

ผลของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลของ ราชดัด (*Brucea amarissima*) ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ และการแสดงออกของโปรตีนวิลส์ทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

Effect of crude ethanolic extract of Ratchadat (*Brucea amarissima*) fruit on cell cytotoxicity and Wilms' tumor 1 protein expression in K562 leukemic cell line

■ สุวรรณา เสมศรี นวลจันทร์ แก้วอุดร นันทภรณ์ ใจักดี
Suwanna Semsri Nuanchun Kaewoudorn Nuntaporn Jaipukdee
นภาพร ชรชาญ ณัฐรีณี หอระตะ
Naphaorn Chorachan Natharinee Horata

คณะทันตการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ 10540

*ผู้รับผิดชอบบทความ (E-mail: ssemsri@gmail.com)

Received December 2013

Accepted as revised January 2014

Abstract

Introduction: Leukemia is a hematologic cancer. It is characterized by the uncontrolled production of blood cells. It has been shown that leukemic cells overexpressed WT1 gene level compared to normal blood cells. Ratchadat (*Brucea amarissima*) is a herb that its fruits have been used in traditional Chinese medicine to treat malaria, amoebiasis as well as cancers.

Objective: The purpose of this study is to investigate the cytotoxicity effect of crude ethanolic Ratchadat fruit extract on K562 cells and the effect of non-cytotoxic dose on Wilms'tumor 1 (WT1) protein expression.

Materials and methods: The cytotoxicity of crude ethanolic Ratchadat fruit extract on K562 cells was determined by MTT assay. The WT1 protein levels were examined by Western blot analysis.

Results: The crude ethanolic Ratchadat fruit extract showed cytotoxic effect on K562 cells with the inhibitory concentration at 50% growth (IC_{50}) value of $1.6 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ but did not affect PBMCs. Non-cytotoxic dose (IC_{20}) value ($0.6 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) of crude extract decreased WT1 protein levels at the various time periods of 24, 48, and 72 hours by 16, 38, and 43%, respectively. In addition, at 48 hours of incubation with various doses (0.4, 0.6, and $0.8 \mu\text{g/mL}$) could reduce WT1 protein levels by 12, 37, and 45%, respectively.

Conclusions: The crude ethanolic extract of Ratchadat fruit could induce cell cytotoxicity and reduce WT1 protein expression in a dose- and time-dependent manner. However, it did not affect PBMCs. It also exhibited strong anti-cancer properties higher than vincristine (chemotherapeutic drug) for 16.5 fold.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2014; 47(1): 45-52

Keywords: cytotoxicity, MTT assay, WT1 protein, *Brucea amarissima*, K562 cell line

บทคัดย่อ

บทนำ: มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยาซึ่งเกิดจากการสร้างเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่สามารถควบคุมได้ และพบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโปรตีนนิวโรโมเออร์วัน เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดปกติ ราชดัด (*Brucea amarissima*) เป็นสมุนไพรและมีรายงานการใช้ผลของราชดัดในการแพทย์แผนจีนโบราณสำหรับรักษามะเร็ง บิด และ มะเร็ง

วัตถุประสงค์: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากผลราชดัดด้วยเอทานอลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเพาะเลี้ยงชนิด K562 และผลของความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ต่อการแสดงออกของโปรตีนนิวโรโมเออร์วัน

วัสดุและวิธีการ: ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากผลราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 โดยวิธี MTT และศึกษาการแสดงออกของโปรตีนนิวโรโมเออร์วันด้วยวิธี Western blot

ผลการศึกษา: สารสกัดหยาบจากผลราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1.6 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) แต่ไม่มีผลต่อ PBMCs และระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) ของสารสกัดหยาบ (0.6 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนนิวโรโมเออร์วันในช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้ร้อยละ 16, 38 และ 43 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ระดับ 0.4, 0.6 และ 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนนิวโรโมเออร์วันได้ร้อยละ 12, 37 และ 45 ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา: สารสกัดหยาบจากผลราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์และลดการแสดงออกของโปรตีนนิวโรโมเออร์วันเป็นไปตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษายังพบว่าสารสกัดหยาบไม่มีพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติ และยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่ายาวินคริสติน (ยาต้านมะเร็ง) เป็น 16.5 เท่า วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2557; 47(1): 45-52

