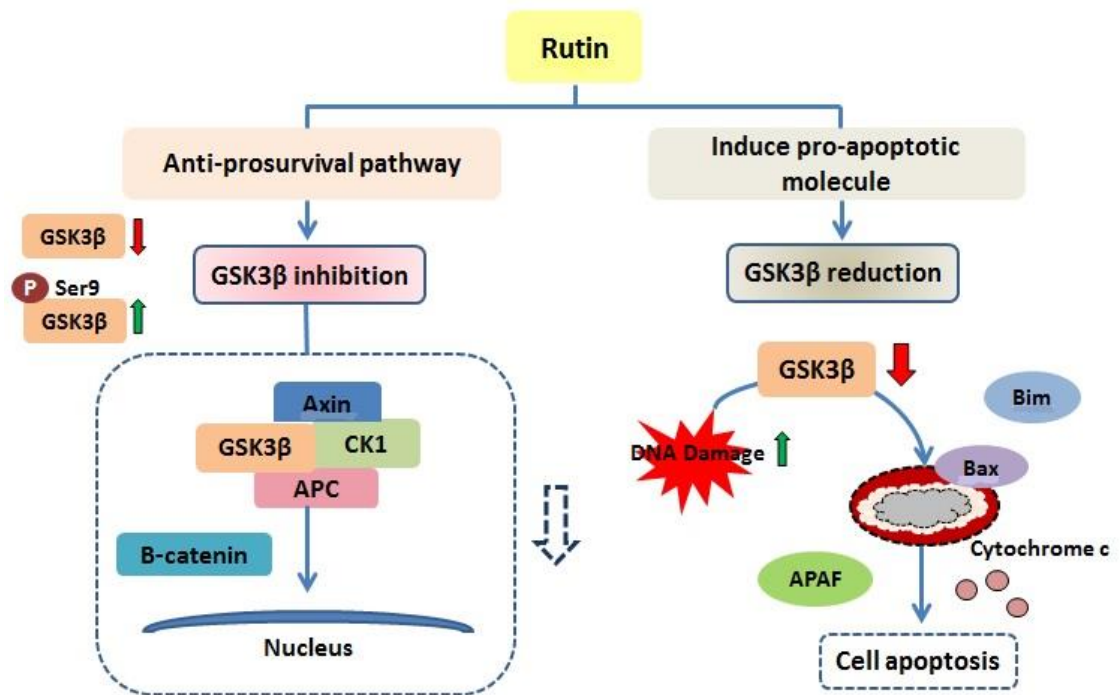
iodide)PI(พบว่ารูตินที่ความเข้มข้น 130 μM สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-4 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงได้ ซึ่งการตายแบบอะโพโทซิสสามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะคือ ระยะต้น)early apoptosis(เซลล์จะมีการยื่นตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ออกมา)membrane blebbing(และระยะหลัง)late apoptosis(เซลล์จะมีการดำเนินการตายมาก () ขึ้น โดยจะพบเศษเซลล์จำนวนมาก และดีเอ็นเอภายในถูกทำลาย DNA fragmentation(ซึ่งการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ravi A และคณะ ที่พบว่า รูติน เป็นองค์ประกอบที่พบได้ในสารสกัดเอทานอลของ *Pupalia lappacea* มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสผ่านทางวิถีภายในของ K562 cells ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ แต่ในส่วนของการทดลองของคณะวิจัยเขาพบว่า รูตินจะกระตุ้นการเกิด apoptosis ผ่าน p53 ซึ่งเป็น proapoptotic factor ให้สูงขึ้น มีผลทำให้ทั้ง Bax/Bcl2/ ratio มีค่าสูงขึ้น)Bax : โปรตีนที่ชักนำให้เกิดการอะโพโทซิส, Bcl2 : โปรตีนที่ช่วยให้เซลล์อยู่รอดนอกจากนี้รูตินยังทำให้ (mitochondrial membrane potential ลดลง ซึ่งเป็นสัญญาณบ่งชี้ว่าเซลล์เกิดการตายแบบอะโพโทซิสในระยะต้นแล้วทำให้เกิดการกระตุ้นการปลดปล่อย cytochrome c และ caspase ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (18)

