

ผลของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.)
ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิลส์ทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

Inhibitory effects of crude ethanolic leave extract from *Moringa oleifera* Lam.
on Wilms' tumor 1 protein expression in K562 leukemic cell line

■ สุวรรณา เสมศรี^{1*} ทรงยศ อนุชปรีดา² วิชาญ จันวิทย์นุชิต³
Suwanna Semsri^{1*} Songyot Anuchapreeda² Wicharn Janwitayanuchit³

¹คณะเทคโนโลยีการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

¹Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakam Province, Thailand

²คณะเทคโนโลยีการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

²Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, Thailand

³คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

³Faculty of Pharmacology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakam Province, Thailand

* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: ssemsri@gmail.com)

* Corresponding author (Email: ssemsri@gmail.com)

Received September 2015

Accepted as revised November 2015

Abstract

Introduction: Natural products have been studied for an alternative leukemia treatment. The *Moringa oleifera* Lam. has been reported to mediate chemo-preventive effects by enhancing antioxidant status. However, cytotoxicity of *Moringa oleifera* Lam. extract has not been reported yet in leukemic cell lines.

Objective: To study anti-leukemic properties of *Moringa oleifera* Lam. leave extract in K562 cell line.

Materials and methods: Cytotoxicity of crude *Moringa oleifera* Lam. leave extract was determined by MTT assay. The WT1 protein level were examined by Western blot analysis. All data was analyzed statistically by one-way ANOVA.

Results: Crude ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves exhibited distinctly cytotoxic effect on K562 cells with IC₅₀ of 220±22 µg/mL and non-cytotoxic dose (IC₂₀) of 55±5 µg/mL. Result also showed that WT1 protein level after treated with crude ethanolic *Moringa oleifera* Lam. leave extract, in various incubation time (24, 48, and 72 hours), were decreased by 21, 37, and 61% respectively. In addition, at 48 hours of incubation with various concentrations (45, 55, and 65 µg/mL) WT1 protein reduced by 32, 48, and 68% respectively. However, crude *Moringa oleifera* Lam. leave extract at IC₂₀ clearly showed that it did not affect cell morphology. Importantly, crude ethanolic *Moringa oleifera* leave extract did not affect PBMCs (576.9 µg/mL).

Conclusion: Crude ethanolic *Moringa oleifera* Lam. leave extract could inhibit cell proliferation and reduce WT1 protein level in a dose- and time-dependent manner. Therefore, it can be concluded that crude *Moringa oleifera* Lam. leave extract involved in down-regulation of translational process of WT1 protein expression in K562 cells. These results indicated that *Moringa oleifera* Lam. leave extract could be a promising plant that should be further on studied as an alternative choice for leukemia treatment.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2016; 49(1): 53-64. Doi: 10.14456/jams.2016.11

Keywords: Cytotoxicity, MTT assay, WT1 protein, *Moringa oleifera*, K562 cell line

บทคัดย่อ

บทนำ: ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติถูกศึกษาเพื่อทางเลือกใหม่รักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว มีรายงานว่ามะรุมสามารถป้องกันมะเร็งโดยออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังไม่มียางานความเป็นพิษของสารสกัดมะรุมกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมาก่อน

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดใบมะรุมต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

วิธีการ: ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบมะรุมด้วยวิธี MTT และการตรวจระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 โดยวิธี Western blot วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย One-way ANOVA

ผลการทดสอบ: สารสกัดหยาบเอทานอลใบมะรุมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ K562 โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 220 ± 22 $\mu\text{g/mL}$ และความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) เท่ากับ 55 ± 5 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดหยาบใบมะรุมเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง การแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ลดลงร้อยละ 21, 37 และ 61 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นสารสกัดหยาบที่ 45, 55, และ 65 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ได้ร้อยละ 32, 48 และ 68 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบใบมะรุมที่ความเข้มข้น IC_{20} ไม่มีผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และที่สำคัญสารสกัดหยาบเอทานอลใบมะรุม ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ (576.9 $\mu\text{g/mL}$)

สรุป: สารสกัดหยาบเอทานอลใบมะรุมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น กล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบใบมะรุมอาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ในเซลล์ K562 จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบใบมะรุมมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2559; 49(1): 53-64. Doi: 10.14456/jams.2016.11

Keywords: ความเป็นพิษต่อเซลล์ วิธี MTT โปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 มะรุม เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562

บทนำ

มะรุม มีชื่อสามัญว่า horseradish tree และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. อยู่ในวงศ์ Moringaceae เป็นพืชผักพื้นบ้านของไทย เรียกชื่อแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ภาคกลางเรียกว่า “มะรุม” ภาคอีสานเรียกว่า “ผักอีฮุม หรือ บักฮุม” ภาคเหนือเรียกว่า “บะค้อนก้อม” มะรุมมีคุณประโยชน์ทั้งทางด้านอาหาร ยา และอุตสาหกรรม¹ เป็นไม้ยืนต้นที่โตเร็ว ทนแล้ง ปลูกง่ายในเขตร้อน อาจเติบโตมีความสูงได้ถึง 4 เมตร และออกดอกภายในปีที่ปลูก ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก 3 ชั้น มีความยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร ออกเรียงแบบสลับ ใบย่อยยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร ลักษณะใบเป็นรูปไข่ ปลายใบและฐานใบมน ผิวใบด้านล่างสีอ่อนกว่าและมีขนเล็กน้อยขณะที่ใบยังอ่อน ใบมีรสหวานมัน ออกดอกในฤดูหนาว ลักษณะดอกเป็นช่อสีขาว กลีบเรียง มี 5 กลีบ กลีบดอกมี 5 กลีบแยกกัน ดอกมีรสขม หวาน มันเล็กน้อย ผลเป็นฝักยาว เปลือกสีเขียวมีส่วน