คำรหัส: ความเป็นพิษต่อเซลล์ วิธีเอ็มทีที โปรตีนนิวโรโมเออร์วัน ราชดัด เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

บทนำ

ราชดัดเป็นพืชสมุนไพรวงศ์เดียวกับสีพันคนทาและประดาดใหญ่ พบในป่าโปร่งทุกภาคของประเทศไทย โดยมีชื่ออื่นที่ใช้เรียกแตกต่างกันไปในแต่ละภาค เช่น ทางภาคใต้เรียกว่า กะดัดหรือจะดัด ภาคกลางเรียกว่า ดีคน ตราดเรียกว่าพญาตาบหัก เชียงใหม่เรียกว่า กาจับหลัก หรือมะดีควาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brucea amarissima* (Lour.) Merr อยู่ในวงศ์ Simaroubaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่มใหญ่สูงประมาณ 2-3 เมตร ทรงพุ่มโปร่ง ใบประกอบแบบขนนก มีก้านใบยาว เรียงสลับอยู่ห่างๆ ใบย่อยแต่ละใบเป็นรูปไข่แกมรูปใบหอก หรือรูปรี ปลายแหลม ขอบจัก มีขนนุ่มๆ ทั้ง 2 ด้านดอกเล็กๆ สีน้ำตาลแกมแดง ออกดอกเป็นช่อยาวที่ซอกใบ ผลรูปไข่ปลายแหลมขนาดเล็ก เมื่อแห้งมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ผิวย่นคล้ายเมล็ดมะละกอแห้ง (รูปที่ 1) ปัจจุบันมีการปลูกตามสวนสมุนไพรเกือบทุกแห่ง เนื่องจากผลราชดัดสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคบิด แก้อท้องเสีย และแก้ไข้ได้ดี นอกจากนี้ส่วนใบยังใช้ถอนพิษสัตว์กัดต่อยด้วย ในปัจจุบันมีการสนับสนุนการค้นคว้าตัวยาจากสารสกัดสมุนไพรหรือพืชผักพื้นบ้าน เพื่อมาทำการรักษามะเร็งมากขึ้น¹ จากการศึกษาที่ผ่านมาการรายงานเกี่ยวกับ

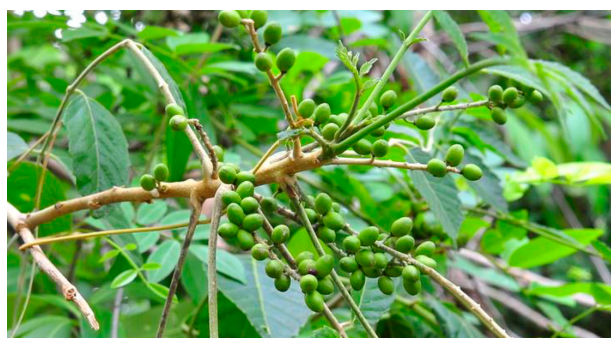


Figure 1 *Brucea amarissima*²⁵

กับสารสกัดจากราชดัดที่มีฤทธิ์ใน การรักษา มะเร็ง เช่น สารออกฤทธิ์ brusatol ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากผลของราชดัดสามารถส่งเสริมการพัฒนาการของเซลล์ (cell differentiation) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL60 ให้กลายเป็นตัวแก่โดยกระตุ้นการทำงานของโปรตีน NF- κ B ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของ NF- κ B เข้าไปในนิวเคลียสแล้วส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาการของเซลล์² นอกจากนี้ ยังมีการรายงานว่าสาร flavone และ chrysoeriol ที่สกัดมาจากส่วนใบและก้านของราชดัด สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL-60 และมีบทบาทใน การเพิ่มระดับของ reactive oxygen