จากการศึกษาข้อมูลพบว่า GSK3 β นอกจากเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ใน Canonical Wnt pathway ยังมีความเกี่ยวข้องกับวิถีการตายของเซลล์อีกด้วย (49) โดยศึกษาผลของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสว่ามีความเกี่ยวข้องกับสัญญาณ GSK3 β หรือไม่ ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของสัญญาณ GSK3 β ภายหลังจากการทดสอบ Molt-4 ด้วยรูตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า การแสดงออกของ GSK3 β ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ)negative control(ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารูตินชักนำการตายแบบอะโพโทซิสผ่านทางวิถีภายใน (intrinsic apoptotic pathway โดยผ่านสัญญาณ (GSK3 β ได้ เมื่อเกิด DNA Damage ขึ้น รูตินจะชักนำโปรตีน GSK3 β ซึ่งทำหน้าที่เป็น pro-apoptotic molecule ให้เข้าจับกับโปรตีน Bax และ Bim ในไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการกระตุ้นวิถีสัญญาณอะโพโทซิส และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ทั้งนี้ GSK3 β ถูกควบคุมโดยกระบวนการ phosphorylation เมื่อ GSK3 β ลดลง เนื่องจากมีการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสของเซลล์บางส่วน ทำให้ inactive form ของ GSK3 β)p-Ser9(มีปริมาณมากกว่ากลุ่มเซลล์ควบคุม ซึ่งมีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า จึงอาจกล่าวได้ว่า รูตินสามารถยับยั้ง pro-survival pathway ได้ เนื่องจาก p-Ser9 GSK3 β ซึ่งอยู่ใน cytoplasm ไม่ถูกนำไปใช้เพื่อความอยู่รอดของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ผลการวิจัยสอดคล้องกับการศึกษาของรูตินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ ของ Ezzeddine Bourogaa และคณะ พบว่า รูตินสามารถลดการแสดงออกของสัญญาณ GSK3 β และชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด

ชาวชนิด U937 ได้ และยังพบว่า p-Ser9 GSK3 มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และขณะเดียวกัน p-Ser473 Akt ซึ่งเป็น active form ของ Akt และเป็นตัวเติมหมู่ phosphate ให้กับ Ser9 ของ GSK3 β (kinase of Ser9 GSK3 β สูงขึ้นตามไปด้วย จึงอาจกล่าวได้ว่า รุตินสามารถชัก () นำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิส และยับยั้งวิถีสัญญาณการเจริญ pro-survival pathway ได้ ((33)

อย่างไรก็ตามบทบาทของ รุติน อาจจะมีการทำงานคล้ายกับตัวยับยั้งสัญญาณ GSK3 β (GSK3 β inhibitor แต่ในเชิงกลไกการออกฤทธิ์มีความแตกต่างกันในแต่ละวิถีสัญญาณ จาก (การศึกษาของ Mohammad reza และคณะ ที่พบว่า SB-415286 และ LiCl เป็นสารที่ใช้ยับยั้งสัญญาณ GSK3 β ได้ โดยชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านทางวิถีภายใน)intrinsic apoptotic pathway หรือ mitochondria-dependent pathway (48) (ซึ่งเมื่อ DNA ของเซลล์ถูกทำลาย จะทำให้เกิดการหยุดของวัฏจักรของเซลล์)cell cycle arrestหรือทำให้เกิดการตายแบบอะพอ (ทซิสในที่สุด (67) จากงานวิจัยของ Xuejuan Gao และคณะ พบว่า p-Ser9 GSK3 β ซึ่งเป็นตัวควบคุมการทำงานของ GSK3 β สามารถกระตุ้น pro-apoptotic signal โดยชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอโทซิสผ่าน NF- κ B pathway (68) หรือการศึกษาวิจัยของ Yuki Yoshino และคณะ พบว่า GSK3 β ซึ่งมีบทบาทควบคุมการทำงานของ centrosome เพื่อให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ แต่เมื่อยับยั้งสัญญาณ GSK3 β ด้วย AR-A014418 ในเซลล์มะเร็งแล้วทำให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งตัวแบบ mitosis เนื่องจากทำให้ centrosome มีความผิดปกติจนไม่สามารถสร้าง mitotic spindle fibers ที่ใช้ในกระบวนการแบ่งเซลล์ ยังผลให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิสในที่สุด (69)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า รุตินมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลิมโฟบลาสต์ชนิด T-ALL หรือ Molt-4 cells และสามารถชักนำการตายแบบอะพอโทซิสผ่านสัญญาณ GSK3 β ได้ โดยมีบทบาทในการ induce โปรตีน GSK3 β ให้เข้าร่วมในกระบวนการอะพอโทซิส และอาจยับยั้ง pro-survival pathway จากการพบปริมาณ p-Ser9 GSK3 β อยู่สูงใน cytoplasm ซึ่งสามารถสรุปได้เป็นแผนภูมิได้ดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และบทบาทของรูตินต่อการชักนำการตายแบบอะพอโทซิส และการยับยั้ง pro-survival pathway ในสัญญาณ GSK3 β