คอดและส่วนมนเป็นระยะๆ ตามยาวของฝัก ฝักยาว 20-50 เซนติเมตร ฝักมีรสหวาน เมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยม มีปีกบางหุ้ม 3 ปีก เส้นผ่าศูนย์กลางของเมล็ดประมาณ 1 เซนติเมตร สรรพคุณของมะรุมในตำรายาพื้นบ้านใช้ใบเป็นยาพอกแผล ช่วยห้ามเลือด ทำให้นอนหลับ เป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ และช่วยแก้ไข้ มีรายงานว่าสารสกัดจากใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำสามารถเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดชนิดเพาะเลี้ยง A549² นอกจากนี้ สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากมะรุมที่ระดับความเข้มข้น 60 $\mu\text{g/mL}$ สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดมัยอีลอยด์ (AML) ได้ร้อยละ 51³ และยังมีรายงานว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 สามารถยับยั้งการแบ่งตัว (proliferation) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HCT15 SW48 และ SW480 ศึกษาด้วยวิธี MTT โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 264.83 ± 23.33 , 102.40 ± 16.08 และ 197.20 ± 32.52 $\mu\text{g/mL}$

ตามลำดับ⁴ จากการศึกษาสารที่แยกได้จากโสมมะรุบ พบว่ามีสารประกอบที่สำคัญ 3 ชนิด คือ crypto-chlorogenic acid, isoquercetin และ astragaloside⁵ โดย chlorogenic acid และอนุพันธ์สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ลดระดับการสะสมไขมันในตับ ลดความอ้วน และยับยั้งการอักเสบเฉียบพลันของปอด⁶⁻⁹ ส่วน isoquercetin และ astragaloside มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบทางด้านผิวหนัง^{10,11}

อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์ของโสมมะรุบกับการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีอยู่น้อยมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบโสมมะรุบต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาว รวมถึงการศึกษาในระดับอนุชีวโมเลกุล ในการลดปริมาณของโปรตีนวิลมทูเมอร์ 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจและติดตามการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว¹²

ยีนวิลมทูเมอร์ 1 (*Wilms' tumor 1 gene* หรือ *WT1 gene*) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนวิลมทูเมอร์ 1 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติซึ่งมีการแสดงออกในระดับที่น้อย^{13,14} มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์ 1 เพิ่มขึ้น¹⁵ โดยเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเกือบทุกชนิด¹⁴ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีนวิลมทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CD34+ มีการแสดงออกที่สูงกว่าเซลล์ตัวอ่อนต้นกำเนิดปกติชนิด CD34+ อย่างน้อยประมาณ 10 เท่า¹⁶ โดยปกติแล้วสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์ 1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกระแสเลือดและไขกระดูกในระดับที่ต่ำมาก และพบว่ามีระดับลดลงเรื่อยๆ เมื่อเซลล์พัฒนาเป็นเซลล์เม็ดเลือดตัวแก่^{17,18} อย่างไรก็ตาม โปรตีนวิลมทูเมอร์ 1 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว^{12,19} โปรตีนวิลมทูเมอร์ 1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ การพัฒนาของเซลล์และกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว^{20,21} นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์ 1 ยังเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มที่กลับมาเป็นโรคซ้ำอีกครั้ง (relapse case) จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์ 1 มีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังนั้นการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์ 1 จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการติดตามการดำเนินของโรคได้¹² การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบโสมมะรุบต่อความเป็นพิษและ

การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยวิธี Western blot

วัสดุและวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (human chronic myeloid leukemia) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ฉายสุรีย์ ศุภวิไล (สถานบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (GIBCO BRL, Paisley, UK) ที่มีส่วนผสมของ HEPES ความเข้มข้น 10 mM, L-glutamine ความเข้มข้น 1 mM, penicillin ความเข้มข้น 100 U/mL, streptomycin ความเข้มข้น 100 µg/mL และ heat inactivated fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85

2. การเตรียมเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)

เจาะเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีปริมาตร 8 mL ใส่ลงในหลอดแยกเซลล์ PBMCs สำเร็จรูป (BD vacutainer CPT) ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,800Xg เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดเก็บเซลล์ PBMCs ปั่นล้างด้วย sterile PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ที่ความเร็ว 300Xg หลังจากนั้นเก็บเซลล์เพื่อทดสอบในขั้นตอนต่อไป งานวิจัยได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัย เลขที่ อ. 075/2554

