นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของเคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน และการผลิตโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ

สิงห์คำ ธิมา[1]
ประสิทธิ์ ชนะรัตน์[2]
ชฎารัตน์ ดวงรัตน์[3]
พรงาม ลิ้มตระกูล[4]
ทรงยศ อนุชปรีดา[5]

Inhibitory effect of curcuminoids on *Wilms' tumor1 (WT1)* gene and its protein expression in leukemic cell lines

Tima S, Chanarat P, Daungrat C, Limtrakul P, Anuchapreeda S.
Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences,
Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy,
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiangmai, 50200, Thailand
Songkla Med J 2008;26(1):1-13

@งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ และกองทุนสนับสนุนนักวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[1]วท.ม. (เทคนิคการแพทย์) [2]วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก), อาจารย์ [5]ปร.ด. (ชีวเคมี), อาจารย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
[3]Ph.D (Pharmaceutical Chemistry) with Honors, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์
[4]Ph.D (Biochemistry), รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
รับต้นฉบับวันที่ 25 ธันวาคม 2549 รับลงตีพิมพ์วันที่ 19 กันยายน 2550

Abstract:

Leukemia is a group of common hematological malignancies, and the expression of Wilms' tumor1 (WT1) gene and its product in leukemic blast cells is very high compared with normal bone marrow cells. This study investigated the effect of turmeric curcuminoids, including curcuminoid mixture, pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin, on WT1 gene expression in leukemic cell lines (K562, U937, HL-60, and Molt4). The cell lines were cultured in the presence of 10 μM of curcuminoid that was not toxic to leukemic cells under our experimental conditions. WT1 mRNA and WT1 protein levels were assessed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis, respectively. The curcuminoid derivative which showed strong inhibitory effect on WT1 gene expression in this study was selected for study of its effect on WT1 gene expression using various concentrations which were nontoxic (5, 10, and 15 μM) to leukemic cell lines and incubating up to 3 days. Pure curcumin exhibited a strong inhibitory effect on WT1 mRNA and WT1 protein expression. Moreover, pure curcumin significantly decreased WT1 gene expression in both a concentration-dependent and a time-dependent manner ($p<0.05$). In summary, pure curcumin decreased both WT1 protein and WT1 mRNA levels in leukemic cell lines. It may be possible to use pure curcumin as a chemotherapeutic agent in human leukemic cancer.

Key words: *curcuminoids, curcumin, Wilms' tumor1 gene, WT1, Leukemia*

บทคัดย่อ:

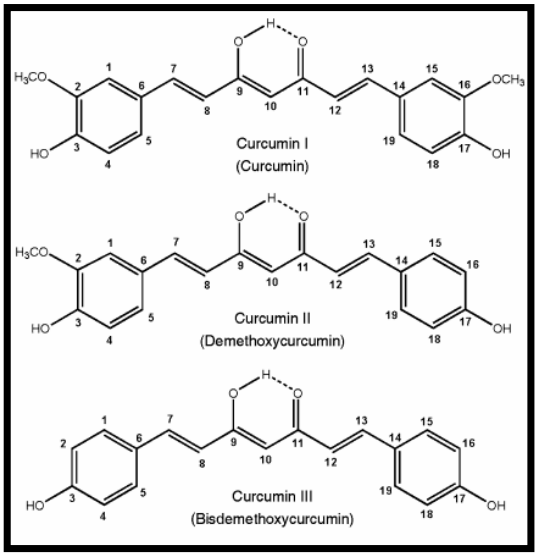
มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยาที่พบได้บ่อย และพบว่ามีการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (WT1) ที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวในไขกระดูกปกติ การศึกษานี้มุ่งศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชัน ได้แก่ สารสกัดเคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน, บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และเคอร์คิวมินอยด์รวมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562, U937, HL-60 และ Molt4 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวกับสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ความเข้มข้น 10 μM ซึ่งไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ทำการทดสอบ ทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ WT1 mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ด้วยวิธี RT-PCR และ Western blot ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ให้ผลยับยั้งการแสดงออกของยีน WT1 ที่ดีที่สุด มาทำการศึกษาต่อโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ทำการทดสอบ คือ 5, 10 และ 15 μM และระยะเวลาที่ทดสอบคือ 1, 2 และ 3 วัน เพื่อศึกษาว่าฤทธิ์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด และระยะเวลาหรือไม่ จากการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ WT1 mRNA และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์การยับยั้งของเคอร์คิวมินยังเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จึงสรุปได้ว่าเคอร์คิวมินเป็นเคอร์คิวมินอยด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน WT1 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีที่สุด จึงเป็นไปได้ว่าอาจจะมีการนำเคอร์คิวมินมาใช้เป็นส่วนประกอบในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต

คำสำคัญ: *เคอร์คิวมินอยด์, เคอร์คิวมิน, ยีนวิล์มทูเมอร์วัน, ดับบริวทีวัน, มะเร็งเม็ดเลือดขาว*

บทนำ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมียเป็นมะเร็งทางโลหิตวิทยาเกิดจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนที่ผิดปกติอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor1; WT1*) ที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวแทบทุกชนิด[1] โดยพบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงประมาณ 1,000 ถึง 100,000 เท่า เมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวของไขกระดูกคนปกติ (normal bone marrow) และ