ดังนั้น จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ รูติน และพืชสมุนไพรพลูคาว จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรไทย และเป็นประโยชน์ต่อการนำรูตินไปพัฒนายาเพื่อใช้ร่วมรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง อีกทั้งยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ความเข้าใจเชิงลึกด้านฤทธิ์ของรูตินต่อกลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัย หากต้องการทราบกลไกการออกฤทธิ์ของรูตินที่ชัดเจนมากขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง *in vivo model* (โดยจากผลการศึกษาที่พบว่า สารรูตินสามารถชักนำการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันสายลมพอยด์ผ่านสัญญาณ GSK3 β ได้นั้น อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการรตายแบบอะพอโทซิสเพื่อทราบกลไกในระดับลึกต่อไป และสามารถนำผลการศึกษาในครั้งนี้มาประยุกต์พัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพตัวใหม่ จากพืชสมุนไพรไทย เพื่อนำมาร่วมรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล. ระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ใหญ่ : ระบาดวิทยาเชิงพรรณนา. วโรคมะเร็ง. 2553;30(2).
2. Carballido E, Veliz M, Komrokji R, Pinilla-Ibarz J. Immunomodulatory drugs and active immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control*. 2012;19(1):54-67.
3. Roberts DA, Wadleigh M, McDonnell AM, DeAngelo DJ, Stone RM, Steensma DP. Low efficacy and high mortality associated with clofarabine treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*. 2014.
4. Prommaban A, Kodchakorn K, Kongtawelert P, Banjerdpongchai R. Houttuynia cordata Thunb fraction induces human leukemic Molt-4 cell apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(5):1977-81.
5. Chaowanee Wangchaoy SC. Effects of Houttuynia cordata Thunb extract, Isoquercetin and Rutin on cell growth inhibition and apoptotic induction in K562 human leukemic cells. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2012;4(5):2590-8.
6. จิรายุ เอื้อวรากุล. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. อ.รุ่งเรืองการพิมพ์2552.
7. Society AC. Typical treatment of acute lymphocytic leukemia. 2014.

8. Kim CF, Dirks PB. Cancer and Stem Cell Biology: How Tightly Intertwined? *Cell Stem Cell*. 2008;3(2):147-50.
9. T. Khuhaprema PA HSS, Sangrajrang S. . Cancer in Thailand 2007-2009. National Cancer Institute Bangkok, Thailand 2013.
10. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol*. 2001;2(7):429-36.
11. Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(3):295-9.
12. Erwinaze. Erwinaze (Asparaginase Erwinia Chrysanthemi) - Treatment for ALL, United States of America 2012 [updated 2016; cited 2016]. Available from: <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/erwinaze-asparaginase-erwinia-chrysanthemi/erwinaze-asparaginase-erwinia-chrysanthemi1.html>.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
14. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;184(1-2):16-20.
15. INSTITUTE NNC. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment U.S. Department of Health and Human Services 2016 [updated December 16, 2015; cited 2016 01/02/2016]. Available from: http://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq#section/_1.