species (ROS) ซึ่งช่วยเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการรักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวเรื้อรังชนิด CLL3 ต่อมาได้มีรายงานว่าสาร quassinoids จากผลราชตัดสามารถยับยั้งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytic leukemia ในหลอดทดลองได้⁴ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของผลราชตัดใน ลักษณะของการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเรื้อรังชนิด CML รวมทั้งการศึกษาการยับยั้งในโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจ อย่างยิ่งที่จะศึกษาในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดดังกล่าว รวมถึงการศึกษาในระดับอนุชีวโมเลกุล ในการยับยั้ง การแสดงออกของโปรตีน วิลมทูเมอร์วัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นใน ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในตรวจและติดตามการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว⁵

ยีนวิลมทูเมอร์วัน (*Wilms' tumor 1 gene* หรือ *WT1 gene*) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนวิลมทูเมอร์วัน ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติซึ่งมีการแสดงออกในระดับน้อยๆ^{6,7} โดยพบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นมะเร็งเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วัน⁸ เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเกือบทุกชนิด⁷ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันใน CD34+ leukemic cells มีค่าที่สูงกว่าระดับการแสดงออกใน CD34+ normal cells อย่างน้อยประมาณ 10 เท่า⁹ สามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันในเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนทั้งในกระแสเลือดและไขกระดูกในระดับที่ต่ำมากและมีระดับลดลงเรื่อยๆ เมื่อเซลล์เกิดกระบวนการพัฒนาของเซลล์ ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดตัวเต็มวัย^{10,11} อย่างไรก็ตาม โปรตีนวิลมทูเมอร์วันจะมีการแสดง ออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว^{5,12} โดยพบว่าโปรตีน วิลมทูเมอร์วันมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) การพัฒนาของเซลล์และกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส (cell apoptosis) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว^{13,14} นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันยังเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มที่กลับมาเป็นโรครีแอส (relapse case) จากการรายงานนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังนั้นการแสดงออกของยีนวิลมทูเมอร์วันจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจสอบการดำเนินของโรคได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบผลราชตัดที่สกัดด้วยเอทานอลต่อความเป็นพิษต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิลมทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี Western blot

วัสดุและวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 (human chronic myeloid leukemia) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.นายสุรีย์ 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 fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80

2. การเตรียมเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)

เจาะเลือดอาสาสมัครสุขภาพดีจากเส้นเลือดดำปริมาตร 8 mL ใส่ลงในหลอดแยกเซลล์ PBMCs สำเร็จรูป (BD vacutainer CPT) ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,800xg เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดเก็บเซลล์ PBMCs แล้วปั่นล้างด้วย sterile PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ที่ความเร็ว 300xg หลังจากนั้นเก็บเซลล์เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3. สารสกัดหยาบจากผลราชตัดที่สกัดด้วยเอทานอลที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดหยาบจากผลราชตัดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติทวี ขวุงศ์โกมล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากผลราชตัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs)

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากผลราชตัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยวิธี MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide] โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^5 cells/mL สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว ใช้เซลล์ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5×10^6 cells/mL เพาะเลี้ยงใน 96-well tissue culture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี 10% FBS ปริมาตร 100 µL ต่อหลุม บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบจากผลราชตัดที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 ถึง 50 µg/mL โดยในชุดควบคุม (vehicle control; VC) เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะ dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 0.2 เลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 20 μ L แล้วบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้งเติม DMSO เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 620 nm โดยในแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 หลุม และแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน การคำนวณร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม ดังสมการ

ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) = (ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ / ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม) X 100

5. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากผลราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน วิตามินเออร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ด้วยวิธี Western blot

