ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบของสารฟลาโวนอลจากพลูคาว

นางสาวเชาวณี วังช่วย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
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 Graduate School.

ANTI-LEUKEMIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB'S FLAVONOLS

Miss Chaowanee Wangchauy

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 2011
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบของสารฟลาโวนอลจากพลูคาว
โดย	นางสาวเชาวณี วังช่วย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

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

…………………………………………… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. มลธิรา พรมกัณฑ์)

นางสาวเชาวณี วังช่วย: ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบของสารฟลาโวนอลพลูคาว. (ANTI-LEUKEMIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB'S FLAVONOLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร. สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ, 144 หน้า.

พลูคาวเป็นพืชพื้นถิ่นที่มีมากในภาคเหนือของไทย มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายรวมทั้งฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและต้านการอักเสบ สารออกฤทธิ์ที่พบในพลูคาวมีหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ น้ำมันหอมระเหย และอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ในกลุ่มย่อยฟลาโวนอลที่พบได้ในพลูคาว คือ รูติน เคอร์เซติน ไอโซเคอร์เซติน และไฮเปอร์ริน แม้ว่าฟลาโวนอยด์มีสมบัติเป็นประโยชน์ที่หลากหลายแต่พบว่ามีการศึกษาถึง รูติน และไอโซเคอร์เซติน ค่อนข้างน้อย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาว เคอร์เซติน ไอโซเคอร์เซตินและรูติน ในการยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดพลูคาว เคอร์เซติน ไอโซเคอร์เซติน และรูติน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat, K562 และ U937 โดยวิธี XTT assay มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 404.89-456.17 µg/ml ในสารสกัดพลูคาว และ 61.48-114.16 µg/ml ในสารฟลาโวนอล จากผลการทดสอบ microscopic analysis พบรูปแบบการหดแฟบของเยื่อหุ้มเซลล์ (blebbing pattern) ของการเกิดอะโพโทซิสภายหลังการบ่มเซลล์ด้วยเคอร์เซติน ไอโซเคอร์เซตินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดพลูคาวที่ความเข้มข้น 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้สารสกัดพลูคาว เคอร์เซติน ไอโซเคอร์เซติน และ รูติน สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสภายหลังการบ่มเซลล์ที่เวลา12 และ 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เมื่อทำการศึกษาไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องพบว่า สารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล โดยเฉพาะสารเคอร์เซติน และไอโซเคอร์เซติน ให้ผลในการลดปริมาณการหลั่งของไซโตไคน์ที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด (IL-2) และกระบวนการอักเสบ (IL-6, IL-8, IFN--γ และ TNF-α)ลดลงอย่างชัดเจน จากการวิจัยในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า พลูคาวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและต้านการอักเสบของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาทางด้านกลไกระดับโมเลกุลเพิ่มเติม

ภาควิชา จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ลายมือชื่อนิสิต..........................

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..........................

ปีการศึกษา 2554

5377213837 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES
KEYWORDS : LEUKEMIA, HOUTTUYNIA CORDATA, FLAVONOLS, APOPTOSIS

CHAOWANEE WANGCHAUY : ANTI-LEUKEMIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB'S FLAVONOLS. ADVISOR : SUPANTITRA CHANPRASERT, Ph.D., 145 pp.

Houttuynia cordata Thunb. (*H.cordata*), which is local plant in Northern Thailand, has a wide range of biological activities including anti-cancer and anti-inflammatory activities. It consists of several components such as flavonoids, volatile oils and alkaloids. Major representatives of flavonol subgroup of flavonoids found in *H.cordata* are rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin and hyperin. Despite the fact that flavonoids show various beneficial properties, there are few studies involving isoquercetin and rutin. In this study we aimed to investigate whether *H.cordata* extract, quercetin, isoquercetin and rutin possess anti-leukemic effects through an apoptotic pathway in Jurkat, K562 and U937 human leukemic cell lines. Using the XTT assay we found that *H.cordata* extract, isoquercetin and rutin inhibited growth of all leukemic cell lines. In microscopic analysis, blebbing pattern of cell apoptosis was found in cells treated with quercetin, isoquercetin (50 µg/ml) and *H.cordata* extract (250 and 300 µg/ml) at 48 h. Furthermore, *H.cordata* extract, quercetin, isoquercetin and rutin induced a significant increase in leukemic cell lines death through apoptosis after incubation at 12 and 24 h and analyzed by flow cytometry. Our cytokines study found that *H.cordata* extract and flavonols especially quercetin and isoquercetin substantially reduced the hematopoietic (IL-2) and inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IFN-γ and TNF-α). In conclusion, our finding highlight the fact that *H.cordata* has anti-leukemic and anti-inflammatory activities but certainly much more molecular mechanism research is needed.

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

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

Academic Year : 2011

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมไปถึงการให้วิชาความรู้ มุมมอง คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงานวิจัย อีกทั้งกำลังใจยามที่พบกับอุปสรรค

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา บริมสัน และอาจารย์ ดร. มลธิรา พรมกัณฑ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์จิตวัต รุ่งเจิดฟ้า ผู้บังคับบัญชาที่ให้การสนับสนุนให้โอกาสในการลาศึกษาต่อเพื่อเพิ่มพูนวิชาความรู้ ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำงาน ขอขอบพระคุณ คุณชวดี นพรัตน์ หัวหน้างานที่สนับสนุนในการศึกษาเพิ่มเติม ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่านที่รับผิดชอบปฏิบัติหน้าที่แทนในช่วงการลาศึกษาต่อ และขอขอบคุณอาจารย์ นายแพทย์อนุชิต บูรณถาวรสม สำหรับคำแนะนำและคำปรึกษาแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 18 ครั้งที่ 2/2555 ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษา และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณศูนย์พัฒนาและวิจัยทางโลหิตวิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ และขอขอบพระคุณ ดร.สุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ในการศึกษาวิจัยและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณทุกกำลังใจจาก เพื่อน พี่ และน้อง ในคณะสหเวชศาสตร์ และเพื่อนๆ ต่างคณะในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และยังช่วยแสดงความเห็นจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตาที่เป็นความรักบริสุทธิ์เป็นแรงใจในยามเหนื่อยล้าเมื่อพบเจอปัญหาอุปสรรคต่างๆ ขอขอบคุณพี่สาวและน้องสาวที่น่ารักคอยเป็นกำลังใจอยู่เบื้องหลังอยู่เสมอ

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ฌ
สารบัญภาพ		ญ
บทที่		
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	ข้อจำกัดของการวิจัย	4
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว	5
	พลูคาว	34
	ฟลาโวนอยด์	36
	ฟลาโวนอล	41
	ไซโตไคน์	45
	การตายของเซลล์	49
	อะโพโทซิส (apoptosis)	51
3	วิธีดำเนินการวิจัย	54
	กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	54
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	56
	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	59
	วิธีการวิจัย	61

บทที่		หน้า

	การสกัดพลูคาว..	61
	การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์...	63
	การเตรียมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์..	64
	การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง...	65
	การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง	66
	การตรวจการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว………………..	69
	การตรวจวัดปริมาณการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว.........................	71
	การวิเคราะห์ข้อมูล..	75
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..	76
	ผลการวิเคราะห์..	76
	ผลการสกัดสารจากพลูคาว...	76
	ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว..	76
	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี XTT assay……………………...............	77
	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี microscopic analysis……………………	86
	ผลการตรวจการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว……………	96
	ผลการตรวจวัดปริมาณการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว....................	106
5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..	115
	สรุปและอภิปรายผลการวิจัย...	115
	ข้อเสนอแนะ..	119
รายการอ้างอิง	....	121
ภาคผนวก	....	135
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	....	144

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การแบ่งชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามเกณฑ์ WHO classification 2008.......... 25

2 การจำแนกชนิดย่อยของฟลาโวนอยด์... 37

3 อนุพันธ์ของ quercetin ที่เชื่อมต่อกับหมู่ต่างๆ....................................... 40

4 การเปรียบเทียบลักษณธการตายของเซลล์ในรูปแบบต่างๆ........................ 50

5 ขั้นตอนของวิธีการตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric assay.. 64

6 ค่า IC_{50} ของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอยด์ในเซลล์ชนิดต่างๆ............... 85

7 ปริมาณ TNF-α ที่ตรวจวัดจากการหลั่งของเซลล์ Jurkat ด้วยวิธี ELISA........ 108

8 ปริมาณ TNF-α ที่ตรวจวัดจากการหลั่งของเซลล์ U937 ด้วยวิธี ELISA.......... 109

9 ปริมาณ IL-6 ที่ตรวจวัดจากการหลั่งของเซลล์ U937 ด้วยวิธี ELISA............. 110

10 ปริมาณไซโตไคน์ที่ตรวจวัดจากการหลั่งของเซลล์ Jurkat ด้วยวิธี Bio-plex...... 112

11 ปริมาณไซโตไคน์ที่ตรวจวัดจากการหลั่งของเซลล์ U937 ด้วยวิธี Bio-plex....... 112

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL..	8
2	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML...	12
3	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL...	13
4	ลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML...	13
5	ลักษณะของต้นพลูคาว..	34
6	การเกิด apoptosis จากการชักนำของสารสกัดพลูคาว………………………….........	35
7	โครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์…………………..................................	36
8	โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์กลุ่มย่อยชนิดต่างๆ..	37
9	ฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆของสารฟลาโวนอยด์………..................................	38
10	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS และการส่งสัญญาณของเซลล์...................	39
11	ความสัมพันธ์ของ NF-KB ในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง…………………………....	40
12	ฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการทำงานของ NF-KB…………………..	40
13	การเกิด apoptosis จากการชักนำของสารสารฟลาโวนอยด์….........................	41
14	โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์กลุ่มย่อยชนิดต่างๆและจุดเชื่อมต่อกับหมู่ต่างๆ...	42
15	โครงสร้างของสารฟลาโวนอล quercetin, isoquercetin และrutin.....................	43
16	ฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆของสารฟลาโวนอล……………………………...........	44
17	ความสัมพันธ์ระหว่างสารฟลาโวนอลและไซโตไคน์..	48
18	การเกิด apoptosisของเซลล์เมื่อดูด้วยกล้อง time-lapse microscopy.............	51
19	ก.การเกิดอะโพโทซิสผ่านวิถีจากภายนอก………………………………………	53
	ข.การเกิดอะโพโทซิสผ่านวิถีจากภายใน…………………………………………	53
20	กลไกการเกิด apoptosis…..	53
21	พลูคาวสดที่ใช้ในการวิจัย...	54
22	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat....................................	55
23	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937…………………………..	55
24	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562…………………………..	56
25	ลักษณะของพลูคาวที่ผ่านการอบแห้งและเตรียมสกัด……………………………	61
26	สารสกัดพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 %…………………………..	62

ภาพที่ หน้า

27 ลักษณะของ Hemocytometer.. 66

28 ลักษณะตารางของ Hemocytometer.. 66

29 การเกิด reduction XTT เป็น formazan.................................... 68

30 ปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction reaction)ของวิธี XTT assay................ 68

31 ลักษณะผิวเซลล์เมื่อเกิด apoptosis.. 70

32 บริเวณของเซลล์ในแต่ละระยะเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์.............. 70

33 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95%.......................... 76

34 กราฟแสดงผลของสารสกัดพลูคาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat, K562 และ U937.. 77

35 กราฟแสดงผลของสารสกัดพลูคาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat.. 78

36 กราฟแสดงผลของสารสกัดพลูคาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ K562.. 78

37 กราฟแสดงผลของสารสกัดพลูคาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ U937.. 79

38 กราฟแสดงผลของสารฟลาโวนอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat.. 79

39 กราฟแสดงผลของสาร quercetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat.. 80

40 กราฟแสดงผลของสาร rutin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat.. 80

41 กราฟแสดงผลของสาร isoquercetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์Jurkat.. 81

42 กราฟแสดงผลของสารฟลาโวนอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ K562.. 81

43 กราฟแสดงผลของสาร quercetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ K562.. 82

44 กราฟแสดงผลของสาร rutin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ K562.. 82

ภาพที่ หน้า

45 กราฟแสดงผลของสาร isoquercetintin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ K562…………………………………………………………… 83

46 กราฟแสดงผลของสารฟลาโวนอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ U937……………………………………………………………………… 83

47 กราฟแสดงผลของสาร quercetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ U937…………………………………………………………………… 84

48 กราฟแสดงผลของสาร rutin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ U937………………………………………………………………………….... 84

49 กราฟแสดงผลของสาร isoquercetintin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ U937…………………………………………………………… 85

50 ลักษณะของเซลล์ Jurkat เมื่อได้รับสาร quercetin …………………………….. 87

51 ลักษณะของเซลล์ Jurkat เมื่อได้รับสาร isoquercetin และ rutin……………….. 88

52 ลักษณะของเซลล์ Jurkat เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจากพลูคาว…………………. 89