16. Chao MW, Lai MJ, Liou JP, Chang YL, Wang JC, Pan SL, et al. The synergic effect of vincristine and vorinostat in leukemia in vitro and in vivo. *J Hematol Oncol.* 2015;8:82.
17. Philadelphia chromosome [Internet]. 2015 [cited 10 Jan, 2016]. Available from: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44179>.
18. Ravi A, Alvala M, Sama V, Kalle AM, Irlapati VK, Reddy BM. Anticancer activity of *Pupalia lappacea* on chronic myeloid leukemia K562 cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012;20(1):86-.
19. Kumar M, Prasad SK, Hemalatha S. A current update on the phytopharmacological aspects of *Houttuynia cordata* Thunb. *Pharmacognosy Reviews.* 2014;8(15):22-35.
20. สถาบันวิจัยสมุนไพร. ผักคาวตอง 2558 [7 มกราคม 2558]. Available from: http://dmisc2.dmisc.moph.go.th/webroot/Plant/MPRI2013/O_Houttuynia.shtm.
21. Kim D, Park D, Kyung J, Yang Y-H, Choi E-K, Lee Y-B, et al. Anti-inflammatory effects of *Houttuynia cordata* supercritical extract in carrageenan-air pouch inflammation model. *Laboratory Animal Research.* 2012;28(2):137-40.
22. Chaiyasut C, Kusirisin W, Lailerd N, Lerttrakarnnon P, Suttajit M, Srichairatanakool S. Effects of Phenolic Compounds of Fermented Thai Indigenous Plants on Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM.* 2011;2011:749307.

23. Wang HY, Bao JL. Effect of *houltuynia cordata aetherolea* on adiponectin and connective tissue growth factor in a rat model of diabetes mellitus. *J Tradit Chin Med*. 2012;32(1):58-62.
24. Lai KC, Chiu YJ, Tang YJ, Lin KL, Chiang JH, Jiang YL, et al. *Houltuynia cordata* Thunb extract inhibits cell growth and induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 2010;30(9):3549-56.
25. Banjerdpongchai R, Kongtawelert P. Ethanolic extract of fermented *Thunb* induces human leukemic HL-60 and Molt-4 cell apoptosis via oxidative stress and a mitochondrial pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(11):2871-4.
26. Yang L, J.-G. Jiang. Bioactive components and functional properties of *Hottuynia cordata* and its applications. *JPharmaceutical Biology*. 2009;47(12):1154-61.
27. Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, et al. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*. 2005;19(5):895-909.
28. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med*. 2010;76(11):1044-63.
29. Skrzypczak-Pietraszek E, Pietraszek J. Seasonal changes of flavonoid content in *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae). *Chem Biodivers*. 2014;11(4):562-70.
30. Materska M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008;58(4):407-13.

31. Chen SF, Nien S, Wu CH, Liu CL, Chang YC, Lin YS. Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells. *J Chin Med Assoc.* 2013;76(3):146-52.
32. Dubber MJ, Kanfer I. High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in Ginkgo biloba solid oral dosage forms. *J Pharm Pharm Sci.* 2004;7(3):303-9.
33. Bourogaa E, Bertrand J, Despeaux M, Jarraya R, Fabre N, Payrastre L, et al. Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leukemia research.* 2011;35(8):1093-101.
34. Chen WY, Huang YC, Yang ML, Lee CY, Chen CJ, Yeh CH, et al. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. *Int Immunopharmacol.* 2014;22(2):409-13.
35. Moghbelinejad S, Nassiri-Asl M, Farivar TN, Abbasi E, Sheikhi M, Taghiloo M, et al. Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats. *Toxicol Lett.* 2014;224(1):108-13.
36. Lin JP, Yang JS, Lin JJ, Lai KC, Lu HF, Ma CY, et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ Toxicol.* 2012;27(8):480-4.
37. Perk AA, Shatynska-Mytsyk I, Gerçek YC, Boztaş K, Yazgan M, Fayyaz S, et al. Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. *Cancer Cell International.* 2014;14:124.

38. Choi KS, Kundu JK, Chun KS, Na HK, Surh YJ. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. *Arch Biochem Biophys*. 2014;559:38-45.
39. Cultures T. Rutin 2015 [30/02/2015]. Available from: <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals>.
40. Mason EF, Rathmell JC. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(4):645-54.
41. Winter E, Chiaradia LD, Silva AH, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB. Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: advantages of multi-target action. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(5):769-77.
42. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(5):330-49.
43. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, et al. Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/ β -catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia*. 2014;28(1):15-33.
44. Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-Catenin Signaling and Small Molecule Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*. 2012;19(4):634-64.
45. Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):581-93.