ใช้เซลล์ 2.0×10^5 cells/mL กลุ่มทดสอบเติมสารสกัดหยาบจากผลราชดัดด้วยเอทานอลในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{20}) ในขณะที่กลุ่มควบคุมเติมเฉพาะ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละเท่ากับความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ในกลุ่มทดสอบ โดยในการทดลองครั้งนี้มีร้อยละของ DMSO สูงสุดเท่ากับ 0.0032 นำเซลล์ K562 ที่ผ่านการทดสอบมาทำการสกัดโปรตีนรวมด้วยน้ำยา RIPA และหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Folin-Lowry หลังจากนั้นจึงนำโปรตีนที่สกัดได้จากการทดลองปริมาณ 50 μ g มาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนวิตามินเออร์วันโดยวิธี Western blot โดยใช้ rabbit polyclonal anti-WT1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, california, USA) และ goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Promega, Madison, USA) ตามลำดับและใช้ rabbit polyclonal anti-GAPDH

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

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงในรูปของ mean $\pm$ sem ระดับการแสดงผลออกโปรตีนวิตามินเออร์วันทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษา

1.ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบผลราชดัดต่อการยับยั้งการเจริญ

เติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากผลราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสารสกัดหยาบผลราชดัดแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.6 ± 0.18 μ g/mL และแสดงค่าที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีค่า IC_{20} เท่ากับ 0.6 ± 0.03 μ g/mL (รูปที่ 2 และ ตารางที่ 1)

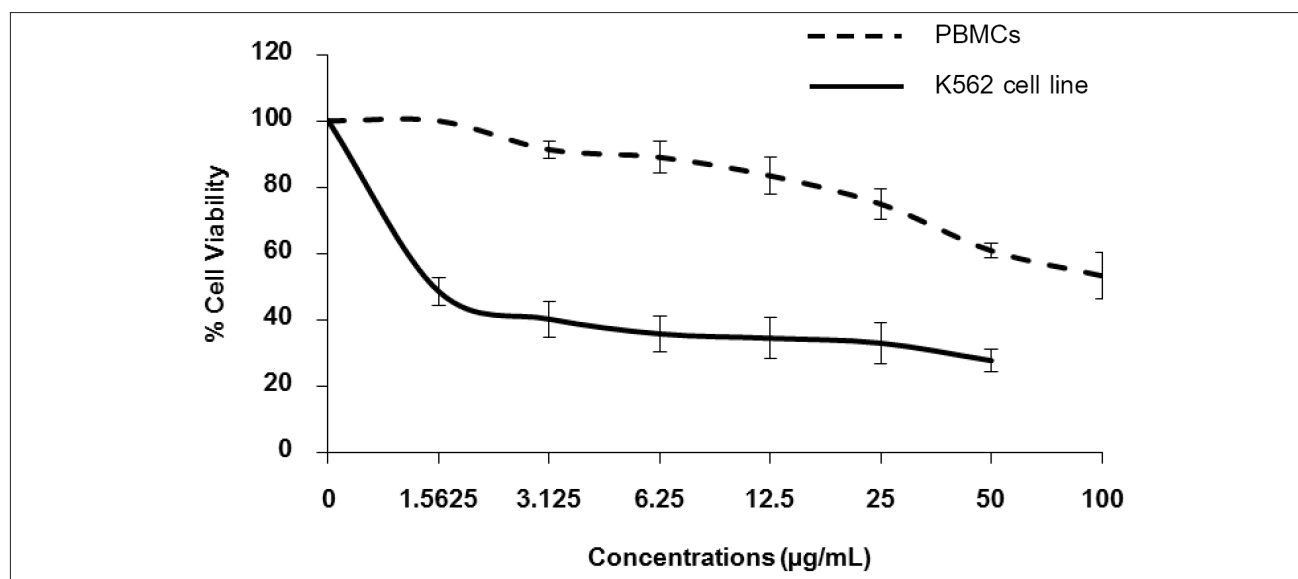


Figure 2 Cytotoxicity of crude *Brucea amarissima* fruit extract on K562 cell line and PBMCs ($n=5$) by MTT assay. Data are the mean $\pm$ sem of three independent experiments.