เซลล์เม็ดเลือดจากกระแสเลือดของคนปกติ (normal peripheral blood) ตามลำดับ[2] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันใน $CD34^+$ leukemic cells มีค่าที่สูงกว่าระดับการแสดงออกใน $CD34^+$ normal cells อย่างน้อยประมาณ 10 เท่า[3] โดยปกติแล้วยีนวิล์มทูเมอร์วัน เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ชนิดต่างๆ และสามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกระแสเลือดและไขกระดูก แต่อยู่ในระดับที่ต่ำมาก และมีระดับลดต่ำลงเรื่อยๆ เมื่อเซลล์เกิดกระบวนการพัฒนาการของเซลล์ (differentiation) ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดตัวเต็มวัย[4-5] ในขณะที่จะมีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว[1-2] โดยพบว่าโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation), การพัฒนาการของเซลล์ และกระบวนการตายแบบอะพอพโตซีส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว[6-7] นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันยังเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มที่กลับมาเป็นโรคอีกครั้ง (relapse case) จากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันประกอบด้วย เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (รูปที่ 1)[8] มีคุณสมบัติในทางการแพทย์ที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect)[9], ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial agent)[10], ต้านกระบวนการออกซิเดชั่น (anti-oxidation)[11], และต้านการเกิดมะเร็ง (anticancer agent)[12] นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย[13-14] ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว 4 ชนิด คือ human erythroid leukemia (K562), human promyeloid leukemia (HL-60), human monocytic leukemia (U937) และ human lymphoblastic leukemia (Molt4) นอกจากนี้ยังศึกษาว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันที่มากที่สุดนั้นมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (5, 10 และ 15 μM) และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (1, 2 และ 3 วัน) หรือไม่



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมี (chemical structure) ของสารสกัดเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน[5]

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562, HL-60, U937 และ Molt4

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) ที่มี fetal bovine serum ความเข้มข้น 10%, pyruvate ความเข้มข้น 110 มก./มล., HEPES ความเข้มข้น 10 mM, penicillin ความเข้มข้น 100 units/mL และ streptomycin ความเข้มข้น 100 กรัม/มล. โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 และมีอุณหภูมิ 37 °C

สารสกัดจากเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดเคอร์คิวมินนอยด์จากขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบนี้เป็นสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์รวม (curcuminoid mixture) ในชื่อ Curcumin จากบริษัทซิกมา-อัลดิช (Sigma-Aldrich) และสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันที่สกัดได้ตามกรรมวิธีของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ทั้งเคอร์คิวมินอยด์รวม เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน โดยเมื่อจะนำมาทดสอบจะนำสารสกัดเหล่านี้มาละลายในสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO)

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวร่วมกับสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ชนิดต่าง ๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ completed RPMI 1640 โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.5 x 10^5 เซลล์/มล. สำหรับเซลล์ K562 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ฉายสุรีย์ ศุภวิไล) และ 3.0x10^5 เซลล์/มล. สำหรับเซลล์ U937, HL-60, และ Molt4 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วัชระ กสิณฤกษ์) โดยกลุ่มทดสอบจะเติมสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ชนิดต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 μM ลงไป ในขณะที่กลุ่มควบคุม (vehicle control) จะเติมเฉพาะ DMSO ในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากับปริมาณความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ในกลุ่มทดสอบ โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับร้อยละ 0.04 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการทดสอบหาระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันต่อไป

การตรวจหาระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ (WT1 mRNA) ในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการทดสอบมาทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป TRIzol® reagent (Invitrogen™) ทำการตรวจหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 1 μg มาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป SUPERSCRIPT™ One-Step RT-PCR (Invitrogen™) โดยมี primers และสภาวะ (condition) สำหรับศึกษานี้คือ WT1 primers ประกอบด้วย Sense primer คือ 5'-GGCATCTGAGACCAG TGAGAA-3', Anti-sense primer คือ 5'-GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3' และ GAPDH primers ประกอบด้วย Sense primer คือ 5'-CGAAGTCAAC-GGATTTGGTCGTAT-3', Anti-sense primer คือ 5'-AGCC-TTCTCGGTGGTGAAGAC-3'

ส่วนสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ (amplification) ดังนี้คือ ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA คือที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที, pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที เพิ่มปริมาณ cDNA ภายใต้สภาวะดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis และวัดความเข้มของแถบที่ได้ด้วยเครื่อง scan densitometer ต่อไป จากการทดลองนี้จะได้ PCR product ของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และ *GAPDH* ที่มีขนาดเท่ากับ 474 bp และ 306 bp ตามลำดับ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้และเปรียบเทียบผลของเคอร์คิวมินอยด์ชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลและทราบแล้วว่าเคอร์คิวมินอยด์ชนิดใดมีผลที่ดีที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน แล้วให้นำเคอร์คิวมินอยด์ชนิดนั้นมากระจายความเข้มข้น (5, 10 และ 15 μM) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (1, 2 และ 3 วัน) แล้วทดสอบดูว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ (dose dependent manner) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (time dependent manner) หรือไม่ต่อไป โดยการแต่ละการทดสอบจะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลอง

การตรวจหาระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี Western blot analysis

นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการทดสอบมาทำการสกัดโปรตีนจากนิวเคลียส (nuclear protein) ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป NE-PER® Nuclear and cytoplasmic extraction reagents (PIERCE) ทำการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Lowry method[15] หลังจากนั้นจึงนำโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละการทดลองปริมาณ 100 μg มาทำการตรวจสอบโดยวิธี Western blot ซึ่งตรวจสอบโดยใช้ rabbit polyclonal anti-WT1 antibody (Santa Cruz Biotechnolygy; USA) และ goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Promega; USA) ตามลำดับ จากนั้นทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal® West Pico Trial Kit (PIERCE) ผลที่ได้นำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้เครื่อง scan densitometer นอกจากนี้ส่วนของการควบคุมปริมาณของโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง ได้ใช้ rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnolygy; USA) และ goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Promega; USA) ตามลำดับ เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน GAPDH ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมปริมาณโปรตีนในการทดลองนี้ จากการทดลองนี้จะได้แถบโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และ GAPDH ที่มีขนาดเท่ากับ 48-54 กิโลดาลตัน (kDa) และ 37 kDa ตามลำดับ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้และเปรียบเทียบผลของเคอร์คิวมินอยด์ชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลและทราบแล้วว่าเคอร์คิวมินอยด์ชนิดใดมีผลที่ดีที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน

แล้วจึงทำการทดสอบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ชนิดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ (dose dependent manner) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (time dependent manner) หรือไม่ต่อไป โดยการแต่ละการทดสอบจะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ซึ่งข้อมูลที่ได้อยู่ในรูปของ MEAN ± SE หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA โดยทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดกับชุดควบคุมเพื่อวิเคราะห์ว่าเคอร์คิวมินอยด์ชนิดใดมีค่ายับยั้งการแสดงออกของทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ดีที่สุด และการยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นหรือไม่

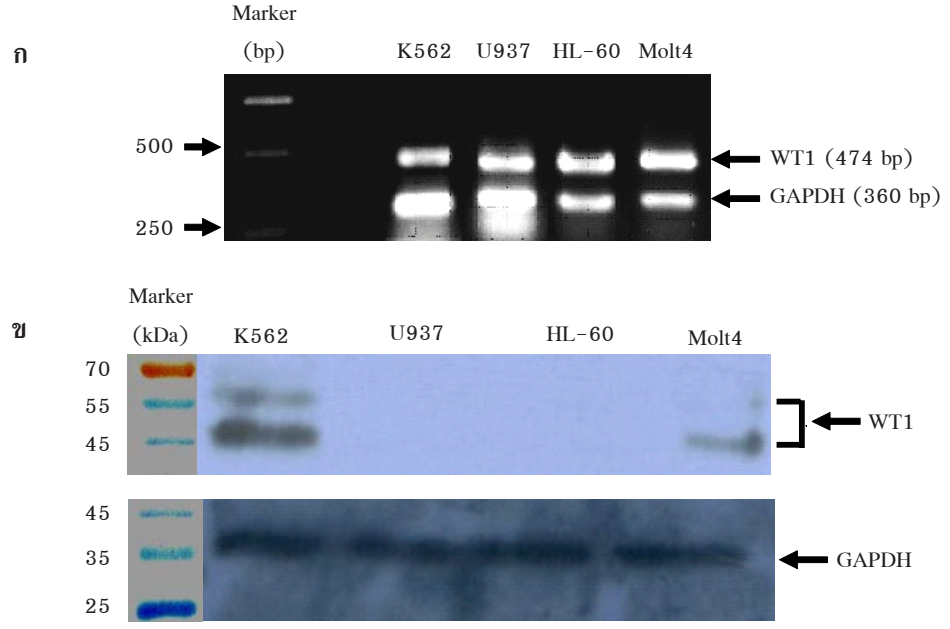
ผลการศึกษา

ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ชนิดต่าง ๆ ต่อระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

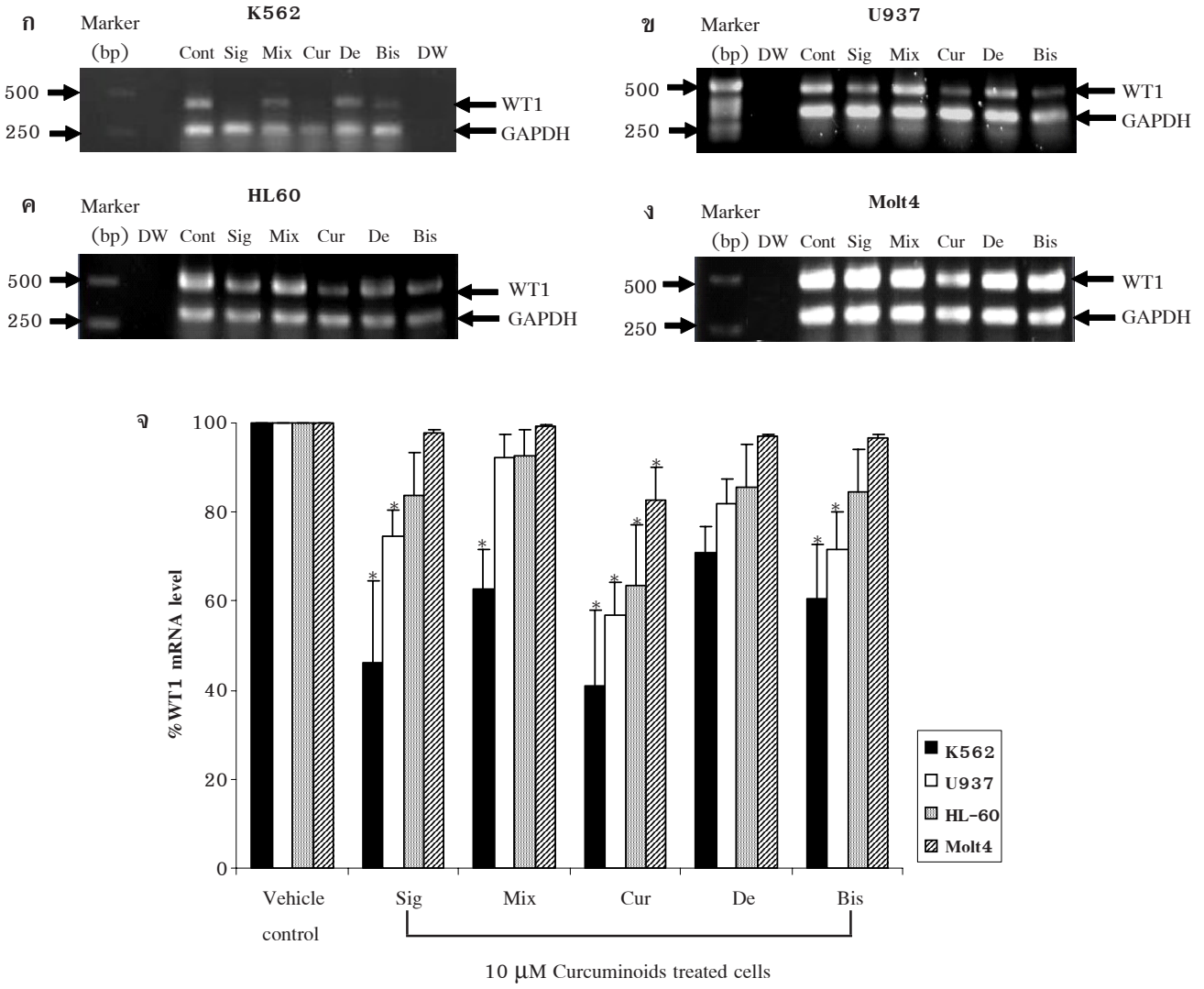
จากการตรวจหาระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด พบว่าเซลล์ทั้ง 4 ชนิด มีระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอที่สูง (รูปที่ 2ก) และพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ทุกชนิดสามารถลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์ม-ทูเมอร์วันมากที่สุด ตามด้วย บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ตามลำดับ โดยสารสกัดเคอร์คิวมิน มีฤทธิ์ในการลดระดับของยีนวิล์มทูเมอร์วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) ในเซลล์ K562, U937, HL-60 และ Molt4 โดยคิดเป็นร้อยละ 59, 43, 37 และ 17 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3)

ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ ต่อระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เมื่อนำสารสกัดเคอร์คิวมินซึ่งมีฤทธิ์ลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันมากที่สุด มาทำการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยทำการกระจายความเข้มข้นเป็น 5, 10 และ 15 μM ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด และยังพบว่าระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอมีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดเคอร์คิวมินที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) (รูปที่ 4)



รูปที่ 2 แสดงระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ (ก) และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน (ข) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ



หมายเหตุ: Cont = กลุ่มควบคุม, Sig = เคอร์คิวมินอยด์รวม (ซิกมา-อัลดิช), Mix = เคอร์คิวมินอยด์รวม, Cur = เคอร์คิวมิน, De = ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน, Bis = บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน, DW = น้ำกลั่น (internal control), * แสดงถึงผลการทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

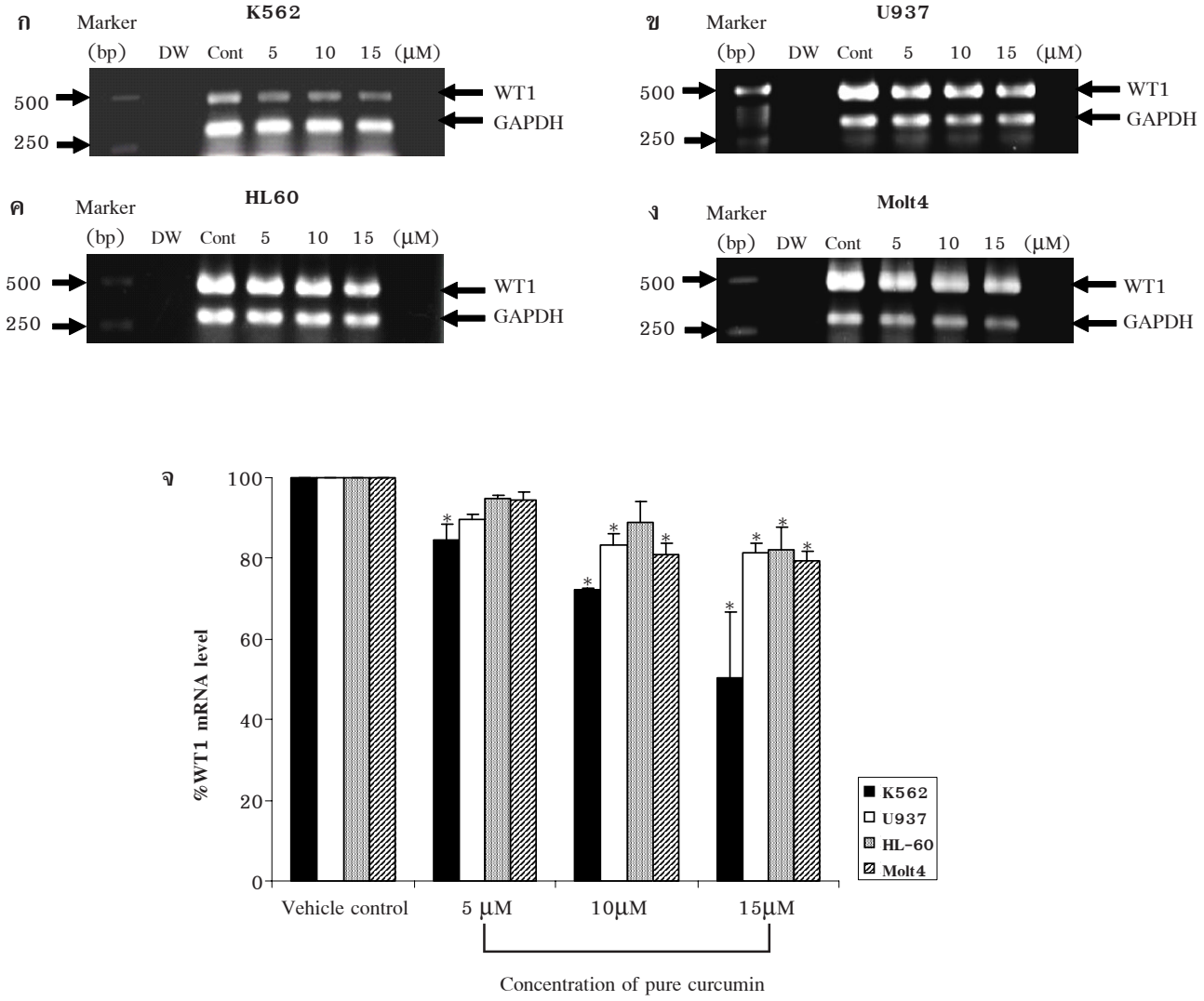
รูปที่ 3 แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ

นอกจากนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดได้ และพบว่าสามารถลดปริมาณวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) (รูปที่ 5)

ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ชนิดต่าง ๆ ต่อระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