46. Rao TP, Kuhl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res.* 2010;106(12):1798-806.
47. Ng OH, Erbilgin Y, Firtina S, Celkan T, Karakas Z, Aydogan G, et al. Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal.* 2014;4:e192.
48. Mirlashari MR, Randen I, Kjeldsen-Kragh J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition induces apoptosis in leukemic cells through mitochondria-dependent pathway. *Leukemia research.* 2012;36(4):499-508.
49. Jacobs KM, Bhawe SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, Hallahan DE, Thotala D. GSK3beta: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:930710.
50. Schroeder JH, Bell LS, Janas ML, Turner M. Pharmacological inhibition of glycogen synthase kinase 3 regulates T cell development in vitro. *PLoS One.* 2013;8(3):e58501.
51. Weerkamp F, van Dongen JJM, Staal FJT. Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2006;20(7):1197-205.
52. Cao Q, Lu X, Feng YJ. Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res.* 2006;16(7):671-7.
53. Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, et al. Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci.* 2007;98(9):1388-93.
54. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-

mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(6):2076-81.

55. Hu Y, Gu X, Li R, Luo Q, Xu Y. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition induces nuclear factor-kappaB-mediated apoptosis in pediatric acute lymphocyte leukemia cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:154.
56. Gómez-Sintes R, Hernández F, Lucas JJ, Avila J. GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2011;4:45.
57. Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science.* 2015;9(4):449-54.
58. Dolan J. HPLC-MS 2015 [cited 2016 15/01/2016]. Available from: <http://www.sepscience.com/images/Articles/HPLCSol/05/Fig-1.jpg>.
59. Bauer JD, et al. Haemocytometer Cell Counting Chamber 1968 [cited 2016 15/01/2016]. Available from: http://openwetware.org/wiki/BISC220/S11:_Mod_3_Lab_8.
60. Biomol GmbH G. Annexin V Apoptosis Detection Kit 2015 [cited 2015 05/05/2015]. Available from: http://www.biomol.de/infos_imgenex.html?id=647.
61. Determination of apoptosis [Internet]. 2009 [cited 05/05/2015]. Available from: <http://www.ro-journal.com/content/4/1/58/figure/F1?highres=y>.

62. Project TCRW. Lab Protocol : Western blot London, UK2011 [cited 2011 11/01/ 2011]. Available from: <http://www.cardio-research.com/protocols/western-blot>.
63. Chanprasert S, Pawinwongchai J. Induction of apoptosis and cytokines secretion of *Houttuynia cordata* Thunb. flavonoids in human leukemic cells. *Planta Med.* 2014;80(16):P1C6.
64. Ahmad NH, Rahim RA, Mat I. *Catharanthus roseus* Aqueous Extract is Cytotoxic to Jurkat Leukaemic T-cells but Induces the Proliferation of Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Tropical Life Sciences Research.* 2010;21(2):101-13.
65. Kwon RH, Ha BJ. Increased Flavonoid Compounds from Fermented *Houttuynia cordata* using Isolated Six of *Bacillus* from Traditionally Fermented *Houttuynia cordata*. *Toxicological Research.* 2012;28(2):117-22.
66. Alonso-Castro AJ, Dominguez F, Garcia-Carranca A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Arch Med Res.* 2013;44(5):346-51.
67. Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, et al. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(12):7951-5.
68. Gao X, He Y, Gao L-M, Feng J, Xie Y, Liu X, et al. Ser9-phosphorylated GSK3 β induced by 14-3-3 ζ actively antagonizes cell apoptosis in a NF- κ B dependent manner. *Biochemistry and Cell Biology.* 2014;92(5):349-56.

69. Yoshino Y, Ishioka C. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta induces apoptosis and mitotic catastrophe by disrupting centrosome regulation in cancer cells. *Scientific reports*. 2015;5:13249.





ภาคผนวก

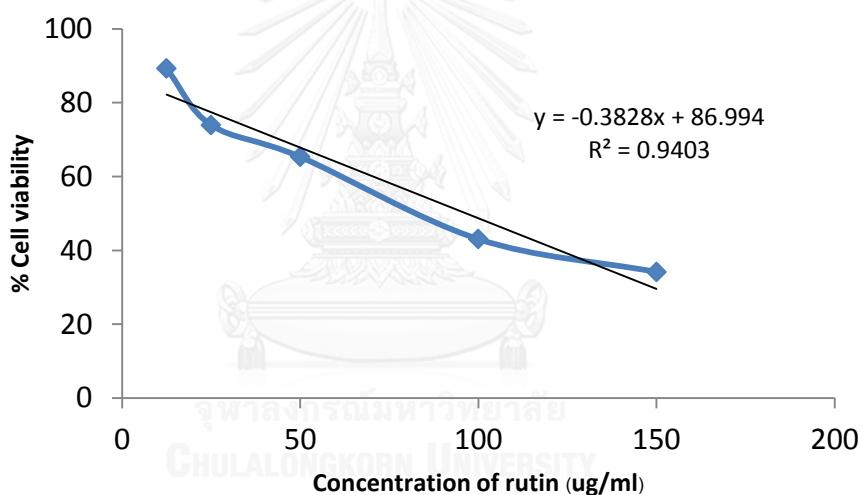
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.