53 ลักษณะของเซลล์ K562 เมื่อได้รับสาร quercetin……………………………… 90

54 ลักษณะของเซลล์ K562 เมื่อได้รับสาร isoquercetin และ rutin……………….... 91

55 ลักษณะของเซลล์ K562 เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจากพลูคาว………………….... 92

56 ลักษณะของเซลล์ U937 เมื่อได้รับสาร quercetin……………………………… 93

57 ลักษณะของเซลล์ U937 เมื่อได้รับสาร isoquercetin และ rutin……………….... 94

58 ลักษณะของเซลล์ U937 เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจากพลูคาว………………….... 95

59 ผลการตรวจปริมาณการเกิดอะโพซิสเซลล์ Jurkat……………………………… 99

60 กราฟแสดงปริมาณของการเกิดอะโพซิสเซลล์ Jurkat…………………………… 99

61 ผลการตรวจปริมาณการเกิดอะโพซิสเซลล์ K562……………………………….. 102

62 กราฟแสดงปริมาณของการเกิดอะโพซิสเซลล์ K562…………………………….. 102

63 ผลการตรวจปริมาณการเกิดอะโพซิสเซลล์ U937……………………………….. 105

64 กราฟแสดงปริมาณของการเกิดอะโพซิสเซลล์ U937…………………………….. 105

65 กราฟแสดงปริมาณ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat ด้วยวิธี ELISA…… 108

66 กราฟแสดงปริมาณ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 ด้วยวิธี ELISA…….. 109

67 กราฟแสดงปริมาณ IL-6 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 ด้วยวิธี ELISA………… 110

ภาพที่		หน้า
68	กราฟแสดงปริมาณ IL-2 และ IL-8 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat ด้วยวิธี Bio-plex	113
69	กราฟแสดงปริมาณ IFN-γ และ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat ด้วยวิธี Bio-plex	113
70	กราฟแสดงปริมาณ IFN-γ และ IL-8 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 ด้วยวิธี Bio-plex	114
71	กราฟมาตรฐานของ rutin ในการทดสอบหาปริมาณสารฟลาวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากพลูคาว	138
72	กราฟมาตรฐานของ IL-6 ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA	139
73	กราฟมาตรฐานของ TNF-α ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA	139
74	กราฟมาตรฐานของ IL-2 ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	140
75	กราฟมาตรฐานของ IL-4 ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	140
76	กราฟมาตรฐานของ IL-6 ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	141
77	กราฟมาตรฐานของ IL-8 ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	141
78	กราฟมาตรฐานของ IL-10 ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	142
79	กราฟมาตรฐานของ GM-CSF ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	142
80	กราฟมาตรฐานของ INF-γ ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	143
81	กราฟมาตรฐานของ TNF-α ในการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex	143

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งเกิดจากเซลล์ผิดปกติเพียงหนึ่งเซลล์ (Single cell) ที่ภายในเซลล์เกิดมีความผิดปกติของโครโมโซมหรือสารพันธุกรรมทำให้เซลล์นั้นแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้จนเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ (Clone) ที่ผิดปกติตามมา [1] ส่วนโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) นั้นจัดเป็นมะเร็งระบบโลหิต (Hematologic malignancy) ที่มีความสำคัญเนื่องจากพบได้บ่อยและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของคนไทย เนื่องจากเป็นโรคที่พบได้ในประชากรทุกเพศ ทุกวัยเช่นเดียวกับในหลายประเทศทั่วโลก [2] มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีหลากหลายชนิดและการวินิจฉัยก็มีความซับซ้อน ดังนั้นวิธีการรักษาจึงแตกต่างกันไปตามชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นๆ [3] ในปัจจุบันการรักษาโดยทั่วไปจะใช้การรักษาโดยการใช้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) เป็นหลักเนื่องจากเป็นวิธีที่ได้ผลดีที่สุด นอกจากนี้อาจใช้วิธีรังสีรักษา (Radiotherapy) ร่วมกับการใช้ยาเคมีบำบัดเพื่อเสริมการรักษา หรืออาจใช้วิธีการปลูกถ่ายไขกระดูก (Bone marrow transplantation) หรือการใช้สเต็มเซลล์ (Stem cell therapy) เพื่อให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดมากขึ้นและป้องกันการกลับมาเป็นใหม่ (Relapse) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว การตอบสนองต่อการรักษา และอายุของผู้ป่วย [4-7] และสืบเนื่องจากปัจจุบันผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดซึ่งเป็นวิธีหลักนั้นต้องใช้ยานำเข้าจากต่างประเทศมีราคาแพง อาจทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาอย่างทั่วถึง ในวิธีการรักษาด้วยวิธีการต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นนั้นล้วนแต่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น ในการรักษาด้วยวิธีใช้ยาเคมีบำบัดอาจทำให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ภายหลังจากโรคสงบและหยุดการใช้ยา ส่วนวิธีรังสีรักษานั้นเนื่องจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะมีการแพร่กระจายทั่วไปในกระแสเลือดการใช้วิธีรังษีรักษาจึงไม่เหมาะสมนักเนื่องจากไม่สามารถฉายรังสีไปทั่วร่างกายได้ [6] ฉะนั้นปัจจุบันวิธีรังสีรักษานี้มักใช้กับมะเร็งเม็ดเลือดต่อมน้ำเหลือง (Lymphoma) ส่วนวิธีการปลูกถ่ายไขกระดูกหรือการรักษาโดยการใช้สเต็มเซลล์นั้นมีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากซับซ้อนต้องใช้ไขกระดูกที่เข้ากันได้กับผู้ป่วย มีโอกาสเกิดโรคแทรกซ้อนสูงและมี

ค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงมาก จึงทำให้การรักษาทางเลือกได้แก่การใช้สมุนไพรเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นพืชที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีผลข้างเคียงน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ยาเคมีบำบัด [7, 8] จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า พลูคาวซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นถิ่นที่มีมากในภาคเหนือของไทยมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของพลูคาวนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและวิธีการสกัด การสกัดพลูคาวด้วยน้ำจะได้สารจำพวก Volatile oil, Alkaloid บางชนิดและมีสารฟลาโวนอยด์ออกมามากซึ่งสารสกัดเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อ [9-11] ต้านการอักเสบ [12, 13] ต้านมะเร็งลำไส้และมะเร็งปอด [14, 15] Chang และคณะพบว่าสารสกัดพลูคาวด้วยน้ำมีฤทธิ์แสดงความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 5 ชนิดคือ U937, K562, Raji, P3HR1 และ L1210 [16] สิงห์คำ ธิมาและคณะพบว่าสารสกัดพลูคาวมีฤทธิ์แสดงความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด HL-60 และ U937 ในขณะที่ไม่พบความเป็นพิษกับเซลล์ปกติ (PBMCs)[17] นอกจากนี้บุษราวรรณ ศรีวรรธนะและคณะพบว่า สารสกัดพลูด้วยน้ำสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟซัยท์เพิ่มขึ้น (Lymphocyte proliferation)[18] และมีรายงานว่าเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น acetone methanol ethanol จะทำให้ได้ปริมาณสารที่สกัดสูงขึ้นโดยสารสกัดเหล่านี้จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายกว่าวิธีการสกัดด้วยน้ำ[19-20]

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาสารสกัดจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% ในการยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบโดยทำการศึกษาการเกิดการตายแบบอะโพโทซิสและการวัดปริมาณไซโตไคน์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารออกฤทธิ์เคอร์เซติน, ไอโซเคอร์เซติน และ รูติน ในการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat, K562 และ U937

2. เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารออกฤทธิ์เคอร์เซติน, ไอโซเคอร์เซติน และ รูติน ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะโพโทซิส (apoptosis)

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารออกฤทธิ์เคอร์เซติน, ไอโซเคอร์เซติน และ รูติน ในการต้านการอักเสบโดยการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารฟลาโวนอล 3 ชนิด คือ เคอร์เซติน ไอโซเคอร์เซติน และรูติน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงโดยประเมินจากการวัดปริมาณการลดลงของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงด้วยวิธี XTT assay และ วิธี microscopic analysis และฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยประเมินจากการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง และศึกษาการชักนำให้เกิดอะโพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยทำการตรวจสอบปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง 3 ชนิด คือ Jurkat, K562 และ U937 ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *In vitro* model

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ผลของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% ที่ได้จากการทำการวิจัยในครั้งนี้เป็นผลที่ได้จากพลูคาวที่ทำการเก็บ ณ ช่วงเวลาและสถานที่เดียวซึ่งอาจทำให้ปริมาณของสารสกัดที่ได้อาจแตกต่างกันไปจากการศึกษาก่อนหน้านี้

2. การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง (*In vitro* model) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง (*In vivo* model)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงบทบาทของพลูคาวในการยับยั้งและต้านการอักเสบของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

2. สามารถนำพลูคาวไปร่วมใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว

3. องค์ความรู้ใหม่เพื่อการพัฒนายาในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรไทยที่สามารถนำไปต่อยอดการวิจัยในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [21, 22]

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) เป็นโรคมะเร็งของระบบโลหิตที่เกิดขึ้นจากความผิดปกติของการสร้างและกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดเลือดซึ่งจัดเป็นกลุ่มอาการที่มีการสร้างหรือเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อน (blast cells) หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวแก่ (mature leukocytes) มากผิดปกติ โดยสามารถเกิดได้ทั้งในไขกระดูก (bone marrow) และในกระแสโลหิต (blood circulation)

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว [21-24]

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งได้หลายแบบ กล่าวคือ

1. แบ่งตามประวัติของผู้ป่วยสามารถแบ่งได้เป็น

1.1 De novo leukemia คือเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่พบขึ้นใหม่ไม่ได้เกิดจากการรักษาหรือเกิดขึ้นตามหลังโรคหรือภาวะของโรคใดโรคหนึ่ง

1.2 Secondary leukemia คือเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เกิดขึ้นตามหลังการรักษาโรคในอดีตหรือเกิดตามหลังโรคหรือภาวะของโรคใดโรคหนึ่งอย่างชัดเจน เช่นตามหลังการได้รับการฉายรังสีหรือได้รับยาเคมีบำบัดจากการรักษาโรคอื่นๆ

2. แบ่งตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการทางคลินิกและการดำเนินของโรคสามารถแบ่งได้เป็น

2.1 มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (Acute leukemia) โดยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้อาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและค่อนข้างรุนแรง

2.2 มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (Chronic leukemia) โดยจะมีอาการแบบค่อยเป็นค่อยไปไม่รุนแรงมากนัก ผู้ป่วยบางรายอาจไม่มีอาการทางคลินิกใดๆเลยเมื่อแรกเริ่มวินิจฉัย

3. แบ่งโดยอาศัยหลักเกณฑ์ของสายการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell lineage) หรือตามเซลล์ต้นตอ (Cell of origin) ซึ่งจะทำให้สามารถแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาวออกได้เป็นสองกลุ่มคือ

3.1 Myelocytic leukemia คือ มีการพบเซลล์ที่ผิดปกติในสายมัยอีลอยด์ (myeloid lineage) ได้แก่ นิวโทรฟิล (neutrophils), อีโอซิโนฟิล (eosinophils) และเบโซฟิล (basophils) เพิ่มมากขึ้นในกระแสเลือดหรือในไขกระดูก

3.2 Lymphocytic leukemia คือ มีการพบที่เซลล์ผิดปกติในสายลิมฟอยด์ (lymphoid lineage) ได้แก่ ลิมโฟไซท์ (lymphocytes) และพลาสมาเซลล์ (plasma cells) เป็นจำนวนมากในกระแสเลือดหรือในไขกระดูก

ในปัจจุบันถึงแม้จะมีเกณฑ์การแบ่งตาม WHO classification 2008 (ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป) แต่พบว่าในทางคลินิกยังคงนิยมแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยอาศัยทั้งหลักเกณฑ์ตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการทางคลินิกและการดำเนินของโรคควบคู่กับสายการเจริญเติบโตของเซลล์(cell lineage) มาจัดจำแนกประเภทของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

- Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
- Acute myeloblastic leukemia (AML)
- Chronic lymphocytic leukemia (CLL)
- Chronic myelocytic leukemia (CML)

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) [24, 25]

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันที่มีต้นกำเนิดมาจากสายลิมฟอยด์ (Lymphoid precursor ของ B หรือ T lymphocyte) ซึ่งเซลล์เหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน oncogene หรือ tumor suppressor gene ทำ ให้มีการเจริญเติบโตที่

ผิดปกติและไปเบียดเซลล์ปกติอื่นๆในไขกระดูก หรือแทรกเข้าไปในอวัยวะอื่นซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพและอาการต่างๆ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้มักพบในเด็กอายุระหว่าง 2-10 ปี สำหรับการแบ่งชนิดย่อยของ ALL (subclass) สามารถจัดแบ่งได้ 2 วิธี ดังนี้คือ

1) แบ่งตามข้อตกลงของนักโลหิตวิทยาจากฝรั่งเศส อเมริกา และอังกฤษ (French-American-British;FAB classification) ซึ่งจะจัดแบ่งตามลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งชนิด lymphoblast ที่ตรวจพบในไขกระดูกหรือในกระแสเลือดจากแผ่นสเมียร์เลือด[25] ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดคือ