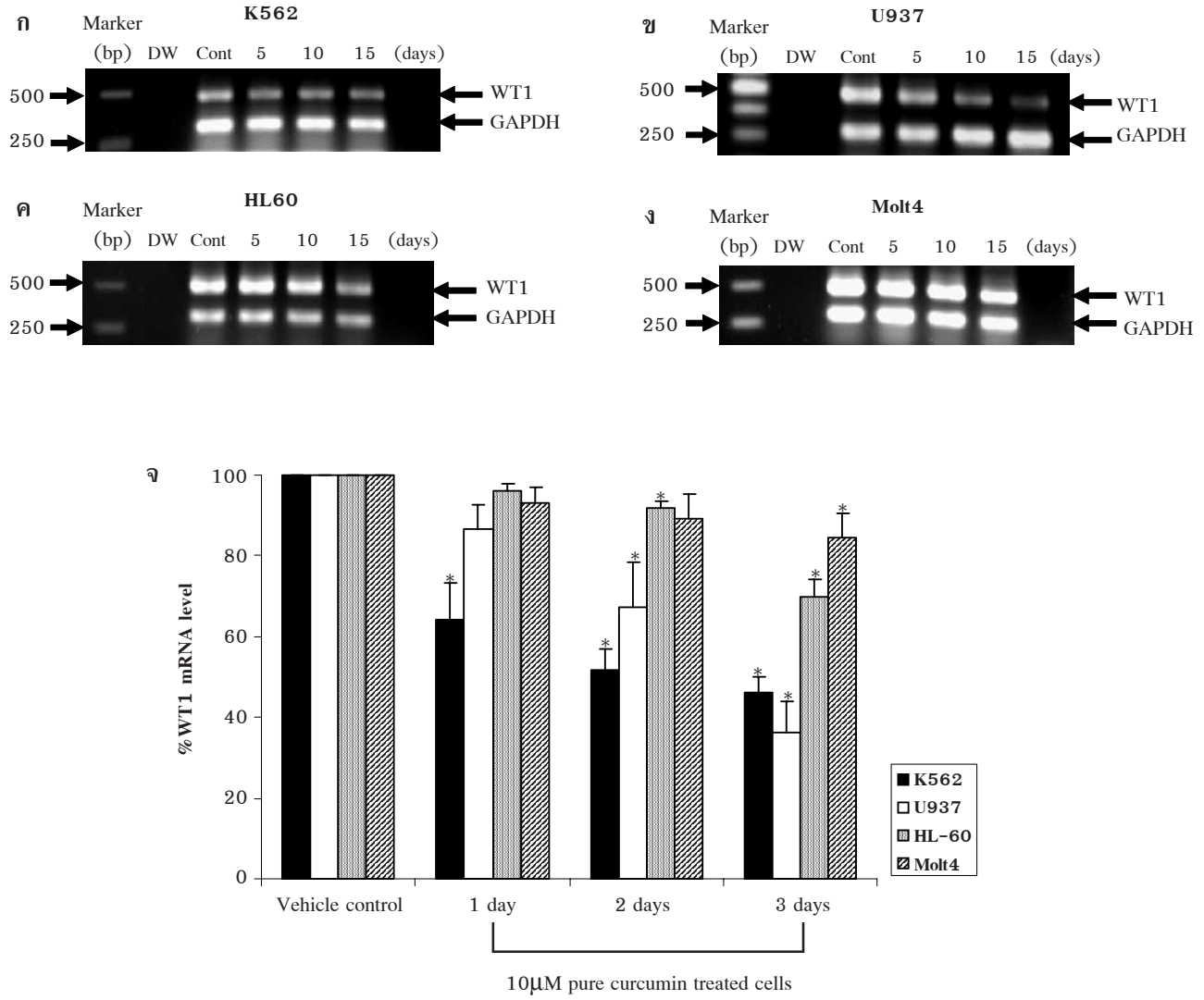
จากการศึกษาระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีเพียงเซลล์ K562 และ Molt4 เท่านั้นที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในปริมาณที่มากพอและสามารถทำการตรวจวัดได้ ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน

ในเซลล์ U937 และ HL-60 (รูปที่ 2ข) ดังนั้นจึงใช้เซลล์ K562 และ Molt4 มาเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันต่อไป จากการทดลองพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ทั้งในเซลล์ K562 และ Molt4 โดยหากจะเปรียบเทียบระหว่างผลของเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมากที่สุด ตามด้วย บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ตามลำดับ โดยสารสกัดเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการลดระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) ในเซลล์ K562 และ Molt4 โดยคิดเป็น 48 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 6)



หมายเหตุ: Cont = กลุ่มควบคุม, DW = น้ำกลั่น (internal control), * แสดงถึงผลการทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ



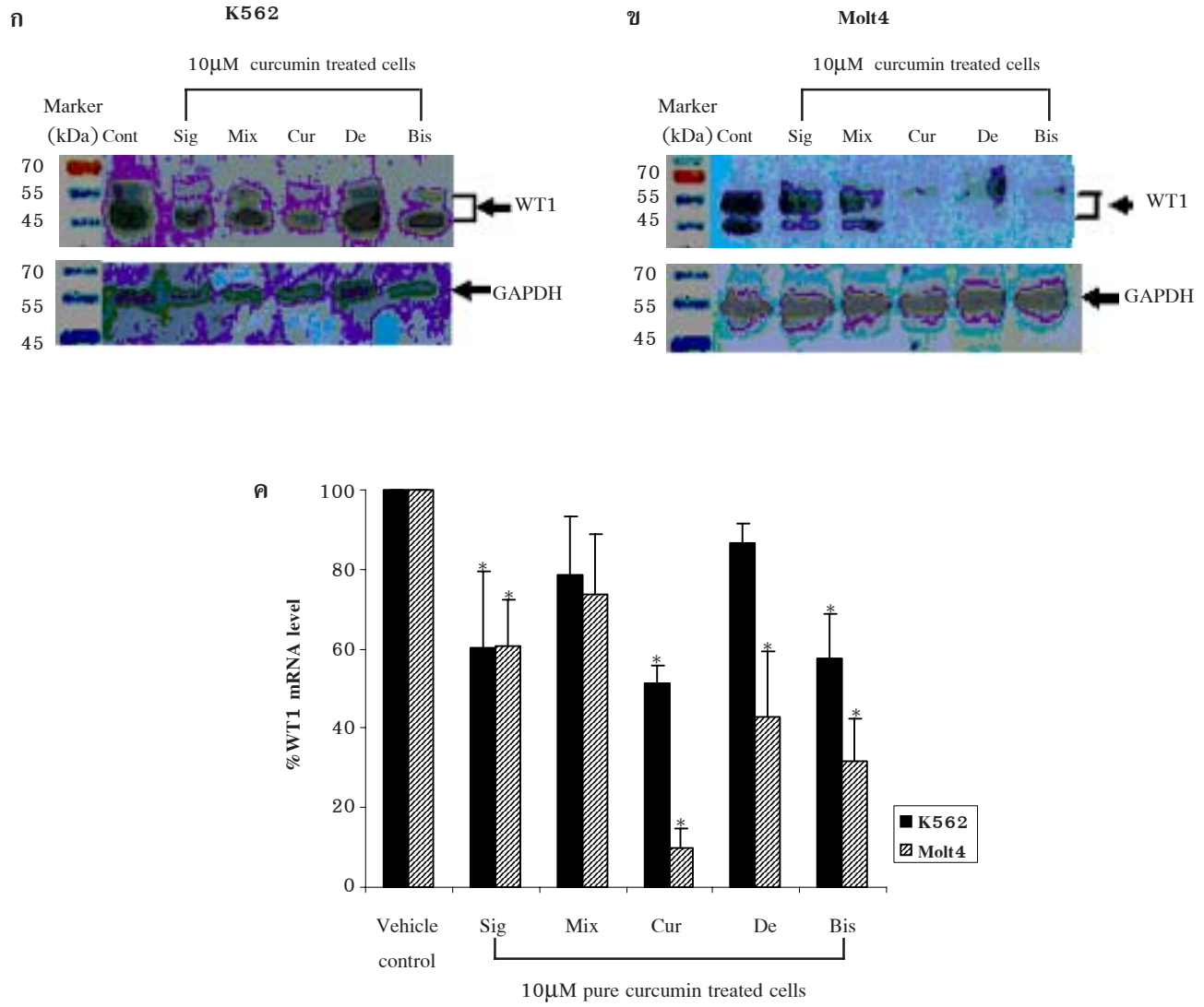
หมายเหตุ: Cont = กลุ่มควบคุม, DW = น้ำกลั่น (internal control), * แสดงถึงผลการทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

รูปที่ 5 แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่เวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบต่อระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ

ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ต่อระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เมื่อนำสารสกัดเคอร์คิวมินซึ่งมีฤทธิ์ลดระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมากที่สุด มาทำการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยทำการกระจายความเข้มข้นเป็น 5, 10 และ 15 μM พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถที่จะลดระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิด เป็นแบบเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเคอร์คิวมินที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) (รูปที่ 7)

นอกจากนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินสามารถลดระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดเป็นแบบตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) (รูปที่ 8)