3. สารสกัดหยาบโสมมะรุบด้วยเอทานอลที่ใช้ในการทดสอบ

โสมมะรุบที่ใช้ในการทดสอบได้มาจากตลาดสดจังหวัดสมุทรปราการ มีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ สมบูรณ์สุข (สาขาวิชาเภสัชกรรม เภสัชเวท โรงเรียนแพทย์แผนโบราณวัดพระเชตุพนฯ และโรงเรียนแพทย์แผนไทย) เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ อบโสมมะรุบที่อุณหภูมิ 50°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ และนำส่วนผงของโสมมะรุบที่บดได้จำนวน 500 กรัม หมักในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 3 วัน กรองเก็บส่วนสารละลาย ส่วนกากที่เหลือแช่ในเอทานอลร้อยละ 95 นาน 3 วัน หมักซ้ำอีก 2 รอบ หลังจากนั้นระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer เก็บสารสกัดหยาบ (crude extract) ไว้ที่ -20°C เพื่อการทดสอบต่อไป

4. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบมะรุมาต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) คนปกติ

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมาที่เตรียมได้จากข้อที่ 3 ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยวิธี MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide] โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^5 cells/mL สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ใช้เซลล์ความเข้มข้นเท่ากับ 3.5×10^6 cells/mL เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well tissue culture plate ใน 10% FBS RPMI 1640 ปริมาตร 100 μ L/well บ่มในตู้บ่ม 37 °C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบใบมะรุมาที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 μ L โดยชุดควบคุม (vehicle control หรือ VC) เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะ dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4% เลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง ครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจำนวนหลุมละ 100 μ L หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 10 μ L/well บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ผลึกที่ก้นหลุม เติมน้ำ DMSO ปริมาตร 150 μ L/well เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan ที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 620 nm เป็น reference wavelength แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 หลุม และแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน การคำนวณร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม ดังสมการ

ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) = (ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ/ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม) $\times$ 100

5. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบใบมะรุมาต่อปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot

เลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 4.0×10^5 cells/mL ปริมาตร 5 mL ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 cm ชุดทดสอบเติมสารสกัดหยาบจากใบมะรุมาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) ปริมาตร 5 mL ชุดควบคุมเติมน้ำ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละเท่ากับความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ในชุดทดสอบ โดยในการทดลองครั้งนี้มีร้อยละของ DMSO สูงสุด เท่ากับ 0.022 นำเซลล์ K562 ที่ผ่านการทดสอบมาสกัดโปรตีนด้วยน้ำยา RIPA และหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Lowry นำโปรตีนปริมาณ 50 μ g มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบปริมาณโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 โดยวิธี Western blot โดยใช้ rabbit polyclonal anti-WT1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) และ goat anti-rabbit IgG

56 วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

HRP conjugated antibody (Promega, Madison, USA) ตามลำดับ ใช้ rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology California, USA) และ goat anti-rabbit IgG HRP conjugated antibody (Promega, Madison, USA) ตามลำดับ เป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ (internal control) ตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal West Pico Trial Kit (PIERCE, Rockford, IL USA) วัดความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้โดยใช้เครื่อง scan densitometer (LiDE 210, canon, USA) จากการทดลองนี้จะได้แถบของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 และ GAPDH ที่มีขนาดเท่ากับ 48-54 kDa และ 37 kDa ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงในรูปของ Mean $\pm$ Sem ปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษา

1. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมาต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ของคนปกติ

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสารสกัดหยาบใบมะรุมาแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 220 ± 22 μ g/mL และแสดงค่าที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีค่า IC_{20} เท่ากับ 55 ± 5 μ g/mL (รูปที่ 2)