L1 จะพบ lymphoblast มีขนาดเซลล์เล็กเท่าๆกันเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์น้อยกว่าหรือเท่ากับ mature lymphocyte ปกติ นิวเคลียสค่อนข้างกลมแต่เห็น nucleoli ได้ไม่ชัด cytoplasm มีปริมาณน้อยและย้อมติดสี basophilic น้อยกว่า ALL ชนิดอื่น ALL-L1 นี้จะพบในเด็กมากกว่าในผู้ใหญ่ และพบมากที่สุดประมาณร้อยละ 71 ของ ALL ทั้งหมด

L2 จะพบ lymphoblast ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น การกระจายตัวของขนาดของเซลล์จะไม่เท่ากันทุกเซลล์ เซลล์ที่มีขนาดใหญ่อาจพบเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ใหญ่เป็น 2 เท่าของ mature lymphocyte ปกติ เห็น nucleoli ได้ชัดเจน(1-2 อัน)แต่นิวเคลียสมักไม่กลม cytoplasm มีปริมาณมากและย้อมติดสี basophilic มาก ALL-L2 นี้พบมากรองลงมาคือประมาณร้อยละ 27 ของ ALL ทั้งหมดและมักพบในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก

L3 จะพบ lymphoblast ที่มีขนาดเซลล์ค่อนข้างใหญ่ มักพบ vacuole ทั้งใน cytoplasm และนิวเคลียส สามารถพบ nucleoli ได้ชัดเจน (3-5 อัน) มีปริมาณ cytoplasm มากและย้อมติดสี basophilic มาก และเนื่องมาจากลักษณะของเซลล์ใน subclass นี้จะมีลักษณะที่คล้ายกับเซลล์ที่พบในผู้ป่วย Burkitt’s lymphoma จึงมักเรียก ALL ชนิดนี้ว่า Burkitt’s type

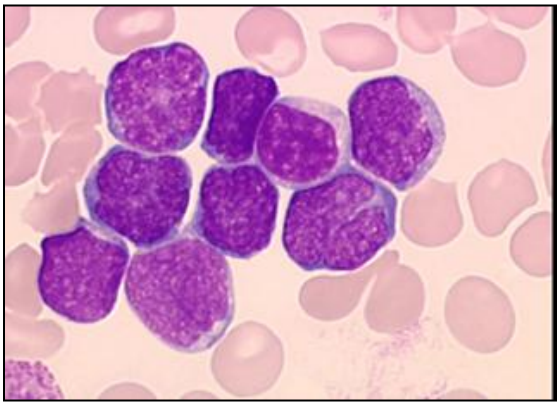
2) แบ่งชนิดตามลักษณะจำเพาะที่พบบนผิวเซลล์ (membrane surface marker) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิดคือ

T-cell ALL พบลักษณะ membrane surface marker คือ E-rosette โดยมีอุบัติการณ์ของ T-cell ALL นี้ประมาณร้อยละ12-30 ของผู้ป่วย ALL ทั้งหมดและมักพบความสัมพันธ์กับ FAB classification คือมักจะพบรูปร่างแบบ L1 และ L2

B-cell ALL พบลักษณะ membrane surface marker คือ surface immunoglobulin (SIg), complement receptor (C'R), Fc receptor (FcR) และ EAC-rosette โดยพบอุบัติการณ์ของ B-cell ALL ประมาณร้อยละ12-30 ของผู้ป่วย ALL ทั้งหมด และมักพบความสัมพันธ์กับ FAB classification คือมักจะพบรูปร่างแบบ L3 เป็นส่วนใหญ่

Null-cell ALL เป็นเซลล์ที่ไม่พบการแสดงออกของ membrane surface marker ของทั้ง T-cell และ B-cell แต่เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจาก lymphoid stem cell โดยมีอุบัติการณ์ของ Null-cell ALL สูงถึงร้อยละประมาณ 70-80

Mix T-cell and B-cell ALL คือเป็นเซลล์ที่พบการแสดงออกของ membrane surface marker ของทั้ง T-cell และ B-cell อยู่ปะปนกัน พบมีอุบัติการณ์ได้น้อยมาก [26]



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL [27]

Acute myeloblastic leukemia (AML) [24, 28]

Acute myeloblastic leukemia (AML) เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันที่มีต้นกำเนิดมาจาก Hematopoietic stem and progenitor cells ทำให้เซลล์ตัวอ่อนในสายมัยอีลอยด์ (myeloid lineage) ไม่สามารถเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ตัวแก่แต่กลับมีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นจน

ทำให้ในไขกระดูกมีจำนวนของเซลล์ตัวอ่อนเพิ่มมากขึ้นจนไปรบกวนการสร้างเซลล์ปกตินอกจากนี้ ตัวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเหล่านี้อาจแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆของร่างกายได้ความผิดปกติที่เริ่มต้นขึ้นจากเซลล์ที่ผิดปกติเพียงเซลล์เดียว (Single cell) นี้จัดเป็น clonal malignant disease ซึ่งอาจเกิดขึ้นที่ระดับ multipotent progenitor cells (common myeloid progenitors) จึงทำให้เกิดความผิดปกติได้ในทั้งสายของเม็ดเลือดขาวในสายมัยอีลอยด์ ลิมฟอยด์ เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด และเนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดของ AML มีคุณสมบัติที่จะปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายประเภทจึงทำให้ผู้ป่วยในแต่ละรายจะตรวจพบความผิดปกติทั้งในไขกระดูกและในกระแสเลือดได้แตกต่างกัน เมื่อใช้เกณฑ์การแบ่งชนิดของ AML ตาม FAB classification [25]ซึ่งอาศัยการแบ่งชนิดโดยอาศัยรูปร่าง (cell morphology) ลักษณะการติดสีเมื่อย้อมสีพิเศษ (Cytochemistry staining) จะสามารถแบ่งชนิดของ AML ได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้คือ

Acute myeloblastic leukemia without maturation (M0) ผู้ป่วยซึ่งจัดว่าเป็น AML โดยจะพบว่าในไขกระดูกของผู้ป่วยเหล่านี้มี blast cells มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่ง blast cells เหล่านี้ เมื่อทดสอบทาง cytochemistry พบว่าจะมีการติดสีที่ให้ผลบวกกับ myeloperoxidase (MPO) หรือ Sudan black B น้อยกว่าร้อยละ 3 สำหรับอุบัติการณ์ของของ M0 พบว่ามีประมาณร้อยละ 3-5 ของกลุ่ม AML ทั้งหมด

Acute myeloblastic leukemia with minimal maturation (M1) เป็นผู้ป่วยซึ่งจัด AML โดยพบว่าในไขกระดูกของผู้ป่วยเหล่านี้มี blast cells มากกว่าร้อยละ 90 และมี promyelocyte น้อยกว่าร้อยละ 10 ซึ่ง blast cells เหล่านี้ถึงแม้จะมี granule น้อยแต่พบว่าเมื่อทดสอบโดยการย้อมพิเศษทาง cytochemistry พบว่าจะมีการติดสีที่ให้ผลบวกกับ myeloperoxidase (MPO) หรือ Sudan black B มากกว่าร้อยละ 3 สำหรับอุบัติการณ์ของของ M1 พบว่ามีประมาณร้อยละ 15-20 ของกลุ่ม AML ทั้งหมด

Acute myeloblastic leukemia with maturation (M2) เป็นผู้ป่วยซึ่งจัด AML โดยพบว่าในไขกระดูกของผู้ป่วยเหล่านี้มี myeloblast ประมาณร้อยละ 30-89 และมี promyelocyte อยู่มากกว่าร้อยละ 10 และมี monocytic component น้อยกว่าร้อยละ 20 ของ nonerythroid cells

ทั้งหมด M2 เป็นกลุ่มเซลล์ที่มี primary (azurophilic) granule เป็นจำนวนมากดังนั้นจึงให้ผลบวกกับ myeloperoxidase (MPO), Sudan black B และ Specific esterase อุบัติการณ์ของของ M2 พบว่ามีประมาณร้อยละ 25-30 ของกลุ่ม AML ทั้งหมด

Acute promyelocytic leukemia (APL;M3) เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในไขกระดูกจะเป็น immature myeloid cell ซึ่งมักพบเป็น abnormal hypergranular promyelocyte โดยมักจะพบ Auer rod ประสานกันเป็นร่างแหที่เรียกว่า faggots และเมื่ออาศัยการมี granule ใน cytoplasm ทำให้แบ่ง M3 ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม hypergranular (M3) ซึ่งจะเป็น promyelocyte ที่มี granule มากและอีกกลุ่มคือ M3 variant (M3V) เป็น promyelocyte ที่มี granule น้อยและลักษณะของ granule จะมีขนาดเล็กละเอียดกระจายใน cytoplasm (dust-like) สำหรับ nucleus ของ M3 ทั้งสองกลุ่มนี้มีรูปร่างคล้ายกับ nucleus ของ monoblast คือมีลักษณะคล้ายรูปไตหรือแบ่งออกเป็น 2 lobes ซึ่งอาจทำให้วินิจฉัยผิดพลาดเป็น M5 จึงต้องอาศัยเทคนิคการย้อมพิเศษทาง cytochemistry โดย M3 จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย myeloperoxidase, Sudan black B และ Specific esterase สำหรับอุบัติการณ์ของของ M3 พบว่ามีประมาณร้อยละ 10 ของกลุ่ม AML ทั้งหมด

Acute myelomonoblastic leukemia (AMMol;M4) เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในไขกระดูกจะเป็น granulocytic components (myeloblast ถึง polymorphonuclear cells) ประมาณร้อยละ 30-80 และพบ monocytic component (monoblast, promonocyte, monocyte) มากกว่าร้อยละ 20 promonocyte ใน M4 อาจมี granules จำนวนมากอาจทำให้วินิจฉัยผิดพลาดเป็น promyelocyte จึงต้องอาศัยเทคนิคการย้อมพิเศษทาง cytochemistry โดย M4 จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Dual esterase stain โดย myeloblast จะให้ผลบวกกับ Specific esterase และ monoblast จะให้ผลบวกกับ Nonspecific esterase ซึ่งผลบวกของ nonspecific esterase ใน monocytic cellsนี้จะสามารถถูก inhibit โดย NaF สำหรับอุบัติการณ์ของของ M4 พบว่ามีประมาณร้อยละ 20-30 ของกลุ่ม AML ทั้งหมด นอกจากบางครั้งนี้ยังมี M4 มีลักษณะเป็น Acute myelomonoblastic leukemia with eosinophilia (M4eo) หรือ Acute myelomonoblastic leukemia with basophilic maturation (M4baso) โดยพบว่า M4eo จะมีลักษณะเหมือน M4 ที่

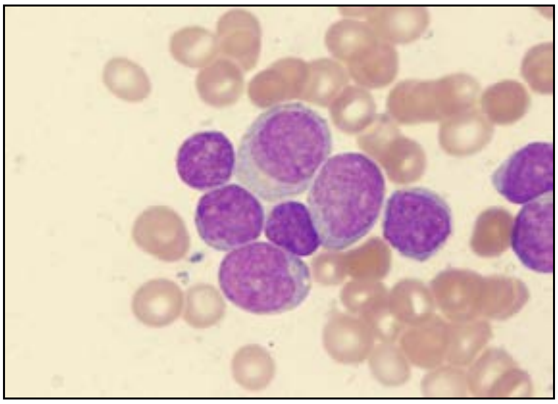
กล่าวมาข้างต้นแล้วยังพบว่ามีภาวะ Eosinophlilia ร่วมด้วย (โดยมีจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 5) ส่วน M4baso นั้นรูปร่างของเซลล์เช่นเดียวกับ M4 ที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังพบว่ามี basophilic maturation ร่วมด้วย

Acute monoblastic leukemia (AMoL;M5) เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในไขกระดูกของผู้ป่วยจะเป็น blast cells มากกว่าร้อยละ 30 และมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80 เป็นเซลล์ monocytic components ในขณะที่พบ granulocytic components น้อยกว่าร้อยละ 20 monoblast ของ M5 มักเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มี cytoplasm มาก มี vacuoles และมี azurophilic granules ละเอียดกระจายอยู่ทั่วไป ใน cytoplasm การทดสอบโดยการย้อมพิเศษทาง cytochemistry จะให้ผลบวกกับ Nonspecific esterase (NSE) เมื่ออาศัยการเกิด differentiation ของ monocytic cells ทำให้สามารถแบ่ง M5 ออกเป็น 2 ประเภทคือ M5a และ M5b กล่าวคือ acute monoblastic leukemia without maturation (M5a) นั้นจะพบ monoblast มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80 ซึ่งจะพบการ differentiation ไปเป็นเซลล์ promonocyte และ monocyte ได้น้อยมาก ส่วน M5b หรือ acute monoblastic leukemia with maturation จะพบ monoblast ได้น้อยกว่าร้อยละ 80 และมีการ differentiation ไปเป็น promonocyte และ monocyte มากกว่า M5a สำหรับอุบัติการณ์ของ M5 พบมีประมาณร้อยละ 10 ของ AML ทั้งหมด โดยพบเป็น M5a ประมาณร้อยละ 4 และพบ M5b ประมาณร้อยละ 6