ข้อมูลจากการทดลอง

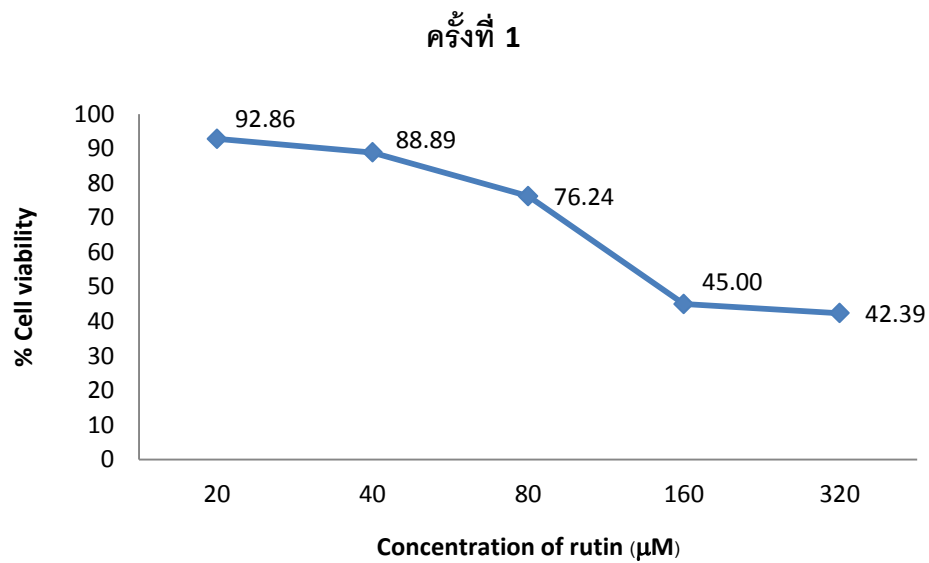
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของรูตินเพื่อเลือกนำมาใช้ในการทดสอบ

ก่อนการนำรูตินมาทดสอบกับ Molt-4 cells ด้านต่างๆ ได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพิ่มเติมโดยวิธี XTT assay โดยทดสอบระดับความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าค่า IC_{50} ของรูติน จากสมการกราฟเส้นตรง มีค่าเท่ากับ 96.64 ug/ml หรือคิดเป็น 158 uM ดังแสดงในภาพที่ 30 จึงทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่ำกว่าค่า IC_{50} ต่อไป