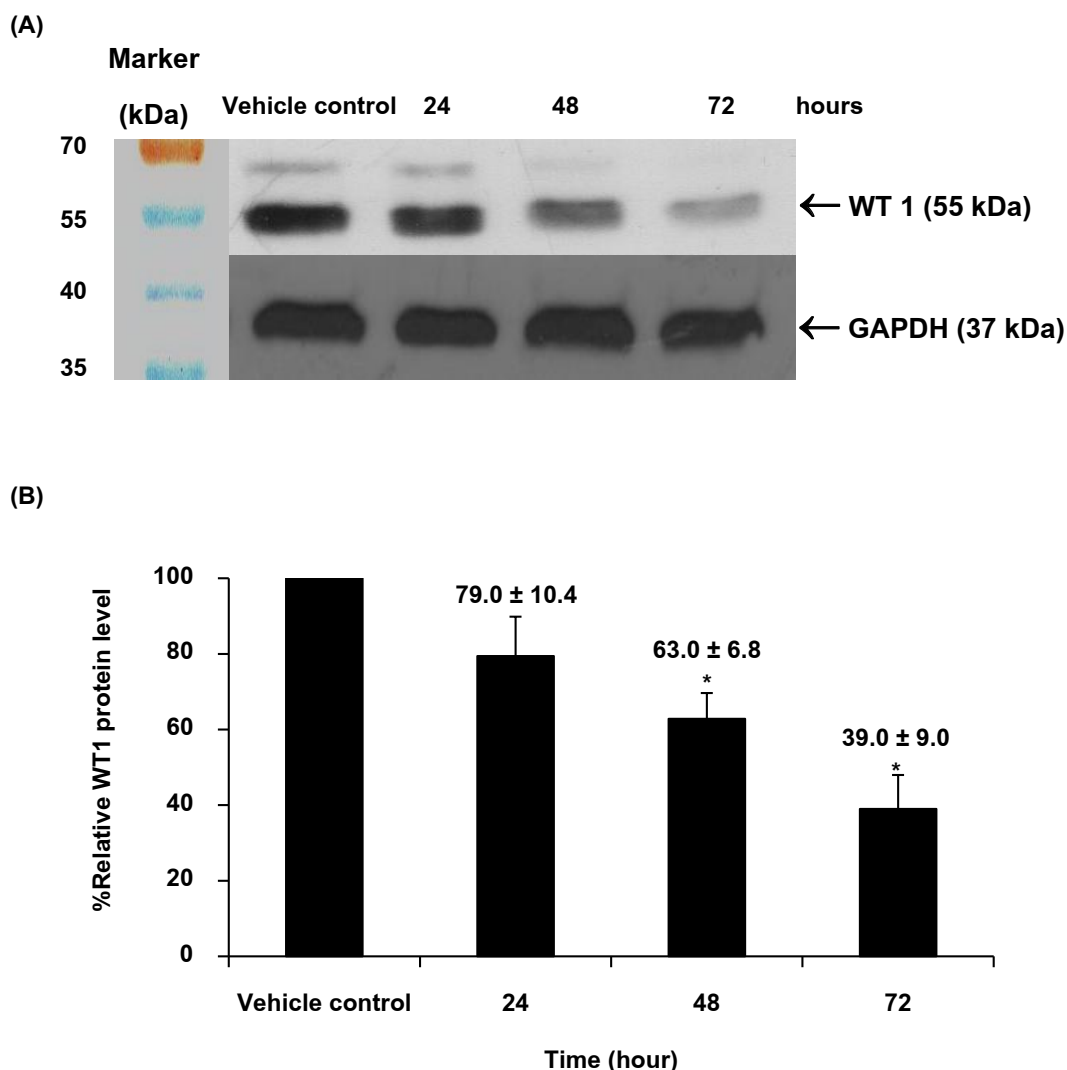


Figure 2 Effect of crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract on WT1 protein expression in K562 cell line. WT1 protein expression level was assessed by immunoblotting after treatment with 55 µg/mL crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract for 24, 48, and 72 hours. GAPDH was used as a loading control (A). Densitometry was used to quantify the protein levels and presented as the percentage of vehicle control (B). Data are the mean value ± sem of three independent experiments. Asterisks (*) denote value that were significantly different from vehicle control ($p < 0.05$).

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวของคนปกติ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของใบมะรุมเท่ากับ 220 µg/mL เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 มีชีวิตร้อยละ 50 ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว

จากคนปกติมีชีวิตร้อยละ 100 (รูปที่ 1) ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวคนปกติ

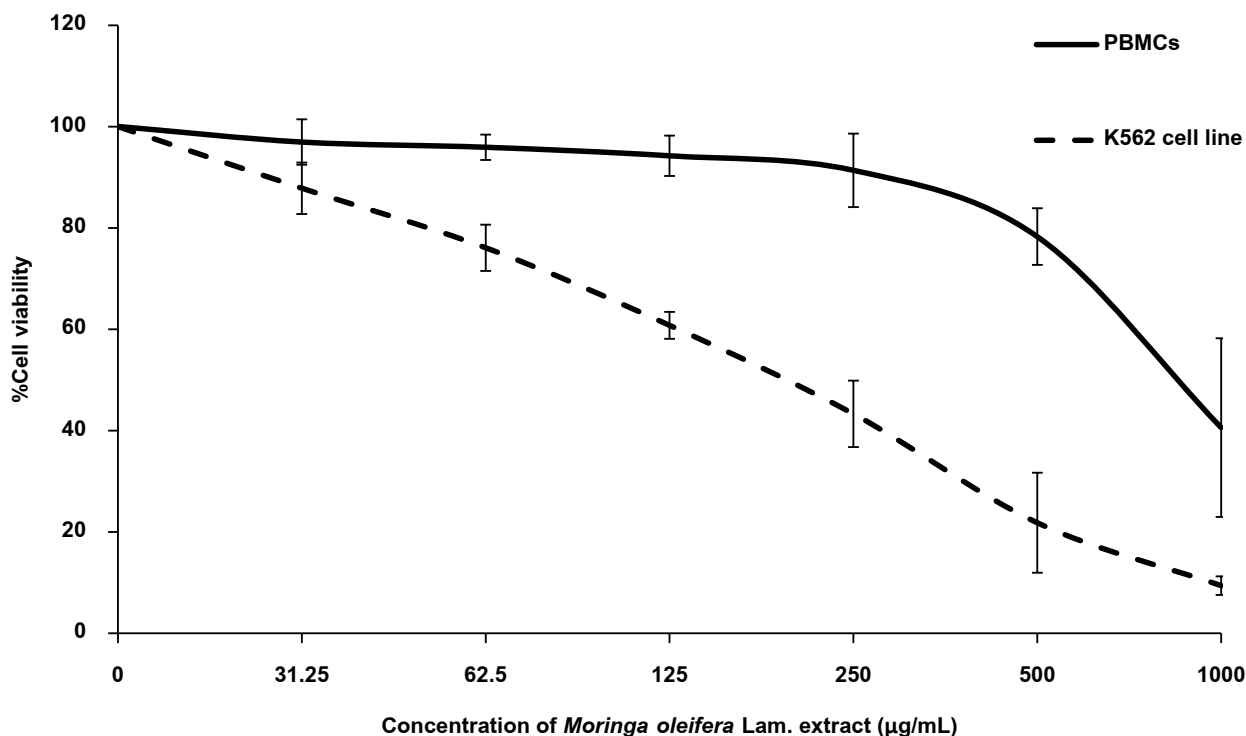


Figure 1 Cytotoxicity of crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract on K562 cells and PBMCs (n=5) by MTT assay. Data are mean value±sem of three independent experiments.