Acute erythroblastic leukemia (M6) เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในไขกระดูกของผู้ป่วยจะเป็น Megaloblastic erythriod precursors มากกว่าร้อยละ 50 โดยมีลักษณะของ dyserythropoiesis นอกจากนี้ยังพบว่ามากกว่าร้อยละ 30 ของ nonerythriod cells เป็น myeloblast cellsสำหรับการทดสอบด้วยการย้อมพิเศษทาง cytochemistry M6 จะให้ผลบวกกับ Periodic acid schiff's (PAS) stain อุบัติการณ์ของ M6 พบมีประมาณร้อยละ 3-5 ของ AML ทั้งหมด

Acute megakaryoblastic leukemia (AMegL;M7) ในไขกระดูกของผู้ป่วย M7 จะพบ leukemic cells มีลักษณะเป็น megakaryoblast ประมาณร้อยละ 30 ซึ่งจะพบมีลักษณะเป็น polymorphic เห็น nucleoli ได้ชัดเจน cytoplasm ย้อมติดสีน้ำเงินเข้มคล้ายกับ lymphoblast

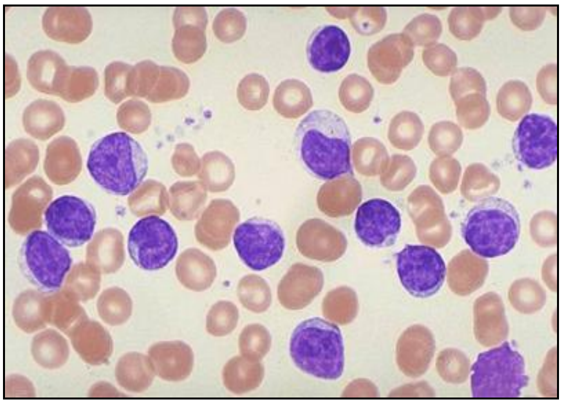
ทำให้การวินิจฉัย M7 ค่อนข้างยาก ส่วนการทดสอบโดยการย้อมพิเศษทาง cytochemistry พบว่า M7 นั้นมักให้ผลลบกับ Myeloperoxidase, Sudan black B และ Alphanaphthyl butyrate esterase ฉะนั้นการวินิจฉัย M7 จำเป็นต้องอาศัยการตรวจทาง immunological markers คือ ตรวจพบ CD41 และ CD42b สำหรับอุบัติการณ์ของ M7 พบน้อยมากคือมีประมาณร้อยละ 1 ของ AML ทั้งหมด



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML [29]

Chronic lymphoblastic leukemia (CLL) [7, 24]

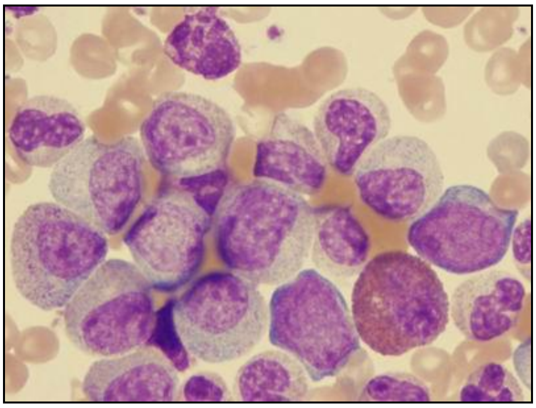
Chronic lymphoblastic leukemia (CLL) เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเรื้อรังที่มีลักษณะที่สำคัญคือมีการสะสมของ incompetent long-lived lymphocyte ในร่ายกายซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากความผิดปกติของกระบวนการอะโพโทซิส (apoptosis) มากกว่าการเพิ่มจำนวนจากการแบ่งตัวมากผิดปกติ CLL เป็นโรคที่ไม่พบในคนไทยแต่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่พบได้บ่อยที่สุดในชาวตะวันตก และมักพบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง ในอัตราส่วน 2:1 ในอดีตจะแบ่ง CLL ออกเป็น 2 กลุ่มคือ B-CLL และ T-CLL แต่ปัจจุบันได้ยกเลิกชนิด T-CLL โดยเรียกเป็น T-prolymphocytic (T-PLL) แทน สำหรับเกณฑ์การวินิจฉัย CLL คือในไขกระดูกต้องพบเซลล์ Lymphocyte อย่างน้อยร้อยละ 30 โดยในไขกระดูกอาจพบมีลักษณะเป็น normocellular หรือ hypercellular marrow ส่วนในกระแสเลือดจะพบ lymphocyte ขนาดเล็กถึงปานกลาง nucleus เต็มเซลล์ ไม่เห็น nucleoli และมักจะพบเศษชิ้นส่วนของเซลล์ที่แตกเป็น smudge cell



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL[30]

Chronic myelocytic leukemia (CML)[24, 31]

Chronic myelocytic leukemia (CML) จัดเป็นโรคในกลุ่ม myeloproliferative disorders ซึ่งเกิดจาก neoplastic transformation ของ pluripotent stem cells ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดชนิดต่างๆในไขกระดูกและในกระแสเลือด โดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวในสายมัยอีลอยด์ ประมาณร้อยละ 85-90 ของผู้ป่วย CML จะตรวจพบมี Philadelphia (Ph') chromosome คือ t(9;22)(q34;q11) ในขณะที่ร้อยละ 5 ของผู้ป่วยของผู้ป่วยมี complex translocation โดยที่มักจะมี chromosome ที่เกี่ยงข้องด้วยมากกว่า 3 คู่แต่มักจะมีคู่ที่ 9 และ 22 ร่วมด้วยเสมอ ซึ่งจะเรียกว่า variant Ph translocation และอีกประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยจะตรวจไม่พบ Philadelphia chromosome ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้จะตรวจพบ monocyte สูงกว่าและมี basophils, thrombocytosis และ splenomegaly น้อยกว่าผู้ป่วยในกลุ่ม Ph' positive CML



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML[32]

การแบ่งประเภทของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามองค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2008 (WHO classification 2008) [33, 34]

การแบ่งประเภทของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามองค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2008 (WHO classification 2008) นั้นได้แบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามพยาธิกำเนิด ลักษณะเฉพาะทางคลินิกที่สัมพันธ์กันกับเซลล์ และใช้ความผิดปกติของโครโมโซมเป็นเกณฑ์สำคัญ การวินิจฉัยโรค AML ตามเกณฑ์ของ WHO classification 2008 นั้นระบุว่าต้องมีจำนวนของ nucleated cells ในไขกระดูกผู้ป่วยอย่างน้อยร้อยละ 20 เป็น blast cells (นับรวม promyelocytes ใน APL ด้วย) ในผู้ป่วยที่ไม่พบ specific chromosome abnormalities จะต้องอาศัยประวัติการได้รับสารเคมีรวมถึงยาเคมีบำบัด และการเกิด myelodysplasia มาร่วมพิจารณาด้วยเพราะมีการพยากรณ์โรคที่เลวกว่ากลุ่ม de novo AML สำหรับกลุ่ม AML ตามเกณฑ์การแบ่งแบบ FAB classification นั้นใน M0-M7 ยกเว้น M3 จัดอยู่ในกลุ่ม AML-not otherwise specified แต่ถ้ามีความผิดปกติของโครโมโซมจะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities การแบ่งชนิดของ ALL ตามเกณฑ์ของ WHO classification 2008 นั้นได้จัด ALL ให้อยู่ในกลุ่ม precursor lymphoid neoplasms ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักๆ คือ B lymphoblastic leukemia /lymphoma และ T lymphoblastic leukemia /lymphoma สำหรับในกลุ่มที่ไม่มี lineage ชัดเจน หรือมีหลาย lineage นั้น ได้จัดอยู่ในกลุ่ม mixed phenotype acute leukemia (MPAL) สำหรับการจัดกลุ่มของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังได้จัดให้ CML อยู่ในกลุ่มของ MPN และ MDS/MPN ส่วนใน CLL นั้นได้จัดให้อยู่ใน Mature B-cell neoplasms ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2008 (WHO classification 2008) [33, 34]

Myeloproliferative neoplasms (MPN)
Chronic myelogenous leukemia, *BCR-ABL1*-positive
Chronic neutrophilic leukemia
Polycythemia vera
Primary myelofibrosis
Essential thrombocythemia
Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified
Mastocytosis
Cutaneous mastocytosis
Systemic mastocytosis
Mast cell leukemia
Mast cell sarcoma
Extracutaneous mastocytoma
Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
Myeloid and lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* or *FGFR1*
Myeloid and lymphoid neoplasms with *PDGFRA* rearrangement
Myeloid neoplasms with *PDGFRB* rearrangement
Myeloid and lymphoid neoplasms with FGFR1 abnormalities

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)
Chronic myelomonocytic leukemia
Atypical chronic myeloid leukemia, *BCR-ABL1*-negative
Juvenile myelomonocytic leukemia
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
Provision entity: Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis
Myelodysplastic syndromes(MDS)
Refractory cytopenia with unlineage dysplasia
Refractory anemia
Refractory neutropenia
Refractory thrombocytopenia
Refractory anemia with ring sideroblasts
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia
Refractory anemia with excess blasts
Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q)
Myelodysplastic syndrome, unclassifiable
Childhood myelodysplastic syndrome
Provision entity : Refractory cytopenia of childhood

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities

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

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

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

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

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

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

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

Provision entity: AML with mutated NPM1

Provision entity: AML with mutated CEBPA

Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

Acute myeloid leukemia, not otherwise specified

AML with minimal differentiation

AML without maturation

AML with maturation

Acute myelomonocytic leukemia

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms (continued)
Acute myeloid leukemia, not otherwise specified
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Acute erythroid leukemia
Pure erythroid leukemia
Erythroleukemia, erythroid/myeloid
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis
Myeloid leukemia associated with Down syndrome
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Acute leukemias of ambiguous lineage
Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Acute leukemias of ambiguous lineage (continued)

Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS

Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS

Provision entity : Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Precursor lymphoid neoplasms

B lymphoblastic leukemia/lymphoma

B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

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

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

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

(ETV6-RUNX1)

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy (hypodiploid ALL)

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

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

T lymphoblastic leukemia/lymphoma

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic B-cell marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable
Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma
Hairy cell leukemia-Variant
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Heavy chain diseases
Alpha heavy chain disease
Gamma heavy chain disease
Mu heavy chain disease
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue
Nodal marginal zone lymphoma

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Mature B-cell neoplasms (continued)
Pediatric nodal marginal zone lymphoma
Follicular lymphoma
Pediatric follicular lymphoma
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg-type
EBV positive DLBCL of the elderly
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
Primary effusion lymphoma

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Mature B-cell neoplasms (continued)
Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma
Mature T-cell and NK-cell neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
Chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV positive T-cell lymphoproliferative disease of childhood
Hydroa vacciniforme-like lymphoma
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาว [1, 35, 36]

สาเหตุที่แท้จริงของมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากการสังเกต ทดลอง และหาความสัมพันธ์ของสาเหตุต่างๆพบปัจจัยเสี่ยงหลายอย่างที่อาจทำให้มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นได้ โดยสรุปได้ดังต่อไปนี้ คือ

1. เชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Human-T-lymphocyte leukemia virus (HTLV-1)ในโรค Adult T cell leukemia (ATLL) หรือ เชื้อ Epstein-Barr Virus (EBV) ในโรคมะเร็งชนิด Burkitt lymphoma/leukemia โดยอาจเกิดจากการที่ยีนของ ไวรัส HTLV ได้สอดแทรกเข้าไประหว่างยีนต่างๆ ของเซลล์เม็ดเลือดจึงทำให้ข้อมูลทางพันธุกรรมผิดไปจากปกติจนเป็นเหตุให้สูญเสียกลไกในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (cell differentiation) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell maturation) ตามวัฏจักรเซลล์ที่ควรจะเป็น โดยมีหลักฐานที่สนับสนุนเหตุผลข้อนี้คือการที่พบอุบัติการณ์ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (HIV) ร่วมกับการป่วยเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น [37]

2. สารรังสี (Ionizing radiation) มีบทบาททำให้สารพันธุกรรมคือ DNA เกิดการแตกหัก ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดมีข้อมูลผิดพลาดในระหว่างมีการซ่อมแซมสาย DNA โดยมีหลักฐานที่ยืนยันว่าสารรังสีเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวคือ การที่ประชากรในเมืองฮิโรชิมาและนางาซากิที่รอดชีวิตจากการทิ้งระเบิดปรมาณู (atomic bomb) มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรค AML มากกว่าคนปกติถึง 30 เท่า นอกจากนี้ประชากรที่ได้รับสารกัมมันตภาพรังสีจากการรั่วซึมของโรงไฟฟ้านิวเคลียร์ หรือผู้ป่วยที่ได้รับรังสีรักษาและสารกัมมันตรังสีในการรักษาโรคต่างๆที่ไม่ใช่มะเร็งเช่น ankylosing spondylitis ก็พบมีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน [38]