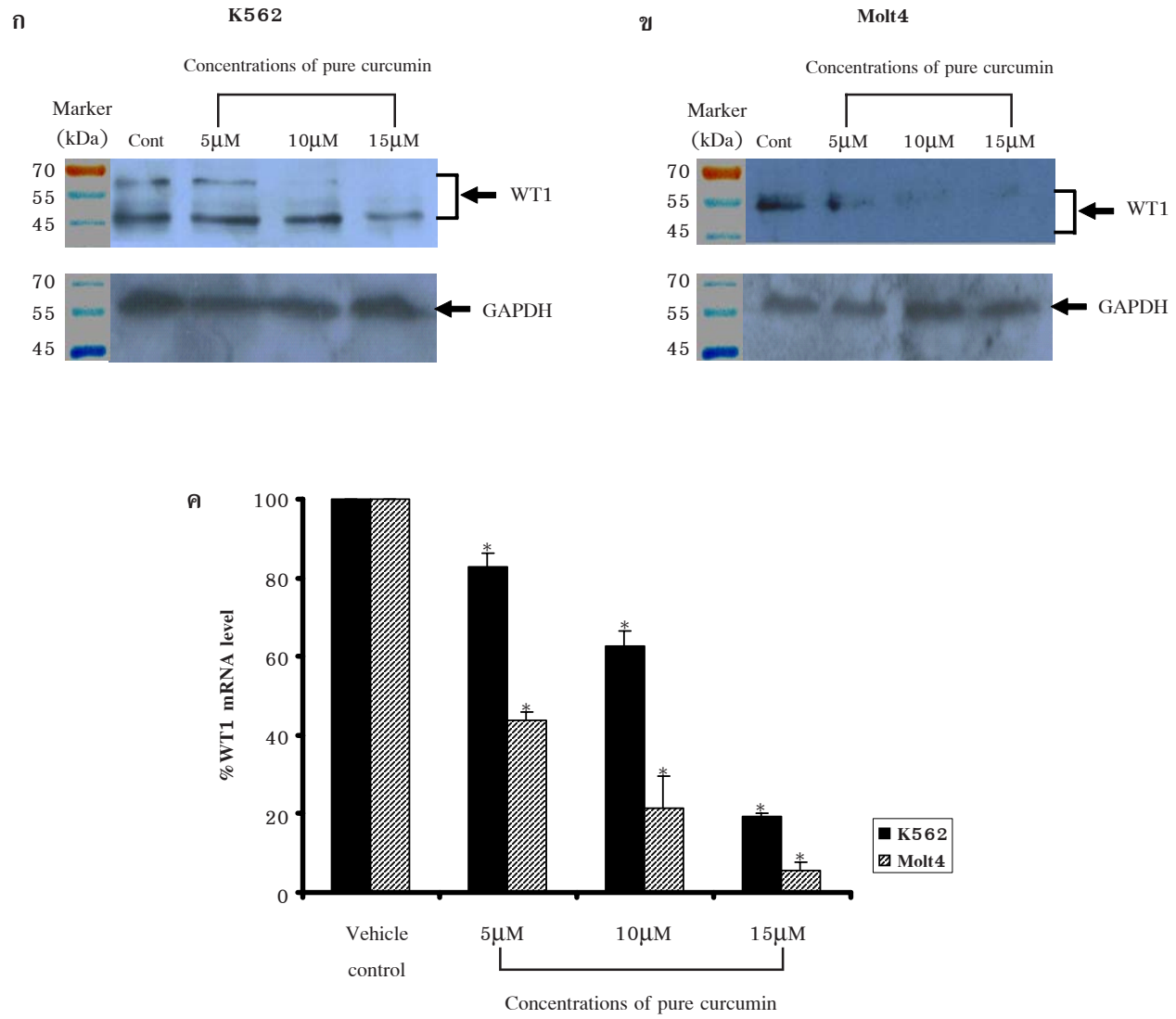


หมายเหตุ: Cont = กลุ่มควบคุม, Sig = เคอร์คิวมินอยด์รวม (ซิกมา-อัลดิช), Mix = เคอร์คิวมินอยด์รวม, Cur = เคอร์คิวมิน, De = ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน, Bis = บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน, * แสดงถึงผลการทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

รูปที่ 6 แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 และ Molt4

วิจารณ์

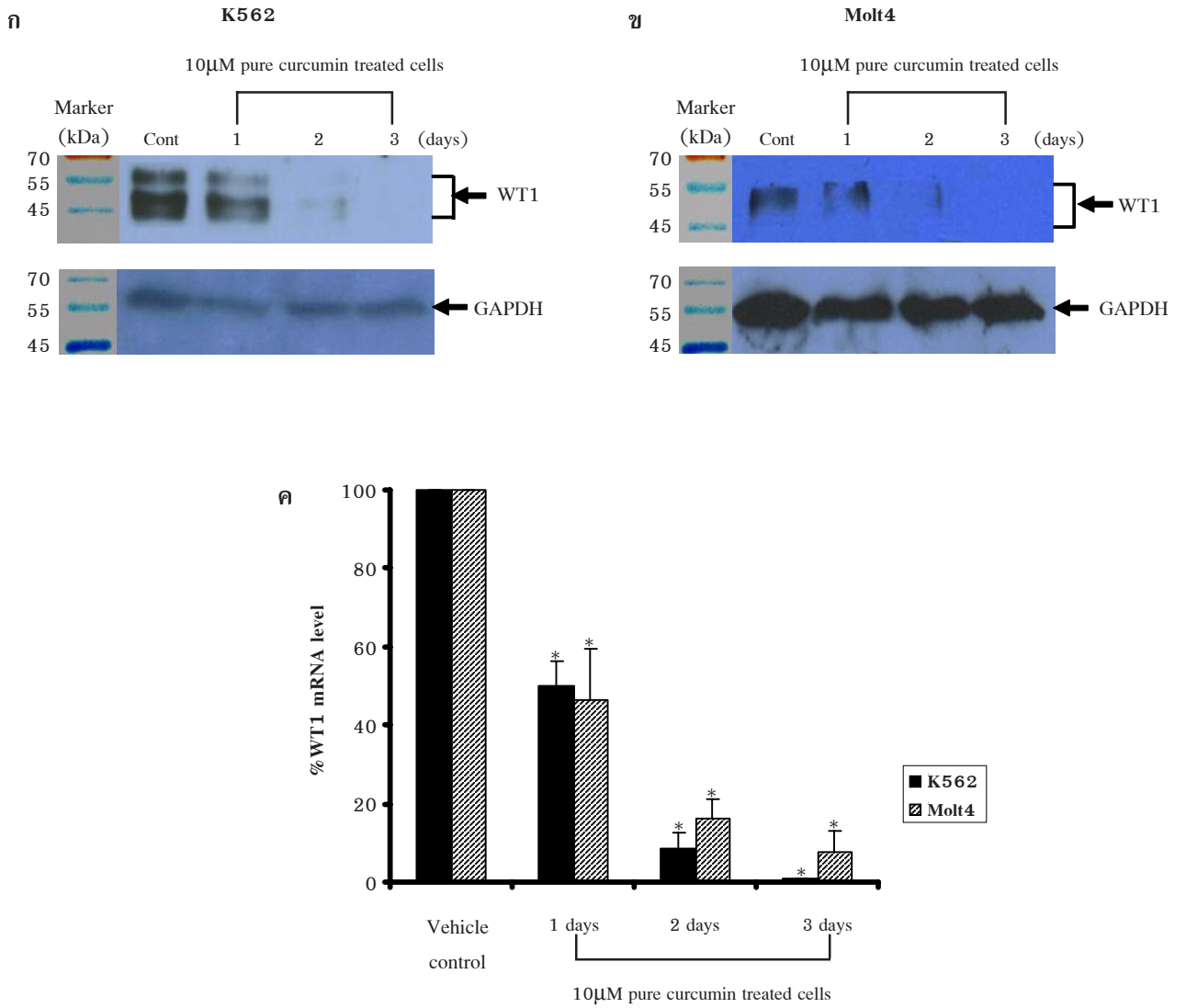
สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองสามารถที่จะลดระดับของวิลม์ทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ในเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบและเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าเคอร์คิวมินมีความสามารถสูงสุดในการลดระดับของทั้งวิลม์ทูเมอร์วันเอ็มอาร์-เอ็นเอและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน รองลงมาคือ บีสดีเมตทอกซี-เคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้เป็นไปได้ว่าลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของสารสกัดทั้งสามชนิดที่แตกต่างกัน (รูปที่ 1) มีผลต่อฤทธิ์ของสารสกัดทั้งสามชนิด โดยโครงสร้างโมเลกุลของเคอร์คิวมินจะประกอบด้วยส่วนสำคัญสามส่วนด้วยกัน คือ hydroxyl group มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ของเคอร์คิวมิน ส่วนที่สองเป็น ketone groups ซึ่งมีสองตำแหน่ง บางครั้งเรียกว่า diketone และส่วนที่สามเป็น double bond ซึ่ง ทั้งส่วนของ diketone และ double bond นี้มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ต้านการอักเสบ ต้านสารก่อกลายพันธุ์ และต้านมะเร็ง ส่วนโครงสร้างของดีเมต-ทอกซีเคอร์คิวมิน พบว่ามีหมู่ methoxyl เพียง 1 ตำแหน่ง ในขณะที่บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินพบว่าไม่มีหมู่ methoxyl