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงคุณสมบัติความจำเพาะในการความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติ จากการศึกษพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบผลราชัดที่ระดับความเข้มข้น 1.6 µg/mL ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 มีชีวิตรอดร้อยละ 50 ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติมีชีวิตรอด ร้อยละ 98 (รูปที่ 2) ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากผลราชัดมีความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยไม่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว คนปกติ โดยสารสกัดหยาบผลราชัดมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็น 57.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว ที่ระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ร้อยละ 50 (ตารางที่ 1)

Table 1 Cytotoxicity of crude *Brucea amarissima* fruit extract K562 cell line and PBMCs

Experiment	IC ₂₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
K562 cell line	0.6±0.03	1.6±0.18
PBMCs	17.6±6.30	92.2±7.83
PBMCs : K562 ratio	29.3	57.6

2. การเปรียบเทียบของสารสกัดหยาบจากผลราชัดกับยาเคมีบำบัดชนิดวินคริสติน (vincristine)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสกัดหยาบผลราชัด ด้วยเอทานอลกับยาเคมีบำบัดชนิดวินคริสตินซึ่งเป็นยาที่สกัดได้จากรากแพงพวยฝรั่ง¹⁵ และนิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่าสารสกัดหยาบจากผลราชัดที่ระดับความเข้มข้น 1.6 µg/mL สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

ชนิด K562 ได้ร้อยละ 50 ในขณะที่สารมาตรฐาน vincristine ใช้ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 26.4 µg/mL จึงสามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ได้ร้อยละ 50 (รูปที่ 3) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบผลราชัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีกว่ายาเคมีบำบัดชนิดวินคริสตินเท่ากับ 16.5 เท่า (ตารางที่ 2) ซึ่งให้เห็นว่าสารสกัดหยาบผลราชัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีกว่ายาเคมีบำบัดชนิดวินคริสติน

3. ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบผลราชัดต่อการลดระดับการแสดงออกโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

แสดงออกโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562

สารสกัดหยาบผลราชัดด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 (IC₂₀) ที่ความเข้มข้น 0.6 µg/mL สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ตามระยะเวลาที่ทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 16, 38 และ 43 ตามลำดับ (รูปที่ 4) ซึ่งเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสารสกัดหยาบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) นอกจากนี้ระยะเวลาที่ทำการทดสอบ 48 ชั่วโมง ยังแสดงให้เห็นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผลราชัดสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (0.4, 0.6 และ 0.8 µg/mL) โดยยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนได้ร้อยละ 12, 37 และ 45 (รูปที่ 5) โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบผลราชัดที่ 0.6 และ 0.8 µg/mL สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