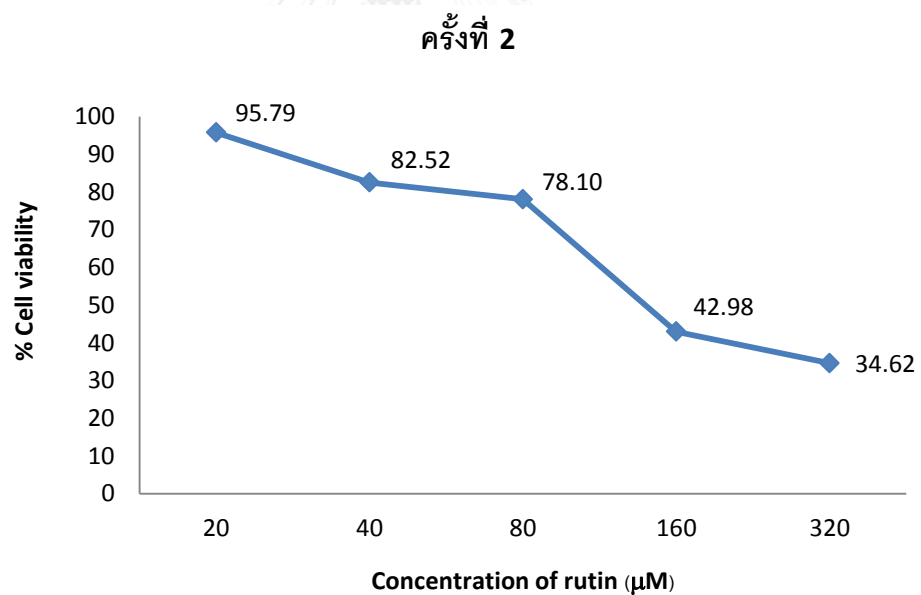


ภาพที่ 30 กราฟแสดงการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของรูติน ต่อ Molt-4 cells โดยวิธี XTT assay

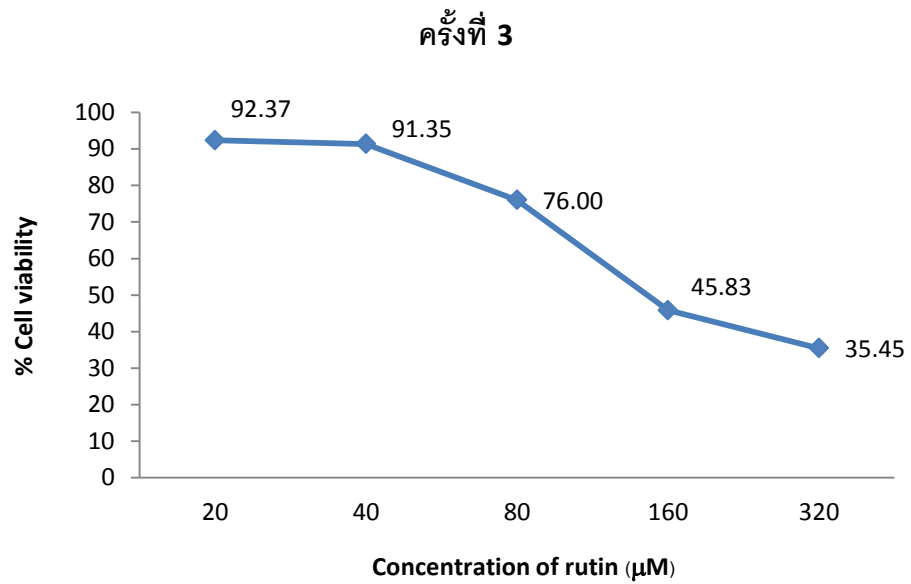
แต่การทดสอบฤทธิ์ของรูตินต่อการยับยั้งการเจริญของ Molt-4 cells ด้วยวิธี XTT assay มีค่าไม่คงที่ เนื่องจากสารรูตินเป็นสารสีเหลืองเข้ม จึงรบกวนการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer เนื่องจากปฏิกิริยาของวิธี XTT assay นั้นเมื่อสาร XTT ถูก reduce ด้วยเอนไซม์ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ จะให้สาร formazan ซึ่งมีสีส้ม ซึ่งมีสีใกล้เคียงกับสีเหลืองเข้มของรูติน ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดยวิธี trypan blue exclusion ซึ่งให้ค่าคงที่กว่า XTT assay โดยได้ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ดังภาพที่ 31



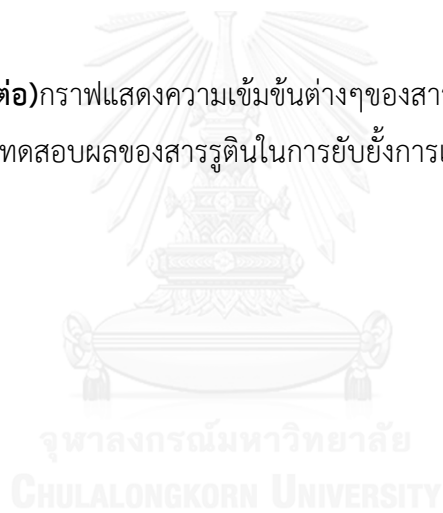
ภาพที่ 31-1 กราฟแสดงความเข้มข้นต่างๆของสารรูติน และ% cell viability ของ Molt-4 cells เมื่อทำการทดสอบผลของสารรูตินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Molt-4 cells ครั้งที่ 1