หมายเหตุ: Cont = กลุ่มควบคุม, * แสดงถึงผลการทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

รูปที่ 7 แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 และ Molt4

จากการศึกษาของ Lee และคณะ[16] พบว่า การมี vanilyl moiety และ ketone group อยู่ในโครงสร้างของ [6]-Gingerol ในพืชตระกูลขิงและมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกับโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์มีส่วนสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ HL-60 เกิดการตายแบบอะพอพโตซีส นอกจากนี้ Simon และคณะ[17] พบว่าหมู่ diketone ที่พบในโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์มีความสำคัญในการต้านกระบวนการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์อีกด้วย ดังนั้นจากผลการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่า หมู่ methoxyl และ diketone ในโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์มีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองนี้ พบข้อสังเกตว่า functional group ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับหมู่ methoxyl ในเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดกล่าวคือ เคอร์คิวมินมีปริมาณหมู่ methoxyl ที่มากที่สุดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้มากที่สุด นอกจากนี้ในส่วนของผลการศึกษาที่ได้จากดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยที่สุดนั้น อาจจะเป็นไปได้ว่าความไม่สมดุลกันของหมู่ methoxyl ในโครงสร้างของดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินอาจจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งนี้ก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับสมมุติฐานนี้อีกต่อไป



หมายเหตุ: Cont = กลุ่มควบคุม, * แสดงถึงผลการทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

รูปที่ 8 แสดงผลของสารสกัดเคอร์คิวมินที่เวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบต่อระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 และ Molt4

จากผลการทดลองนี้พบว่าไม่สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสองชนิด ได้แก่ U937 และ HL-60 แม้จะสามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน ทั้งนี้อาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดมีระดับที่แตกต่างกัน โดยจากการศึกษาของ Inoue และคณะ[3] ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันใน leukemic cell line ชนิดต่าง ๆ พบว่าเซลล์แต่ละชนิดมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไป จึงอาจจะส่งผลให้มีระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่แตกต่างกันได้ นอกจากนี้วิธีการทดสอบที่ใช้ในการทดลองนี้อาจจะมีความสามารถไม่มากพอที่จะตรวจวัดระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่มีปริมาณน้อย ๆ ภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 และ HL-60 ได้ เช่น ศึกษาระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 และ Molt4 นั้นใช้วิธีการ Western blot analysis ก็สามารถที่จะตรวจวัดได้แล้ว[13, 18-19] ในขณะที่การศึกษาในเซลล์ HL-60 นั้นต้องอาศัยวิธีการ Immunoprecipitation มาช่วยจึงจะตรวจวัดได้[20] นอกจากนี้กระบวนการหลังการเกิดทรานสเลชั่น (post-translation)

ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดอาจจะส่งผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันที่แตกต่างกันออกไปได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุป

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบนี้มีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยเคอร์คิวมินมีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันได้ดีที่สุดทั้งในขั้นตอนของกระบวนการ transcription และ translation นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบอีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำการศึกษานี้มาทำการศึกษาต่อในทางคลินิกกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเพื่อนำไปสู่การใช้สารสกัดเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันมาใช้เป็นส่วนประกอบในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. Int J Hematol 2001; 73:177-87.
2. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood 1994;84:3071-9.
3. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Hideaki S, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. Blood 1997;89: 1405-12.
4. Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of $CD34^+$ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. Exp Hematol 1997;25:945-50.
5. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. Exp Hematol 1997; 25:312-20.
6. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? Int Rev Cytol 1998;181:151-212.
7. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (WT1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. Leukemia 1995;9:1060-7.
8. Chearwae W, Wu CP, Chu HY, Lee TR, Ambudkar SV, Limtrakul P. Curcuminoids purified from turmeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1). Cancer Chemother Pharmacol 2006; 57:376-88.
9. Lantz RC, Chen GJ, solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. Phytomedicine 2005;12:445-52.
10. Kim KJ, Yu HH, Cha JD, Seo SJ, Choi NY, You YO. Antibacterial activity of Curcuma longa L. against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Phytother Res 2005;19:599-604.
11. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Diaz-Alperi J, Ramirez A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. Arch Gerontol Gderiatr 2002;34:37-46.
12. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res 2003;23:363-98.
13. Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thanarattanakorn R, Sittpreechacharn S, Chanarat P. Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. Arch Pharm Res 2006;29:80-7.
14. Anuchapreeda S, Wikan N, Tima S, Thanarattanakorn R, Sittpreechacharn S, Limtrakul P. Effect of curcumin on WT1 gene expression in human leukemic cells. J Med Tech Assoc Thailand 2005;33:1252-64.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J Biol Chem 1951;193:265-75.
16. Lee E, Surh YJ. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol. Cancer Lett 1998;134:163-8.

17. Simon A, Allais DP, Duroux JL, Basly JP, Durand-Fontanier S, Delage C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. Cancer Lett 1998;129:111-6.
18. McCann S, Sullivan J, Guerra J, Arcinas M, Boxer LM. Repression of the c-myb gene by WT1 protein in T and B cell lines. J Biol Chem 1995;270:23785-9.
19. Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS, Garrett CT. Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. Mol Diagn 2000;5:117-28.
20. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. A WT1 antisense oligonucleolide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukemia cell lines. Oncogene 1996;12:1005-14.