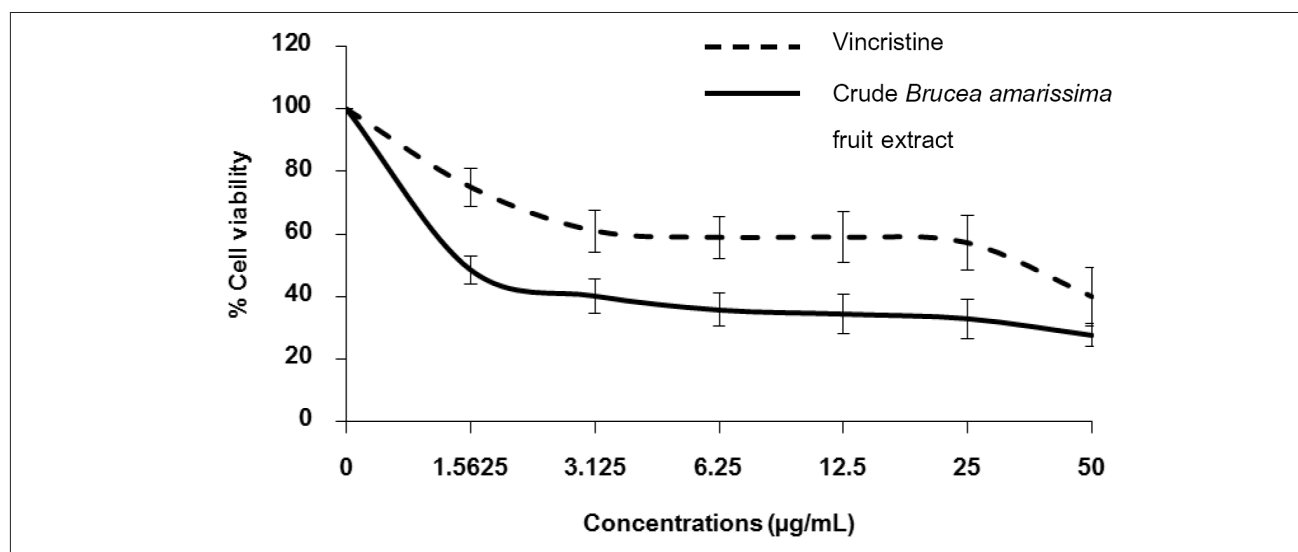


Figure 3 Cytotoxicity of crude *Brucea amarissima* fruit extract and vincristine on K562 cell line. Data are the mean value±sem of three independent experiments.

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากผลราชดัดที่สกัดด้วยเอทานอลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลราชดัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.6 $\mu\text{g/mL}$ ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ quassinoids จากผลราชดัดสามารถยับยั้งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytic leukemia ในหลอดทดลองได้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสาร bruceosides C ที่สกัดได้จากผลของราชดัด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด KB, A-549, RPMI และ TE-67116 และพบการฉีดสารที่มีน้ำมันจากราชดัดเป็นส่วนผสมเข้าเส้นโลหิตดำในผู้ป่วยมะเร็งที่ปอดมีการกระจายของเซลล์มะเร็งเข้าสู่สมองพบว่ามีการดีขึ้น¹⁷ รวมถึงการพบว่า น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดของราชดัดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการ

ตายแบบอะพอพโทสิสได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเนื้องอกโดยอาศัย death receptors และการส่งสัญญาณผ่านไมโทคอนเดรีย (mitochondrial-related pathways)¹⁸ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสได้ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด pancreatic adenocarcinoma โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนแคสเปส 3 (caspase 3)¹⁹ นอกจากนี้ ในระดับความเข้มข้น 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนนิวลิเมอริวเมอริว ได้ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (24, 48 และ 72 ชั่วโมง) และตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (0.4, 0.6 และ 0.8 $\mu\text{g/mL}$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีการศึกษาสารสกัดบริสุทธิ์เคอร์คิวมิน สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนนิวลิเมอริวเมอริว ได้ตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และ Molt4²⁰⁻²² และในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเนื้องอกและเรื้อรัง²³

Table 2 Comparison of crude *Brucea amarissima* fruit extract and vincristine on K562 cell line

Experiment	IC_{20} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Crude <i>Brucea amarissima</i> fruit extract	0.6 $\pm$ 0.03	1.6 $\pm$ 0.18
Vincristine	0.7 $\pm$ 0.17	26.4 $\pm$ 3.67
Vincristine : Crude <i>Brucea amarissima</i> fruit extract ratio	1.2	16.5