2.ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบมะรุมในระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อการลดปริมาณโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 และรูปร่างสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

จากการศึกษาความพิษของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โดยมีค่า (IC_{50}) เท่ากับ 220 ± 22 µg/mL เมื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) คือ 55 µg/mL ต่อการลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Western blot พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุม สามารถลดปริมาณโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ได้ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณของ

โปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ที่ปรับเทียบค่ากับปริมาณของโปรตีน GAPDH แล้วเท่ากับร้อยละ 79, 63 และ 39 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยระยะเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 2) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบใบมะรุมสามารถลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ตามระยะเวลาที่เพิ่มในการทดสอบ อย่างไรก็ตาม ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (รูปที่ 3) โดยสัณฐานของเซลล์ยังปกติคือ ขอบเรียบ เซลล์รูปร่างกลม ไม่มี vacuole และ ไม่มี pseudopods

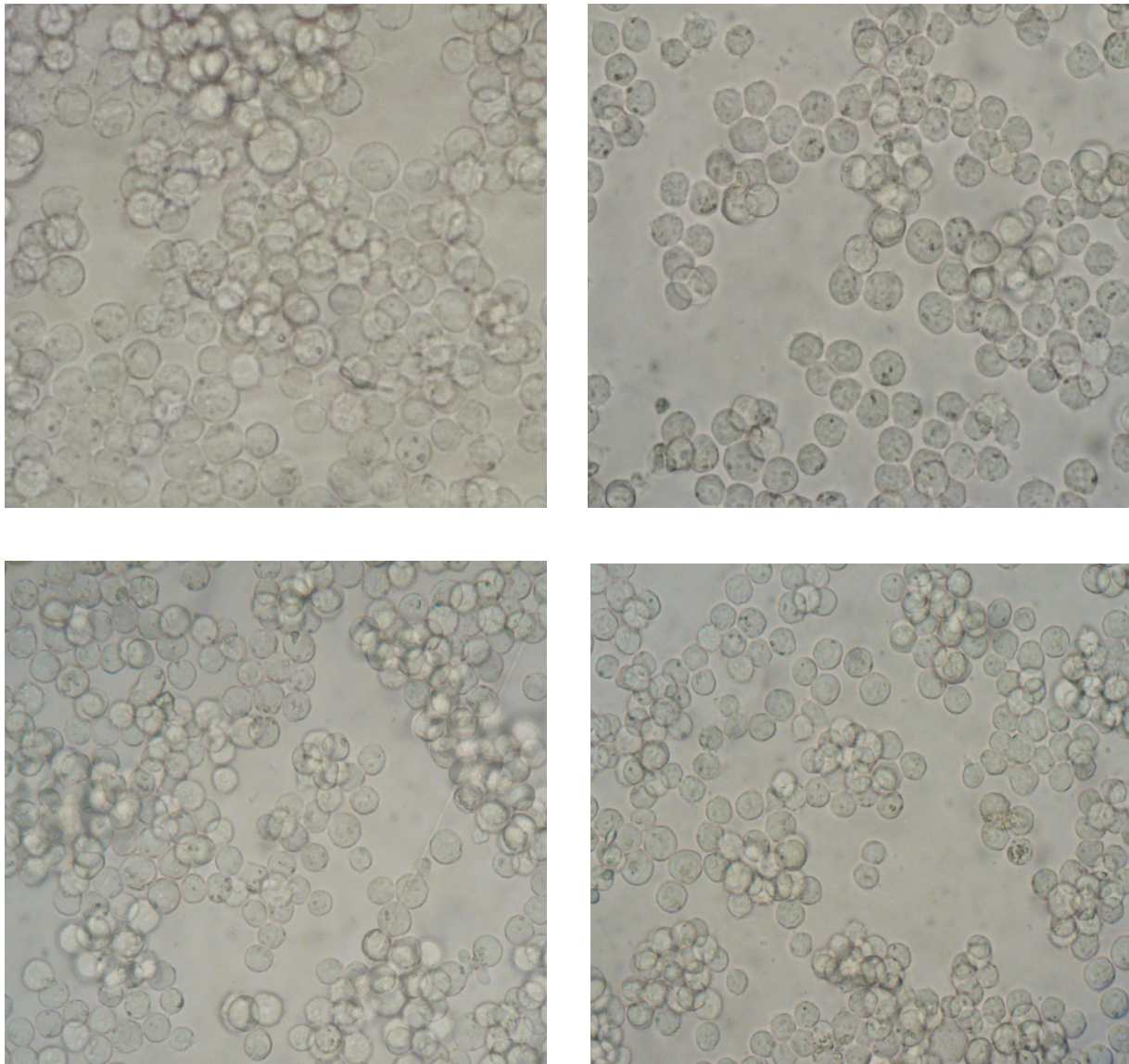


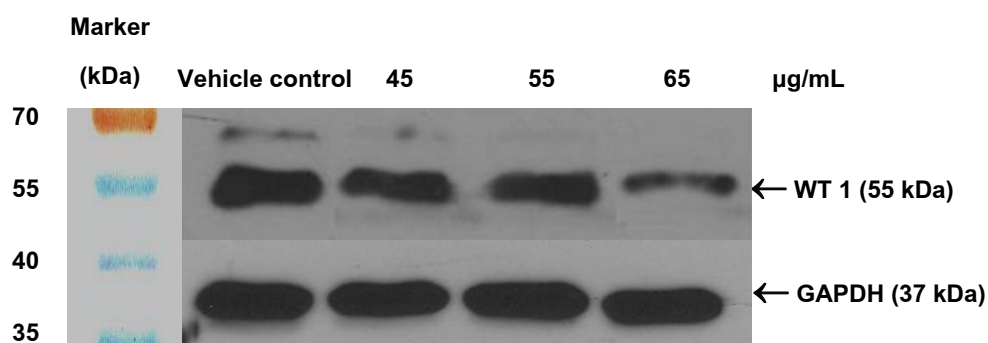
Figure 3 Effect of crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract on K562 cell morphology. K562 cell morphology was observed under inverted microscopy after treatment with 0.022% DMSO (A) or 55 µg/mL crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract for 24 (B), 48 (C), and 72 hours (D), respectively.