ภาพที่ 31-2 (ต่อ)กราฟแสดงความเข้มข้นต่างๆของสารรูติน และ% cell viability ของ Molt-4 cells เมื่อทำการทดสอบผลของสารรูตินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Molt-4 cells ครั้งที่ 2



ภาพที่ 30-3 (ต่อ)กราฟแสดงความเข้มข้นต่างๆของสารรูติน และ% cell viability ของ Molt-4 cells เมื่อทำการทดสอบผลของสารรูตินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Molt-4 cells ครั้งที่ 3



จากนั้นนำค่า % Cell viability จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อน ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 % Cell viability ของ Molt-4 cells เมื่อทดสอบกับรูตินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion

Cells treatment	% Cell viability (Mean±SEM)
Negative control	97 ± 0.73
Positive control	17 ± 5.40
รูตินที่ระดับความเข้มข้น 20 µM	94 ± 0.34
รูตินที่ระดับความเข้มข้น 40 µM	88 ± 4.55 *
รูตินที่ระดับความเข้มข้น 80 µM	77 ± 0.17 *
รูตินที่ระดับความเข้มข้น 160 µM	45 ± 1.47 *
รูตินที่ระดับความเข้มข้น 320 µM	37 ± 4.91 *

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากการทดลองที่ไม่ขึ้นต่อกัน

* = % Cell viability มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเซลล์

RPMI-1640	90	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	10	มิลลิลิตร
100x penicillin-streptomycin	1	มิลลิลิตร

สารละลาย XTT 1 mg/ml

XTT	5	มิลลิกรัม
RPMI-1640	5	มิลลิลิตร

Phosphate buffer saline

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม

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

สารเคมีสำหรับการสกัดโปรตีน: Nonidet-P40)NP-40(lysis buffer

lysis buffer	3	มิลลิลิตร	
1 mM DTT	30	ไมโครลิตร)DTT 1.3 มิลลิกรัม + น้ำ 84.27 ไมโครลิตร(
1 mM PMSF	30	ไมโครลิตร)PMSF 2.3 มิลลิกรัม + isopropanol(

สารเคมีสำหรับ Western Blot

1X Running buffer)pH 8.75(ปริมาตร 1 ลิตร)RT(

Tris	3.03	กรัม	=	25	mM
Glycine	14.42	กรัม	=	192	mM
SDS	1	กรัม	=	0.1	%

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

1X Transfer buffer)pH 8.75(ปริมาตร 1 ลิตร)4 °C(

Tris	3.03	กรัม	=	25	mM
Glycine	14.42	กรัม	=	192	mM
Methanol	200	มิลลิลิตร	=	20	%

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

1X TBS-Tween20)TBS-T(ปริมาตร 1 ลิตร)RT(

Tris-HCL)pH 7.5(2.42	กรัม			
NaCl	8.76	กรัม			
Tween-20 (ใส่ตอนที่ใช้งาน)	1	มิลลิลิตร	=	1	%

Blocking buffer)5% non-fat dry milk(

เนื่องจากหากเตรียมแล้วไม่สามารถเก็บไว้ใช้ได้อีก จึงควรเตรียมเท่าที่พอใช้ ดังนี้

Prepared volume	=	X	มิลลิลิตร
% non-fat dry milk	=	X/20	กรัม

สารเคมีสำหรับเตรียมเจล

Separating gel)100 มิลลิลิตร(10 %	12 %	
Water	4	3.3	มิลลิลิตร
30 % Polyacrylamide	3.3	4.0	มิลลิลิตร
1.5 M Tris)pH 8.8(2.5	2.5	มิลลิลิตร
10 % SDS	100	100	ไมโครลิตร
10 % APS	100	100	ไมโครลิตร
TEMED	4	4	ไมโครลิตร

Stacking gel) 3 มิลลิลิตร(5 %	
Water	2.1	มิลลิลิตร
30 % Polyacrylamide	500	ไมโครลิตร
1.5 M Tris)pH 8.8(380	ไมโครลิตร
10 % SDS	30	ไมโครลิตร
10 % APS	30	ไมโครลิตร
TEMED	4	ไมโครลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวบุญยวีร์ นิธิธารีย์โสภณ เกิดเมื่อ วันที่ 23 ตุลาคม พ.ศ. 2533 จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรโลहितวิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนการวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 29