3. สารก่อมะเร็ง (Chemical carcinogens) คือสารเคมีบางชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนและข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่นผู้ป่วยที่ได้รับสาร benzene เป็นระยะเวลานานพบมีอุบัติการณ์ของการเกิดโรค AML มากถึง 10 เท่าเมื่อเทียบกับประชากรทั่วไป นอกจากนี้ผู้ที่สัมผัสกับน้ำมันถ่านหิน (coal-tar), xylene, ethylene oxide, ยาฆ่าแมลงและยาย้อมผมก็พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้นด้วย [39]

4. การได้รับยาเคมีบำบัด[5] การรักษาที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำเกิดโรคมะเร็งตามหลังการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดจะมีผลกระทบกับการแบ่งตัวของเซลล์โดยจัดเป็น secondary leukemia ประเภทหนึ่งมักเรียกว่า Therapy-related myeloid neoplasms สำหรับยาเคมีบำบัดที่พบเป็นสาเหตุของการเกิด AML ได้แก่กลุ่ม alkylating agent เช่น melphalan, chlorambucin, cyclophosphamide และ cisplasin โดยการเกิด AML จากยากลุ่มนี้มักใช้เวลานานโดยเฉลี่ยประมาณ 4-7 ปี และกลุ่ม Topoisomerase II inhibitor เช่น etoposide, mitoxantrone และ doxorubicin ซึ่งการเกิด AML จากยากลุ่มนี้มักใช้เวลาไม่นานโดยเฉลี่ยประมาณ 6 เดือน ถึง 3 ปี

5. ความผิดปกติในการสร้างและการทำงานของโครโมโซม (Chromosomal aberration)[40] การเปลี่ยนแปลงของ cytogenetics มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดเป็นอย่างมาก เช่น ในผู้ป่วย CML จะพบความผิดปกติของโครโมโซมที่เรียกว่า Philadelphia chromosome (Ph') จากไขกระดูกได้ถึงร้อยละ 90-95 ซึ่ง Ph' chromosome นี้เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีน (translocation) ของแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 22 ไปต่อกับแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 9 [t(9;22)(q34;q11)] เป็นผลให้ c-abl proto-oncogene ซึ่งปกติอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 9 ไปอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 22 และเป็นตำแหน่งที่ใกล้กับ breakpoint cluster region (bcr) จนทำให้ยีนไปต่อกันเกิดเป็นยีนลูกผสม (hybrid bcr-abl oncogene) และเมื่อยีน hybrid bcr-abl นี้ถูก transcription เป็น bcr-abl 8.5Kb mRNA และสุดท้ายจะถูก transltion ไปเป็น chimeric protein เกิดเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจากปกติ 145 kD เป็น 210 kD (p210) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญคือทำให้มี tyrosine kinase activity เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ signal transduction pathway ต่างๆได้แก่ RAS, adhesion และ apoptosis pathway เป็นผลให้สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาในขณะที่การเจริญไปเป็นตัวแก่กลับลดลง ส่วนความผิดปกติของโครโมโซมอื่นๆและสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยคือ

-t(8;21)(q22;q22) ซึ่งพบได้บ่อยในผู้ป่วย AML ชนิด de novo โดยพบเป็นร้อยละ 10 ของความผิดปกติทั้งหมด มักพบในผู้ป่วย M2 หรืออาจพบในผู้ป่วย M1และ M4 ที่มีลักษณะ

รูปร่างของเซลล์ (morphology) ที่มี Auer rod เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปผู้ป่วยที่มี t(8;21) พบมีการพยากรณ์โรคดี

-t(15;17)(q22;q12) เป็นความผิดปกติที่ค่อนข้างจำเพาะกับโรค acute promyelocytic leukemia (APL) ซึ่งพบได้ทั้ง M3 และ M3V โดยทั่วไปผู้ป่วยที่มี t(15;17) จะมีการพยากรณ์โรคไม่ดีและไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษาด้วย all-trans retinoic acid (ATRA)

-inv(16)(p13;q22) ซึ่งพบได้บ่อยในผู้ป่วย M4 ชนิด M4eo ซึ่งผู้ป่วยในกลุ่มที่มี inv(16) นี้มีการพยากรณ์โรคที่ดี แต่ถ้าเป็นผู้ป่วยในกลุ่มที่มี inv(16) และมีจำนวนของ blast cells ในกระแสเลือดสูงในตอนเริ่มวินิจฉัยจะพบมีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคในสมองสูง

- ความผิดปกติของโครโมโซม 11q มักพบในผู้ป่วย M5 ซึ่งอาจพบเป็น translocation หรือ deletion และมักเกิดขึ้นในตำแหน่ง q23-24 หรือ q13-14 ผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในกลุ่มนี้มักพบในกลุ่มอายุน้อยที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดสูงและมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

- Monosomy 7 พบได้ประมาณร้อยละ 4 ของผู้ป่วย M1ผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในกลุ่มนี้มักมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและมักไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด

อาการของมะเร็งเม็ดเลือดขาว [28, 35, 36]

อาการของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวไปอยู่ โดยผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมักมีอาการแสดงอย่างรวดเร็วอาการที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยโดยทั่วไปมีอาการของไขกระดูกไม่ทำงาน (Bone marrow failure) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ไขกระดูกเกิดความล้มเหลวในกระบวนการสร้างเม็ดเลือด ทำให้เม็ดเลือดขาวที่ผลิตมานั้นไม่สามารถเจริญแก่ตัวได้จึงส่งผลให้เม็ดเลือดขาวปกติมีจำนวนน้อยจึงทำให้ติดเชื้อได้ง่ายและกลุ่มเซลล์มะเร็งที่มีจำนวนมากนี้อาจส่งผลกระทบต่อการผลิตเม็ดเลือดประเภทอื่นๆคือเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดจึงทำให้มีอาการอื่นๆได้แก่ ซีด อ่อนเพลีย รู้สึกอ่อนแรง เหนื่อยง่าย น้ำหนักลด ปวดหัว คลื่นไส้ หน้ามืดเป็นลมง่าย รู้สึกหัวใจเต้นเร็วหรือใจสั่น และจากปริมาณของเกล็ดเลือดที่ลดลงจึงทำให้ผู้ป่วยมีอาการเลือดออกผิดปกติ ในผู้ที่มีระดับเกล็ดเลือดลดลงต่ำกว่า

$20x10^9$/ลิตร อาจทำให้มีเลือดออกในเนื้อสมอง ทำให้เกิดอาการปวดศีรษะอย่างรุนแรง ชัก ซึมลง และหมดสติ หรือเกิดเลือดออกในทางเดินอาหารทำให้มีอาการอาเจียนเป็นเลือดหรือถ่ายเป็นเลือด นอกจากนี้ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันบางรายอาจจะมีอาการจากการที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจายแทรกไปยังอวัยวะต่างๆ (Leukemic infiltration) เช่น ไปแทรกที่เหงือกทำให้เหงือกบวม (Gum hypertrophy) โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์มะเร็งชนิด monoblast ใน M4 และ M5 ไปแทรกที่ผิวหนังทำให้เกิดเป็นตุ่มหรือเป็นก้อน (Leukemia cutis) ไปที่เยื่อหุ้มสมองทำให้เกิดเยื่อหุ้มสองอักเสบ (Leukemic meningitis) หรืออาจไปแทรกที่เส้นประสาททำให้มี cranial nerve palsy ได้ ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิด ALL มักมีต่อมน้ำเหลืองโตได้บ่อยและอาจมีตับและม้ามโตร่วมด้วย นอกจากนี้ในผู้ป่วย ALL บางรายอาจพบอัณฑะบวมโตได้บ่อยซึ่งเกิดจาก Leukemic infiltration เช่นกัน โดยมักจะพบในกลุ่มผู้ป่วยระยะโรคเป็นกลับหรือดื้อยา ในผู้ป่วยเด็กที่เป็น ALL มักจะมีอาการปวดขาบางครั้งอาจเดินไม่ได้ (Limping gait) ซึ่งเกิดจากเซลล์มะเร็งอัดแน่นในไขกระดูก (packed marrow) ร่วมกับมีเซลล์มะเร็งแพร่กระจายออกมายังผิวกระดูก นอกจากนี้ในกรณีที่เซลล์มะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีจำนวนมากในกระแสเลือด โดยเฉพาะถ้าเซลล์มะเร็งชนิด Myeloblast สูงกว่า $50x10^9$ เซลล์/ลิตร จะทำให้มีการคั่งของเซลล์ในกระแสไหลเวียนของเลือด (Hyperleukocytosis) และหลอดเลือดเล็กๆในสมองและปอด (Leukostasis) จึงทำให้ผู้ป่วยซึมลง เหนื่อยหอบ หายใจไม่ทัน ชัก หมดสติ และอาจเกิดการหายใจล้มเหลวได้ ในกรณีที่เซลล์มะเร็งชนิด Lymphoblast จะพบภาวะ Leukostasis ได้น้อยกว่าเนื่องจากเซลล์จะมีขนาดเล็กกว่า แต่มักจะเกิดภาวะการแตกสลายของเซลล์มะเร็ง (Tumor lysis syndrome) ได้บ่อยกว่าเนื่องจากเซลล์จะแตกง่ายกว่า เมื่อเซลล์แตกจะทำมีการปล่อยสารต่างๆออกมาจึงทำให้มีความผิดปกติของอิเลคโตรลัยท์ในร่างกาย เช่น ระดับโปแตสเซียมสูง ระดับฟอสเฟตสูง ระดับกรดยูริกสูง ระดับแคลเซียมต่ำ หรืออาจมีภาวะไตวายเฉียบพลัน

ส่วนในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง เนื่องจากการดำเนินของโรคมีลักษณะแบบค่อยเป็นค่อยไป ฉะนั้นในผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจจะไม่มีอาการแสดงเมื่อแรกเริ่มวินิจฉัยหรืออาจมีอาการโดยทั่วไป คือ อาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรง สำหรับลักษณะอาการทางคลินิกเมื่อแยกตามการแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง ได้ดังต่อไปนี้ คือ ลักษณะอาการที่สำคัญของผู้ป่วย CML ได้แก่ อาการแน่นอืดท้อง กินอาหารได้น้อยลง เนื่องจากมักมีม้ามโตไปกดเบียดกระเพาะอาหาร

ในกรณีที่ม้ามโตมากอาจทำให้รู้สึกเจ็บปวดใต้ชายโครงซ้าย หรือบางครั้งอาจเจ็บปวดรุนแรงอันเนื่องมาจาภาวะม้ามขาดเลือด (Splenic infarction) ซึ่งเกิดจากภาวะ Leukostasis ในระบบการไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงม้าม นอกจากนี้ในผู้ป่วย CML ในวัยหนุ่มบางรายอาจมีอาการอวัยวะแข็งตัวค้าง (Priapism) ซึ่งเกิดจากภาวะ Leukostasis ได้ด้วยเช่นกัน โดยมักเกิดในผู้ที่มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดสูงเกินกว่า 200×10^9 เซลล์/ลิตร ซึ่งถือเป็นภาวะฉุกเฉินที่ต้องทำการลดปริมาณเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี Leukapheresis ผู้ป่วย CML บางรายอาจมีภาวะเลือดออกผิดปกติได้ทั้งๆที่จำนวนเกล็ดเลือดปกติซึ่งเกิดเนื่องจากการทำงานของเกล็ดเลือดผิดปกติ (Platelet dysfunction) ในระยะท้ายๆของโรคผู้ป่วยมักมีภาวะไขกระดูกเป็นผังผืด (Myelofibrosis) ได้บ่อย ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยมีม้ามโตขึ้นมาได้อีกแม้ผู้ป่วยจะตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดมาก่อนแล้วก็ตาม สำหรับลักษณะอาการที่สำคัญของผู้ป่วย CLL ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองโตซึ่งมีตั้งแต่ขนาดเล็กๆประมาณ 0.5- 1 เซนติเมตร ในบางตำแหน่ง เช่น บริเวณคอ รักแร้ ขาหนีบ เป็นต้น หรือมีต่อมน้ำเหลืองโตขนาดใหญ่หลายเซนติเมตรกระจายทั่วทั้งตัว (Generalized lymphadenopathy) โดยอาจมีตับม้ามโตร่วมด้วย ผู้ป่วย ALL บางรายอาจมีอาการซีดอ่อนเพลียมากอันเนื่องมาจากเซลล์มะเร็งรบกวนการทำงานของไขกระดูกและอาจมีภาวะ immune hemolysis หรือ immune thrombocytopenia ร่วมด้วย ในผู้ป่วย CLL ถึงแม้จะมีจำนวน Lymphocyte ตัวแก่มากแต่ก็มีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายเนื่องจากเม็ดเลือดเหล่านั้นไม่สามารถทำงานได้ปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะท้ายๆของโรค เนื่องจากการทำงานของเม็ดเลือดผิดปกติร่วมกับมีอิมมูโนกลอบูลินที่ปกติลดลง และมีภาวะ Neutropenia ร่วมด้วย นอกจากนี้อาการอื่นๆที่พบได้ในผู้ป่วย CLL ได้แก่ ไข้ เบื่ออาหาร น้ำหนักลด เป็นต้น

การวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [21, 26, 36, 41]

การวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจำเป็นต้องอาศัยการตรวจร่างกายและซักประวัติอย่างละเอียดนอกจากนี้โดยทั่วไปอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 6 วิธี ได้แก่

1.การตรวจความสมบูรณ์ของเลือดครบส่วน (Complete blood count;CBC) ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติซึ่งการรายงานผลจะประกอบด้วย การนับจำนวนและนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว (White blood cell count and differential cell), การนับจำนวนเม็ดเลือด

แดง (Red blood cell count), ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hemoglobin;Hb), ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit;Hct) และการนับจำนวนของเกล็ดเลือด (Platelet count) ว่าค่าที่ได้นั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มของประชากรในวัยและเพศเดียวกันนั้นมีจำนวนมากขึ้นหรือลดลงซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยเบื้องต้นเป็นอย่างมากดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมักตรวจพบโดยบังเอิญซึ่งมักพบจากผลการตรวจ CBC นี้ โดยเมื่อผลการตรวจเม็ดเลือดเหล่านี้ผิดปกติเมื่อวินิจฉัยแยกโรคอื่นๆออกแล้ว แพทย์จะทำการเจาะไขกระดูกเพื่อยืนยันและหาสาเหตุความผิดปกติต่อไป

2.การตรวจแผ่นฟิล์มเลือด (Blood smear) หรือแผ่นสเมียร์ไขกระดูก (Bone marrow smear) โดยการดูลักษณะและการติดสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อผลการตรวจ CBC มีความผิดปกติเพราะจากข้อจำกัดของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติโดยทั่วไปไม่สามารถนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดที่ผิดปกติได้ สำหรับการตรวจแผ่นฟิล์มเลือดนั้นต้องตรวจดูและนับแยกชนิดของเม็ดเลือดที่ผิดปกติอย่างละเอียดว่าเป็นชนิดและระยะใด รวมถึงการตรวจดูลักษณะที่ผิดปกติของเม็ดเลือดแดง (Red blood cell morphology) และตรวจดูลักษณะและจำนวนของเกล็ดเลือดว่ามีผลต่ำปลอมหรือไม่ (Pseudothrombocytopenia) อันเนื่องมาจากการเตรียมสิ่งส่งตรวจไม่ดีหรือไม่ และเพื่อเป็นการยืนยันผลของการตรวจ CBC ที่ผิดปกติดังกล่าวแพทย์จะทำการเจาะไขกระดูกเพื่อยืนยันและหาสาเหตุความผิดปกติซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การเจาะดูดไขกระดูก (Bone marrow aspiration) และการตัดชิ้นเนื้อไขกระดูก (Bone marrow biopsy) โดยจะทำการประเมินปริมาณของเซลล์ทั้งหมดในไขกระดูก (Cellularity) ว่าปกติ เพิ่มขึ้น หรือลดลงและประเมินว่ามีจำนวนของเซลล์ในสายหนึ่งสายใดสูงขึ้นอย่างเด่นชัดหรือไม่ [42]

3.การตรวจอิมมูโนทัยป์ของเซลล์มะเร็งด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ซึ่งในปัจจุบันการตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์มีประโยชน์อย่างยิ่งเนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์เซลล์ได้ทีละเป็นแสนหรือล้านเซลล์พร้อมกันในเวลาอันรวดเร็วและยังสามารถแยกชนิดของเซลล์มะเร็งตามการแสดงออกของแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ (Surface antigen) และในเซลล์ (Intracellular antigen) และยังสามารถบอกระยะการเจริญเติบโต (Developmental stage) ของเซลล์มะเร็งได้อย่างละเอียด

4.การย้อมสีโดยเทคนิคพิเศษ (Cytochemistry staining) คือ การย้อมพิเศษเพื่อใช้ตรวจหาสารชีวเคมีของเซลล์ (biochemical molecules) เช่น เอนไซม์ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ซึ่งการตรวจอาศัยหลักการที่เซลล์แต่ละชนิดจะมีปริมาณและชนิดของสารชีวเคมีภายในเซลล์แตกต่างกัน การตรวจเทคนิคนี้ยังคงนิยมใช้เนื่องจากมีประโยชน์ในการแยก AML ออกจาก ALL และแยกชนิดย่อยของ AML อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการทำถูกกว่า flow cytometry และ immunohistochemistry ตัวอย่างชนิดของการย้อม cytochemistry เช่น myeloperoxidase (MPO), Sudan black B (SSB), Periodic acid-shiff (PAS) และ Non specific esterase (NSE)

5.การตรวจโครโมโซม ความผิดปกติระดับโครโมโซมพบได้บ่อยในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและสามารถนำมาใช้วินิจฉัยแยกโรค พยากรณ์โรคของผู้ป่วยรวมถึงพัฒนายาแบบที่มุ่งเป้าแก้ไขความผิดปกติในระดับเซลล์และโมเลกุล (Target therapy)

6.การตรวจระดับยีน เนื่องจากในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดจากความผิดปกติระดับยีน การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติระดับยีนด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล (Molecular genetics) เพื่อให้สามารถแยกชนิดย่อยของโรคอย่างถูกต้องตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2008 (WHO classification 2008) การกลายพันธุ์ที่มีความผิดปกติส่วนใหญ่เกิดจากความผิดปกติระดับโครโมโซมฉะนั้นจึงต้องทำการตรวจโครโมโซมก่อน แล้วถ้าไม่พบความผิดปกติจำเป็นต้องทำการตรวจระดับยีน ไม่ว่าจะเป็นเทคนิค PCR, microarray, proteomics และ microRNA

การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [4-7]

วิธีการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้รับการพัฒนามาโดยตลอดจะเห็นได้ว่าในปัจจุบันโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถรักษาให้หายขาดได้เพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากวิธีการรักษามีหลายวิธีได้แก่

1. การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (Chemotherapy)

ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้หมดไปอาศัยยาหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งเรียกว่า ยาเคมีบำบัด โดยยาเหล่านี้มีลักษณะเฉพาะคือ

ออกฤทธิ์ขัดขวางการแบ่งเซลล์ซึ่งมีทั้งชนิดที่ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยตรง ชนิดที่ยับยั้งการสร้าง mRNA และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ยาบางชนิดยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด โดยแบ่งได้เป็นกลุ่มต่างๆที่สำคัญดังนี้

1.1 Alkylating agent การสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่นั้นจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน ยาบางชนิดที่ทำให้การเติม methyl group (CH 3-), ethyl group (CH3CH2-) หรือ alkyl group อื่นๆบนเส้น DNA ซึ่งจะทำให้ DNA ต้นแบบ (template) ผิดปกติ จึงทำให้เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ลอกแบบพันธุกรรมไม่สามารถทำงานได้ หรือยาบางชนิดทำให้เส้น DNA หลายเส้นติดกันไม่สามารถแยกมาสร้างเส้นใหม่ได้ การแบ่งเซลล์จึงหยุดชะงักลง ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น cisplatin, cyclophosphamide, melphalan, busulfan และ dacarbazine

1.2 Antimetabolites เป็นยาที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide analog) เช่นคล้ายกับ guanine เมื่อเซลล์นำสารในยานี้ไปสร้าง DNA เส้นใหม่จะทำให้ DNA เส้นนั้นทำงานไม่ได้ เช่น ยา 6-thioguanine หรือยาบางตัวมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายโฟเลต จึงสามารถแย่งจับกับเอนไซม์ต่างๆได้การสร้างนิวคลีโอไทด์จึงหยุดชะงักลง ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น 5-fluorouacil (5-FU), methotrexate และ fludarabine

1.3 Mitotic inhibitors สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบ mitosis โดยการไปจับกับโปรตีน tubulin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ microtubules ภายในเซลล์ซึ่งการแบ่งตัวของโครโมโซมจะสำเร็จก็ต่อเมื่อ microtubules ดึงแยกโครโมโซมไปอยู่สองข้างของเซลล์ในระยะ anaphase เมื่อยาไปจับกับ tubulin จึงทำให้ขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์ ยาในกลุ่มนี้มักเป็นสารอัลคาลอยด์ (alkaliod) เช่น etoposide, paclitaxel, vinblastine, vincristine และ vinorelbine

1.4 Topoisomerase inhibitors ปกติเส้น DNA มีลักษณะเป็น double helix และจะมีการขมวดเป็นปมคล้ายสปริง (coiling และ supercoiling) การที่จะสร้าง DNA สายใหม่นั้นจะต้องมีการคลายตัวของปม DNA เสียก่อนซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ topoisomerase ดังนั้นยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase จึงทำให้ไม่สามารถสร้าง DNA เส้นใหม่ขึ้นมาได้ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ คือ Camptothecin

1.5 Intercalation ยาบางชนิดสอดแทรกโมเลกุลเข้าไประหว่างเส้นเดี่ยวทั้งสองสายของ DNA ทำให้ขัดขวางการถอดรหัสเป็น RNA และโปรตีน จึงทำให้เซลล์ทำงานไม่ได้และตายไปในที่สุด ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ คือ actinomycin D, daunorubicin, doxorubicin และ idarubicin

1.6 Asparaginase เป็นยาที่ทำลายกรดอะมิโน asparagine ซึ่งกรดอะมิโนนี้เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการสร้างโปรตีนหลายชนิดที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ ซึ่งยาในกลุ่มนี้จะทำให้เซลล์มะเร็งขาดกรดอะมิโน asparagine จึงทำให้เซลล์ไม่ทำงานและตายไปในที่สุด ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ คือ L-asparaginas

1.7 Receptor-mediated lympholysis เป็นยาประเภท corticosteroid ทำให้เซลล์ lymphocyte และ lymphoblast เกิดการทำลายตนเอง โดยการที่ยาเหล่านี้จะเข้าไปในเซลล์และจับกับโมเลกุลที่เรียกว่า steroid receptor ภายในซลล์ ซึ่งการจับกันของ steroid และ receptor ทำให้เกิดการส่งสัญญาณโปรตีนภายในเซลล์และนำไปสู่การตายของเซลล์แบบอะโพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์ในสาย lymphoid

2.วิธีการปลูกถ่ายไขกระดูก (Bone marrow transplantation)

การปลูกถ่ายไขกระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิด เป็นวิธีการที่ควรต้องทำในกรณีที่จำเป็นจริงๆ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงมาก ซึ่งจะสามารถทำได้ผลดีในกรณีที่ผู้ป่วยสามารถหาผู้บริจาคที่มีเนื้อเยื่อที่เข้ากันได้และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุไม่มากนัก ในขั้นตอนการเตรียมตัวผู้ป่วยมักใช้วิธีให้ยาเคมีบำบัดในขนาดที่สูงมากและอาจใช้ร่วมกับวิธีการใช้รังสีรักษาแบบทั่วตัวโดยมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งออกไปให้มากที่สุด จากนั้นจึงนำเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ซึ่งอาจนำมาจากไขกระดูก หรือ peripheral blood มาทำการปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วย โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่นำมาปลูกถ่ายนั้นอาจจะมาจากผู้ป่วยเอง (Autologous stem cell transplantation) หรือจากบุคคลอื่น (Allogenic stem cell transplantation) ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป

3.วิธีรังสีรักษา (Radiotherapy)

เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวอยู่ในไขกระดูกซึ่งมีอยู่ทั่วร่างกายและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เหล่านั้นมักแพร่กระจายทั่วไปในกระแสโลหิตไหลเวียน ฉะนั้นวิธีการฉายแสงเพื่อให้เซลล์มะเร็งหมดไปจึงไม่เหมาะสมนักเนื่องจากไม่สามาถฉายแสงทั่วร่างกายได้ ในปัจจุบันการใช้รังษีรักษานิยมใช้ในการรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลือง หรือใช้ในขั้นตอนเตรียมผู้ป่วย

ก่อนการปลูกถ่ายไขกระดูก (Conditioning regimens) ซึ่งเป็นการทำลายไขกระดูกเดิมของผู้ป่วยเพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับไขกระดูกที่จะนำมาปลูกถ่ายใหม่ในขณะเดียวกันก็เป็นการกำจัดเซลล์มะเร็งที่มีอยู่ในร่างกายผู้ป่วยให้หมดไปด้วย

4.การรักษาด้วยภูมิคุ้มกัน (Immunotherapy)

ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะชนิดที่มีต้นกำเนิดจากสาย lymphoid คือ ALL และ CLL จะมีจำนวนเม็ดเลือดขาว lymphocyte ปกติลดน้อยลง ผู้ป่วยจึงมักเสียชีวิตจากการติดเชื้อฉวยโอกาส ฉะนั้นการรักษาโดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงเป็นทางเลือกที่ดีที่ช่วยกระตุ้นให้ Natural Killer cell (NK cell) เพิ่มศักยภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งแล้วยังช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ปกติ