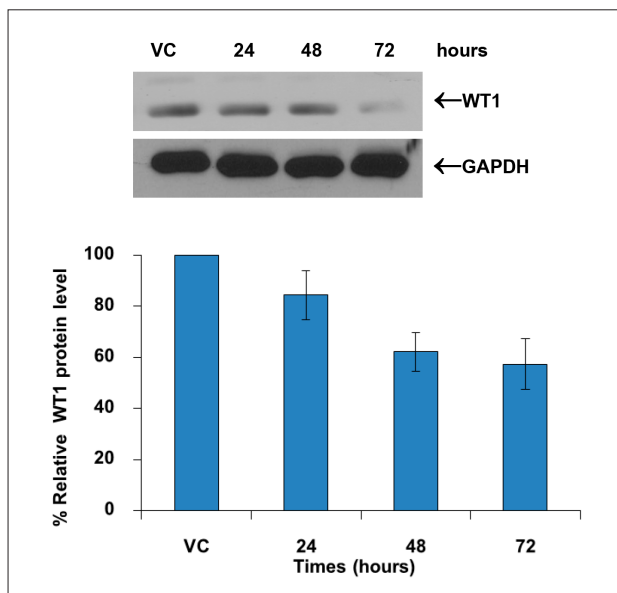


Figure 4 Effect of crude *Brucea amarissima* fruit extract on WT1 protein expression in K562 cell line. The WT1 protein expression level was assessed by immunoblotting after treatment with 0.6 $\mu\text{g/mL}$ crude *Brucea amarissima* fruit extract for 24, 48 and 72 hours. GAPDH was used as loading control. Densitometry was used to quantify the protein levels and graphed as the percentage of vehicle control. Data are the mean value $\pm$ sem of three independent experiments. Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control ($p < 0.05$).

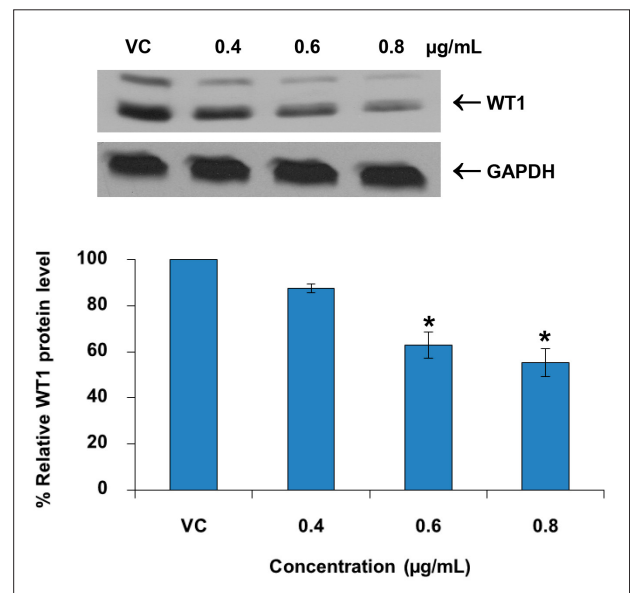


Figure 5 Effect of crude *Brucea amarissima* fruit extract on WT1 protein expression in K562 cell line. The WT1 protein expression level was assessed by immunoblotting after treatment with various doses of crude *Brucea amarissima* fruit extract for 48 hours. GAPDH was used as loading control. Densitometry was used to quantify the protein levels and graphed as the percentage of vehicle control. Data are the mean value $\pm$ sem of three independent experiments. Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control ($p < 0.05$).

การศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบผลราชดัดต่อความจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง โดยศึกษาทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติ พบว่า สารสกัดหยาบผลราชดัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว โดยมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เป็น 57.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากคนปกติซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่พบว่าสารสกัดหยาบดัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ cervical squamous cell carcinoma ที่ความเข้มข้น 2 µg/mL แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ (primary human keratinocytes; PHKs) ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ 35 µg/mL จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PHKs²⁴ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบผลราชดัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดีกว่ายาเคมีบำบัดวินคริสติน 16.5 เท่า

ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 ยังสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนนิวลิเมออร์วันได้ทั้งระยะเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผลราชดัดอาจมีผลรบกวนกระบวนการในการสังเคราะห์โปรตีนของโปรตีนนิวลิเมออร์วัน ส่งผลทำให้การแสดงออกของโปรตีนนิวลิเมออร์วัน