3.ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบมะรุมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 และรูปร่างสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ได้ตามระยะเวลาที่ทดสอบและไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาถึงผลของระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะรุมต่อการลดปริมาณของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยใช้ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ 45, 55 และ 65 µg/mL และใช้เวลาเลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Western blot และศึกษารูปร่าง

สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscopy พบว่าสารสกัดหยาบใบมะรุมสามารถลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ในเซลล์ K562 ได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยลดระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 หลังปรับเทียบค่ากับโปรตีน GAPDH คือร้อยละ 34, 48 และ 69 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทั้ง 3 ความเข้มข้น (45, 55 และ 65 µg/mL) มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4) นอกจากนี้ การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถลดปริมาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์ 1 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ K562 (รูปที่ 5)

(A)



(B)

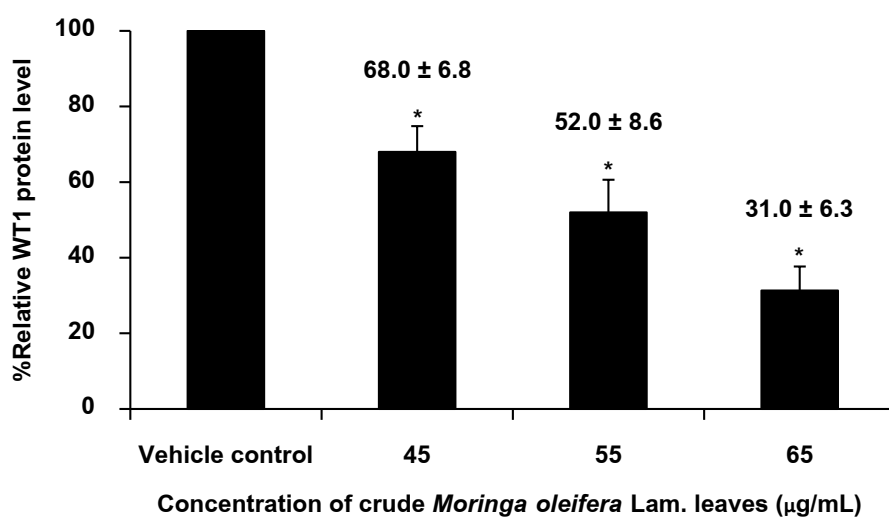


Figure 4 Effect of crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract on WT1 protein expression in K562 cell line. WT1 protein expression level was assessed by immunoblotting after treatment with various doses of crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract for 48 hours. GAPDH was used as a loading control (A). Densitometry was used to quantify the protein levels and presented as the percentage of vehicle control (B). Data are the mean value $\pm$ sem of three independent experiments. Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control ($p < 0.05$).