5.การใช้อินเตอร์เฟอรอน (Interferons)

อินเตอร์เฟอรอน (Interferons;IFN) เป็นสาร glycoprotein ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ เช่น T-lymphocyte, NK cells เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านไวรัสและต่อต้านการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งรวมถึงเป็นตัวกระตุ้นศักยภาพของ NK cells และ macrogphage กระตุ้นการแสดงออกของ MHC ของ lymphocyte ซึ่งล้วนแต่เป็นกลไกในการกำจัดเซลล์มะเร็ง

6.การใช้ยีนบำบัด (Gene therapy)

การรักษาโดยใช้ยีนบำบัด สามารถทำได้หลายวิธี เช่น potentiate immunotherapy เป็นการเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งทำโดยการใส่ยีนที่กำหนดการสร้าง cytokines ชนิดต่างๆเข้าไปในเซลล์มะเร็งโดยตรง, Chemoprotection ทำโดยการใส่ multidrug resistance (mdr) gene ลงไปในเซลล์ตัวอ่อนของไขกระดูกก่อนการให้ยาเคมีบำบัดขนาดสูง เป็นต้น

ในปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรหลายชนิดมาใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งเม็ดเลือดขาว และสารสกัดจากพืชบางชนิดได้มีการนำมาใช้เป็นยาในการรักษามะเร็งแล้ว เช่น vincristine และ vinblastine เป็นยาที่สกัดจากแพงพวยฝรั่ง, Paclitaxel ซึ่งเป็นยาที่สกัดได้จากต้นยิว(*Taxus brevifolia*) และ camptothecin เป็นสารอัลคาลอยด์ ที่ได้จากพืช *Camptotheca acuminata* ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้นำสมุนไพรที่ได้มีการทดสอบแล้วว่ามีสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็ง คือ พลูคาว มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อดูคุณสมบัติในการยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบ

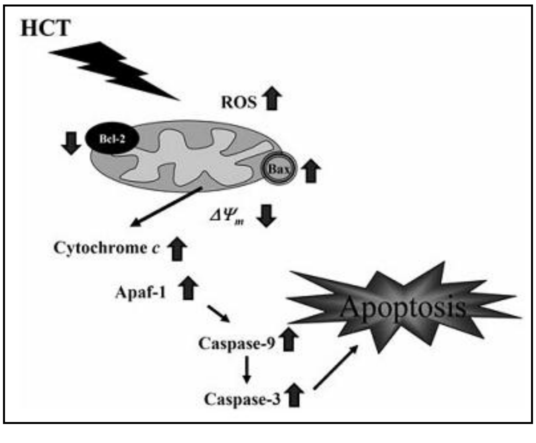
พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb) [8, 9, 43]

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะของต้นพลูคาว [43]

พลูคาว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Houttuynia cordata* Thunb อยู่ในวงศ์ Saruraceae มีชื่ออื่นๆ คือ ผักคาวตอง ผักเข้าตอง ผักคาวทอง ผักก้านตอง พลูแก (ไทย), Chinese lizard tail (ทั่วไป), houttuynia (ทั่วไป), Yu xing cao (จีน), E-Sung-Cho(เกาหลี), Dokudami (ญี่ปุ่น) พลูคาวเป็นพืชพื้นถิ่นที่มีมากในภาคเหนือของไทย นิยมนำมารับประทานเป็นผักเครื่องเคียง มีลักษณะเป็นพืชล้มลุกอยู่ในวงศ์เดียวกับพลู มีกลิ่นคาว ลำต้นเลื้อยทอดไปตามพื้นดิน ลำต้นที่อยู่เหนือพื้นดินสูง 10-30 เซนติเมตร ลำต้นใต้ดินเป็นปล้องสั้นๆ สีนวล มีรากออกแตกจากข้อโดยรอบเพื่อยึดเกาะ ใบเดี่ยว ออกเวียนหรือออกสลับกัน แผ่นใบรูปไข่กว้างประมาณ 2.5 -7.5 เซนติเมตร ยาว 3-9 เซนติเมตร ปลายใบแหลมมาก โคนใบรูปหัวใจ หรือรูปไต ขอบใบเรียบ เส้นใบออกที่โคนใบ 5-7 เส้น มีขนสั้นๆตามโคนใบ แผ่นใบบนสีเขียวเข้มกว่าใต้ใบมีจุดโปร่งแสงทั่วทั้งใบ ช่อดอกออกตามยอด หรือซอกใบใกล้ยอด อับเรณูสีเหลือง ดอกออกมากในเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม

พลูคาวเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลากหลาย พบรายงานในประเทศจีนในการนำมารักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Ueteritis) รักษาอาการไอ โรคติดเชื้อต่างๆ (Leucorrhea) [9, 10] Chiang และคณะพบว่าสารสกัดพลูคาวด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อ SARS และ HSV โดยการยับยั้งยับการทำงานของ nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) [11] นอกจากนี้จากการศึกษาวิจัยพบว่าพลูคาวมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) โดยไปลด

ระดับของไซโตไคน์ IL-6, TNF-α และเอนไซม์ COX-2 [12, 13,44], ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อและเสริมภูมิต้านทาน [18, 45-46], ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(anti-oxidative) [47,48] รักษาอาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้รังสีรักษา และเคมีบำบัด ยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว[16] ในส่วนของฤทธิ์การต้านมะเร็ง Chang และคณะพบว่าสารสกัดพลูคาวด้วยน้ำมีฤทธิ์แสดงความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 5 ชนิดคือ U937, K562, Raji, P3HR1 และ L1210 [16] สิงห์คำธิมา และคณะพบว่าสารสกัดพลูคาวมีฤทธิ์แสดงความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HL-60 และ U937 [17] แต่งานวิจัยทั้งสองชิ้นเป็นเพียงการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นไม่ได้ศึกษาถึงกลไกในการชักนำให้เกิดการตาย Tang และคณะ [14] พบว่าสารสกัดพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 50% มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิส (apoptosis) ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT-29 โดยผ่านทาง mitochondrial-dependent pathway ซึ่งเกิดจากพลูคาวไปกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณ ROS เพิ่มการแสดงออกของ Bax ยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 และลดระดับของ mitochondria membrane potential (MMP) จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการปล่อย cytochrome c ออกมาจาก mitochondria ซึ่ง cytochrome c ที่ปล่อยออกมานี้จะไปกระตุ้น Apaf-1 จากนั้นจะทำให้เพิ่มของ caspase-9 ซึ่งจะไปทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ caspase-3 จึงทำให้เกิดตายแบบอะโพโทซิสดังแสดงในภาพที่ 6 นอกจากนี้ Lai และคณะยังได้ทำการทดลองในเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ได้จากผู้ป่วย พบว่าสารสกัดพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 50% สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสด้วยกลไกเช่นเดียวกันกับที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ [15]



ภาพที่ 6 การเกิดอะโพโทซิส (apoptosis) จากการชักนำของสารสกัดพลูคาว [14]

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพลูคาวมี 6 ชนิดหลักๆ คือ [8, 9, 44-49]

1. Flavonoids เช่น Quercetin, Rutin, Quercitrin, Hyperin, Isoquercetin

2.Volatile oil เช่น β-myrcene, β- pinene, β- pinene, α-terpineol, n-decanoic acid, methyl nonyl ketone

3. Alkaloids เช่น Aristolactam A, Aristolactam B, Aristolactam A II, Pipenolactan A, Norcepharadione, Cepharadione B, Splendidin

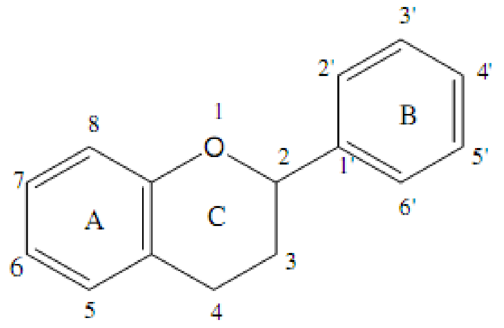
4. Fatty acid เช่น Capric acid, Methyl oleate, Methyl linoleate

5. Sterols เช่น 1-Terpinen-4-ol, Decanol

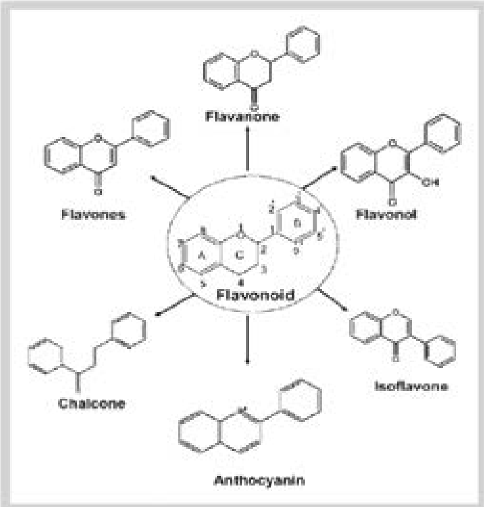
6. Phenolic acids เช่น caffeic acid, chlorogenic acid

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) [46-50]

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประเภท polyphenolic compounds พบได้ทั่วไปในพืช และอาหารที่มีพืชเป็นส่วนประกอบ โดยมีส่วนประกอบหลักของโครงสร้างเป็น 3-คาร์บอนเชื่อมต่อกับวงแหวนไพแรนหรือวงแหวนไพรอนเรียกว่า phenylbenzopyrone structure (C6-C3-C6) ดังแสดงในภาพที่ 7 ฟลาโวนอยด์ยังสามารถแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆตามโครงสร้างระหว่างวงแหวน B หรือ C และการออกซิเดชันของออกซิเจนบนวงแหวนในโครงสร้างได้เป็น 6 ประเภท คือ flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidins และ chalcones หรือ flavanols ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ [46]

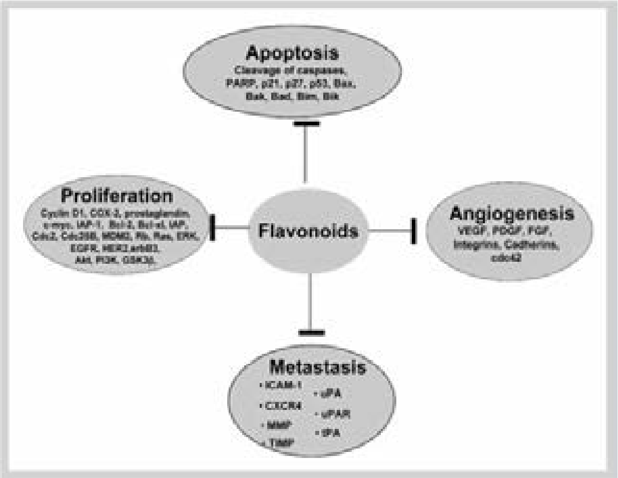


ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ [50]

ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกชนิดย่อยของฟลาโวนอยด์ [50]

Flavonoid subgroup	Representative flavonoids
Flavonols	Quercetin, kaempherol, myricetin, rutin, morin, fisetin
Flavones	Apigenin, chrysin, luteolin, diosmetin, baicalein, wogonin,
	Amentoflavone, biapigenin, baicalin, flavopiridol, acacetin
	Isovitexin, ochnaflavone, tangeretin, pentamethoxyflavone
Isoflavones	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin, vitexin, equol
	Glabridin, irigenin, biochanin A, formononetin, nobiletin
Anthocyanidins	Cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin
Flavanones	Eriodictyol, hesperitin, naringenin, naringin, silibinin,
	Homoeriodictyol, poncirin, bavachinin taxifolin
Chalcones	Resveratrol, isoliquiritigenin, cardamomin, butein,
	Tris(methoxymethoxy)chalcone, xanthohumol