ลดลง หรืออาจจะรบกวนการส่งสัญญาณ (signal transduction) ภายในเซลล์และยับยั้งการแสดงออกของยีนนิวลิเมออร์วัน ซึ่งมีผลกระทบต่อเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 เนื่องจากยีนและโปรตีนนิวลิเมออร์วันมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์¹⁴ อย่างไรก็ตาม จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีนนิวลิเมออร์วันในระดับ mRNA และศึกษาเชิงลึกของสารสกัดบริสุทธิ์จากผลราชดัดต่อการลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ รวมถึงการศึกษากลไกของสารสกัดจากผลราชดัดบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนนิวลิเมออร์วัน เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร. เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล ภาควิชาชีวเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่จัดเตรียมสารสกัดหยาบราชดัด ผศ.ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการอนุเคราะห์ยาเคมีบำบัดวินคริสติน และขอขอบคุณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติสนับสนุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Thaicrodedrug. Ubon Ratchathani University. Brucea javanica [cited 2013 March 12] Available from: <http://www.thaicrodedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=116>. (in Thai)
2. Cuendet M, Gills JJ, Pezzuto JM. Brusatol-induced HL-60 cell differentiation involves NF-kappaB activation. *Cancer Lett.* 2004; 206: 43-50.
3. Kim JA, Lau EK, Pan L, De Blanco EJ. NF-kappaB inhibitors from Brucea javanica exhibiting intracellular effects on reactive oxygen species. *Anticancer Res.* 2010; 30: 3295-300.
4. Kupchan SM, Britton RW, Lacadie JA, Ziegler MF, Sigel CW. The isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from Brucea antidysenterica. *J Org Chem.* 1975; 40: 648-54.
5. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa 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.
6. Bergmann L, Maurer U, Weidmann E. Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma.* 1997; 25: 435-43.
7. 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: 3486-7.
8. Yamagami T, Ogawa H, Tamaki H, et al. Suppression of Wilms' tumor gene (WT1) expression induces G2/M arrest in leukemic cells. *Leuk Res.* 1998; 22: 383-4.
9. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood.* 1997; 89: 1405-12.
10. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol.* 1997; 25: 312-20.
11. 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.

12. Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol.* 2001; 73: 177-87.
13. 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.
14. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, 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.
15. Cassady JM, Baird WM, Chang CJ. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *J Nat Prod.* 1990; 53: 23-41.
16. Anderson MM, O'Neill MJ, Phillipson JD, Warhurst DC. In vitro cytotoxicity of a series of quassinoids from *Brucea javanica* fruits against KB cells. *Planta Med.* 1991; 57: 62-4.
17. Lu JB, Shu SY, Cai JQ. [Experimental study on effect of *Brucea javanica* oil emulsion on rabbit intracranial pressure]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1994; 14: 610-1.
18. Zhang H, Yang JY, Zhou F, et al. Seed Oil of *Brucea javanica* Induces Apoptotic Death of Acute Myeloid Leukemia Cells via Both the Death Receptors and the Mitochondrial-Related Pathways. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 1-14.
19. Lau ST, Lin ZX, Zhao M, Leung PS. *Brucea javanica* fruit induces cytotoxicity and apoptosis in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Phytother Res.* 2008; 22: 477-86.
20. Anuchapreeda S, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P, Limtrakul P. Curcumin inhibits WT1 gene expression in human leukemic K562 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27: 360-6.
21. 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: 585-94.
22. Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney CA, Anuchapreeda S. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor 1 (WT1) gene expression through the PKC α signaling pathway in leukemic K562 cells. *FEBS Lett.* 2011; 585: 2235-42.
23. Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P. Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res.* 2006; 29: 80-7.
24. Gao H, Lamusta J, Zhang WF, et al. Tumor Cell Selective Cytotoxicity and Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from *Brucea javanica*. *N Am J Med Sci (Boston).* 2011; 4: 62-6.
25. *Brucea javanica*. [cited 2014 January 1] Available from: <http://www.ayurvedicthai.com/>. (in Thai)