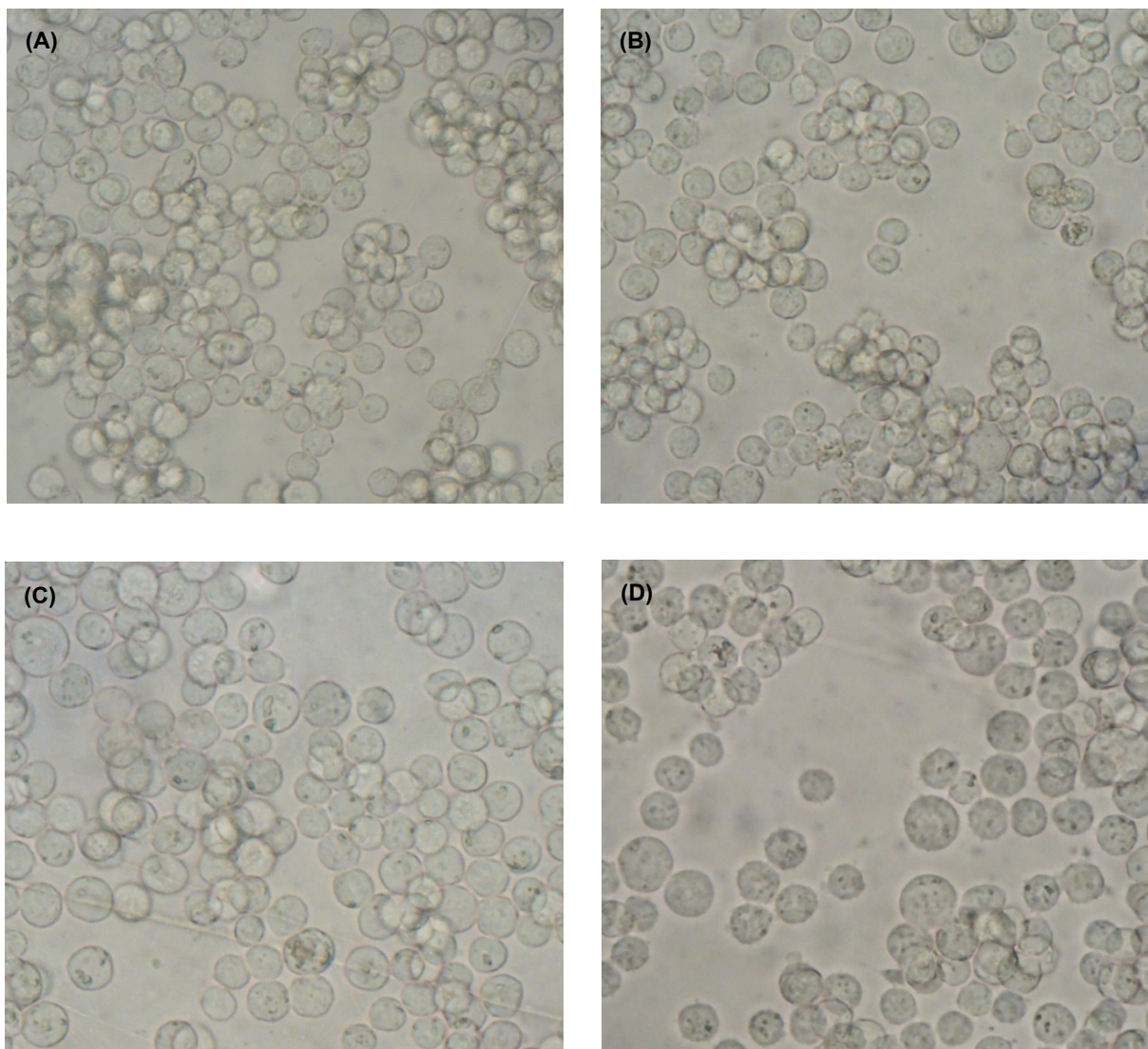


Figure 5 Effect of crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract on K562 cell line morphology. Cell morphology of K562 cell line was observed under inverted microscopy after treatment with 0.026% DMSO (A) or crude *Moringa oleifera* Lam. leaves extract as 45 µg/mL (B), 55 µg/mL (C) and 65 µg/mL (D)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 มีปริมาณของโปรตีนนิวลิทูเมอร์ 1 ในระดับสูงกว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Mol4 ซึ่งได้จากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL²² ดังนั้นการวิจัยนี้จึงใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากเมื่อทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบมะรุมต่อระดับของโปรตีนนิวลิทูเมอร์ 1 พบว่าผลการของสารสกัดหยาบใบมะรุมต่อการลดปริมาณของโปรตีนนิวลิทูเมอร์ 1 ที่ชัดเจน²³ การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (220±22 µg/mL) แต่ไม่มีความเป็นผลต่อเซลล์ PBMCs ปกติ

(ค่า IC₅₀ ของ PBMCs เท่ากับ 884.6 µg/mL) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถลดปริมาณของโปรตีนนิวลิทูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 โปรตีนนิวลิทูเมอร์ 1 เป็นดัชนีบ่งชี้มะเร็งเม็ดเลือดขาว มีรายงานการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนนี้มีผลโดยตรงกับการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โปรตีนนิวลิทูเมอร์ 1 จะเพิ่มปริมาณขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของยีนนิวลิทูเมอร์ 1 ประมาณ 1,000-10,000 เท่าเมื่อเทียบกับไขกระดูกปกติและเซลล์เม็ดเลือดปกติ จากการศึกษาพบว่าการสกัดหยาบใบมะรุมที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษ (IC₂₀) ต่อเซลล์ และใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลภายในเซลล์²⁴ เป็นความเข้มข้นที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการตายเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแปลผลการทดลอง โดยฤทธิ์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์นี้ส่งผลยับยั้ง

การแสดงผลของยีนนิวลิสมูเมอร์ 1 ทำให้การแบ่งตัวเพิ่มของเซลล์นั้นลดลง จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เมื่อเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบใบมะรุ้ม ที่ความเข้มข้น 45, 55 และ 65 µg/mL นาน 48 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงร้อยละ 8, 18 และ 35 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การลดระดับของโปรตีนนิวลิสมูเมอร์ 1 เป็นไปตามระยะเวลาและตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (a time- and dose-dependent manner) นอกจากนี้ยังมีการดูสัณฐานวิทยาของเซลล์ว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบส่งผลทำให้เซลล์ตายหรือไม่ การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์เป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าความเข้มข้นที่ใช้เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส²⁵ หากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เช่น มี vacuole หรือมี pseudopods แสดงว่าความเข้มข้นที่ใช้อาจเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิส ในการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะรุ้มที่ใช้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และไม่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส โดยการสังเกตสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับเซลล์ในชุดควบคุม เคยมีรายงานว่าสารสกัดมะรุ้มที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์ (anti-proliferation) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส²⁶

นอกจากนี้สาร niaziminin และ thiocarbamate จากใบมะรุ้มยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) โดยยับยั้งการส่งเสริมการเกิดมะเร็งโดยเชื้อไวรัส Epstein-Barr^{27,28} และมีรายงานว่าสารสกัดหยาบราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงความเป็นพิษ (IC₅₀) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.6±0.2 µg/mL โดยระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษ (IC₂₀) ที่ 0.6 µg/mL สามารถลดปริมาณของโปรตีนนิวลิสมูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ได้ตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น²⁹ ดังนั้นจากการศึกษาทั้งหมดนี้จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างมากถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของใบมะรุ้ม ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและสามารถยับยั้งการแสดงผลของโปรตีนนิวลิสมูเมอร์ 1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 นับเป็นการรายงานครั้งแรก นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้ยังแสดงให้เห็นเด่นชัดว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบมะรุ้มที่สามารถลดปริมาณของโปรตีนนิวลิสมูเมอร์ 1 ได้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาในระดับการแสดงผลของยีนนิวลิสมูเมอร์ 1 และวิเคราะห์ถึงคุณสมบัติของสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดจากใบมะรุ้มโดยการแยกวิเคราะห์ส่วนประกอบสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ รวมถึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว

References

1. Horseradish tree. [cited 2009 Junly 1] Available from: <http://www.medplant.mahidol.ac.th/document/moringa.asp>. (in Thai)
2. Jung IL. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. PLoS One 2014; 9(4): e95492.
3. Abdellatef E, Daffalla HM, Nassrallah AA, Aboul-Enein KM, El-Shemy HA. Antiproliferative Action of *Moringa oleifera* Lam. Root Extract in Acute Myeloid Leukemia (AML) cell line. Journal of Experimental Sciences 2010; 1(8): 27-8.
4. Pamok S, Saephet S, Viniketkumnuen U, Saenphet K. Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells Journal of Medicinal plant Research 2012; 6(1): 139-45.
5. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Simultaneous HPLC quantitative analysis of active compounds in leaves of *Moringa oleifera* Lam. J Chromatogr Sci 2014; 52(7): 641-5.

6. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 937-43.
7. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 2000; 48(11): 5512-6.
8. Rodriguez de Sotillo DV, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr Biochem* 2002; 13(12): 717-26.
9. Zhang X, Huang H, Yang T, Ye Y, Shan J, Yin Z, et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Injury* 2010; 41(7): 746-52.
10. Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W, Suemura M, et al. Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(1 Pt 1): 159-66.
11. Soromou LW, Chen N, Jiang L, Huo M, Wei M, Chu X, et al. Astragalin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF-kappaB signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419(2): 256-61.
12. 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(9): 3071-9.
13. Bergmann L, Maurer U, Weidmann E. Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 1997; 25(5-6): 435-43.
14. Menssen HD, Renkl HJ, Entezami M, Thiel E. Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth. *Blood* 1997; 89(9): 3486-7.
15. Yamagami T, Ogawa H, Tamaki H, Oji Y, Soma T, Oka Y, et al. Suppression of Wilms' tumor gene (*WT1*) expression induces G2/M arrest in leukemic cells. *Leuk Res* 1998; 22(4): 383-4.
16. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the *Wilms tumor* gene (*WT1*) in human leukemia. *Blood* 1997; 89(4): 1405-12.
17. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the *Wilms' tumor* gene (*WT1*) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol* 1997; 25(4): 312-20.
18. 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(9): 945-50.
19. Sugiyama H. *Wilms' tumor* gene *WT1*: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001; 73(2): 177-87.
20. 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.
21. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of *Wilms' tumor* gene (*wt1*) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9(6): 1060-7.
22. Anuchapreeda S, Tima S, Duangrat C, Limtrakul P. Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on *WT1* gene expression in leukemic cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62(4): 585-94.

23. Singkome Tima. Effect of Turmeric Curcuminoid on *Wilms' Tumor 1 (WT1)* gene and WT1 protein expression in Leukemic cellines. [Thesis]. Faculty of Associated Medical Sciences: Chiang Mai University; 2006. (in Thai)
24. Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney CA, Anuchapreeda S. Inhibitory mechanism of pure curcumin on *Wilms' tumor 1 (WT1)* gene expression through the PKCalpha signaling pathway in leukemic K562 cells. *FEBS Lett* 2011; 585(14): 2235-42.
25. Yu HZ, Li YH, Wang RX, Zhou X, Yu MM, Ge Y, et al. Cytotoxicity of lidocaine to human corneal endothelial cells in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014; 114(4): 352-9.
26. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(6): 1270-5.
27. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res* 2007; 21(1): 17-25.
28. Murakami A, Kitazono Y, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Planta Med* 1998; 64(4): 319-23.
29. Semsri S, Kaewoudorn N, Jaipukdee N, Chorachan N, Horata N. Effect of crude ethanolic extract of Ratchadat (*Brucea amarissima*) fruit on cell cytotoxicity and Wilms' tumor 1 protein expression in K562 leukemic cell line. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2014; 47(1): 45-52.