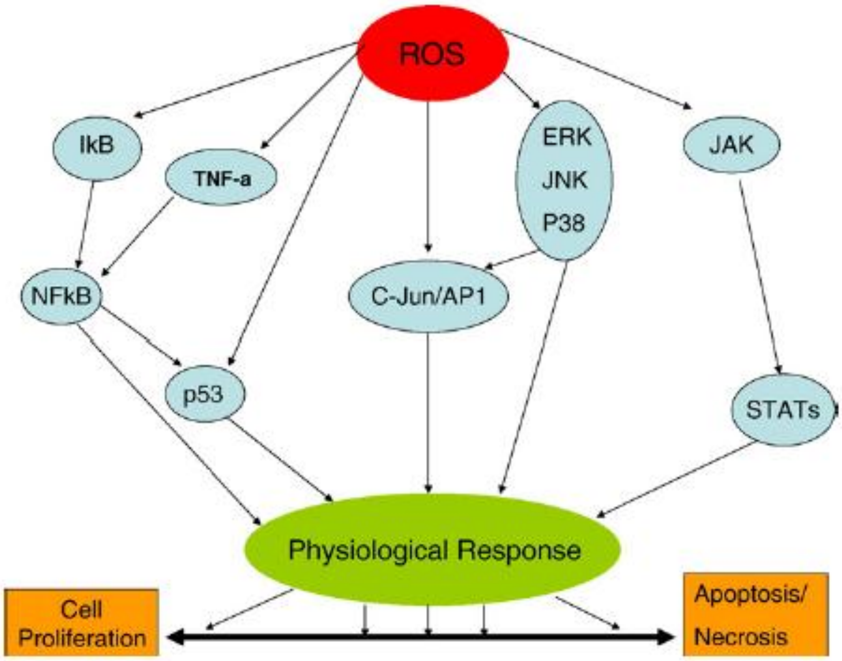
ฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ต้านอาการแพ้ (anti-allergy), ต้านอนุมูลอิสระ(anti-oxidative), ต้านมะเร็ง(anti-cancer)และต้านการสร้างเส้นเลือดใหม่ (anti-angiogenic) เป็นต้น [50-55] จากการศึกษาวิจัยพบว่าฟลาโวนอยด์สามารถต้านการอักเสบโดยมีรายงานว่าจะไปยับยั้งการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) และเอ็นไซม์ cyclooxygenase (COX-2) รวมถึงยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin E_2 (PGE_2) [41]



ภาพที่ 9 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆของฟลาโวนอยด์ [50]

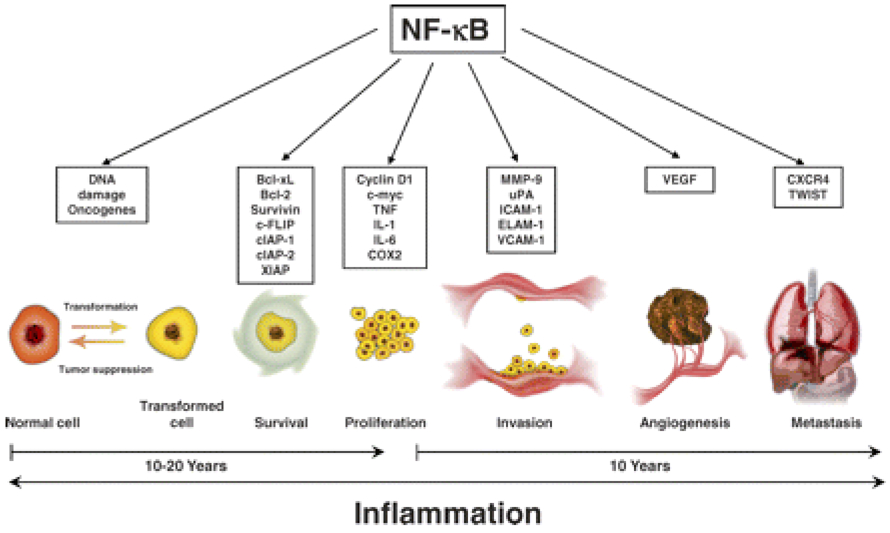
ในปัจจุบันได้นำฟลาโวนอยด์มาเป็น chemopreventive หรือ nutraceuticals ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยพบว่าสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของมะเร็งชนิดต่างๆ เนื่องจากสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งโดยสามารถยับยั้ง DNA topoisomerase I/II และควบคุม cell arrest ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การตายแบบอะโพโทซิสเนื่องจากจะไปรบกวน mitochondrial transamembrane potential และกระตุ้นการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่ง ROS ที่เพิ่มสูงขึ้นนี้ทำให้เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมที่เป็นตัวควบคุมและเก็บ Ca^{2+} ภายในเซลล์สูญเสียหน้าที่จึงปลดปล่อย Ca^{2+} ออกมาซึ่งปริมาณ Ca^{2+} อิสระที่ออกมามากเกินจะไปรบกวนการหายใจระดับเซลล์ทำให้ผนังเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและยังไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ endonuclease ไปย่อย DNA จึงส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด [56, 57] แต่อนุมูลอิสระนั้นมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วยเช่นกันจากการทำหน้าที่ในการต่อต้าน

เชื้อโรคและยังมีบทบาทในการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) ซึ่งมักจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเจริญเติบโตและการตายของเซลล์ โดยกระตุ้นผ่านทางเอนไซม์ transcription factors และ nuclear factor ต่างๆ โดยพบว่าถ้าปริมาณ ROS น้อยจะไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในทางกลับกันถ้าปริมาณ ROS มากจะไปกระตุ้นการตายของเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 10

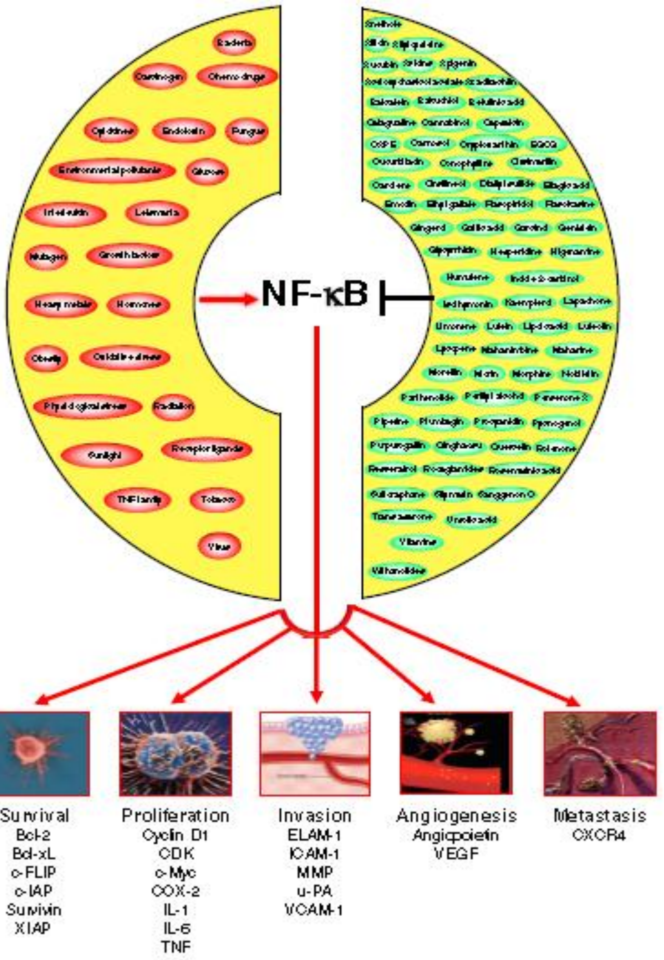


ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS และการส่งสัญญาณของเซลล์ [56]

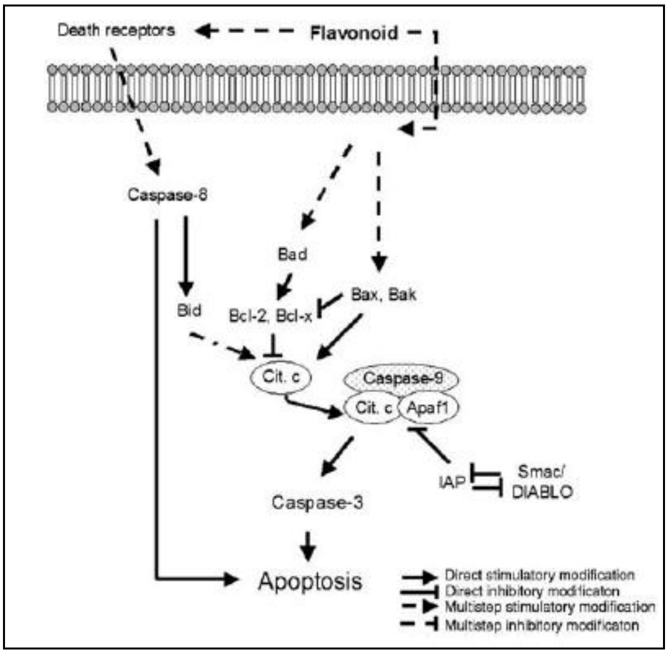
และ ROS ที่มีปริมาณมากเกินจะไปกระตุ้นให้เกิดการปล่อย cytochrome C เพื่อกระตุ้นการทำงานของ caspase-9 และ caspase-3 [57, 58] นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของ nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) ซึ่งเป็น signal transcription factor ที่ควบคุมและส่งเสริมให้เซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นการ transformation, proliferation, invasion และ metastasia [50] โดยฟลาโวนอยด์ไปยับยั้ง NF-κB และ p65 phosphorylation จึงทำให้ลดการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดมะเร็ง (oncogenes) และยังลดการแสดงออกของ Bcl-2, Bcl-X_L, cyclin D1 และ COX-2 อีกด้วย [46, 47] ดังแสดงในภาพที่ 11-13



ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของ NF-KB ในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง [59]



ภาพที่ 12 แสดงฤทธิ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการทำงานของ NF-KB [60]



ภาพที่ 13 แสดงฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์ในการชักนำให้เกิดอะโพโทซิส [50]

Quercetin และอนุพันธ์ของ Quercetin [61-64]

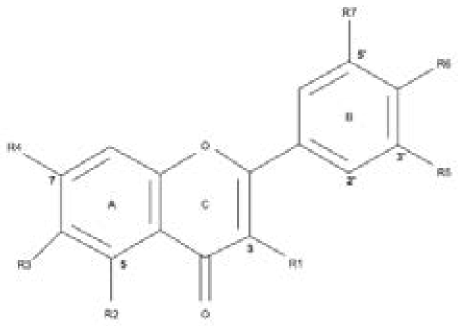
Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) และอนุพันธ์ของ Quercetin เช่น Rutin, Isoquercetin, Hyperin, Quercitrin เป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่มย่อยฟลาโวนอล(flavonols) ในธรรมชาติ Quercetin มักอยู่ในรูปที่จับกับน้ำตาล, phenolic acids หรือ แอลกอฮอล์ [61] แต่เมื่อบริโภคเข้าไปในร่างกายจะถูกแยกหมู่น้ำตาลออกและถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารในรูปของ Quercetin สำหรับอนุพันธ์ของ Quercetin ที่พบมากในธรรมชาติมักเชื่อมต่อกับหมู่น้ำตาลโดยหมู่น้ำตาลนี้มีอิทธิพลต่อลักษณะทางเคมีและลักษณะทางกายภาพ ซึ่งหมู่น้ำตาลที่เชื่อมต่อนี้มักเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือแรมโนส 1, 2 หรือ 3 โมเลกุล ตัวอย่างเช่น ถ้า Quercetin เชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสและแรมโนส(Quercetin 3-rutinoside) จะเรียก Rutin, ถ้าQuercetin เชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคส (Quercetin 3-β-D-glucoside) เรียก Isoquercetin และถ้า Quercetin เชื่อมต่อกับน้ำตาลกาแลคโตส เรียก Hyperin นอกจากนี้ยังมีอนุพันธ์ของQuercetin ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาล, phenolic acids หรือ แอลกอฮอล์ อีกหลายชนิดซึ่งจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 3 จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานการพบ Quercetin, Quercitrin, Rutin, Hyperin, Isoquercetin ใน

พลูคาวซึ่งสารดังกล่าวล้วนเป็นสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มย่อยฟลาโวนอลโดยชนิดและปริมาณของฟลาโวนอลในสารสกัดจะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายและวิธีในการสกัด [19, 20]

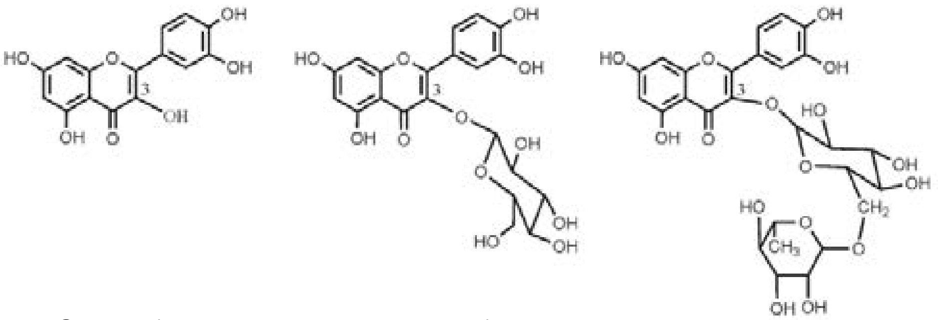
ตารางที่ 3 แสดงอนุพันธ์ของ quercetin ที่เชื่อมต่อกับหมู่ต่างๆ [61]

Systematic name (common name)	Substituents						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
(1). 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavon (quercetin)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
(2). Quercetin 3-*O*-glucoside (izoquercetin)	O-Glc	OH	H	OH	OH	OH	H
(3). Quercetin 3-*O*-rhamnoside (quercitrin)	O-Rha	OH	H	OH	OH	OH	H
(4).Quercetin 3-*O*-rhamnozyl-(1→6)-glucoside (rutin)	O-X	OH	H	OH	OH	OH	H
(5). Quercetin 7-*O*- glucoside	OH	OH	H	O-Glc	OH	OH	H
(6). Quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside	O-Rha	OH	H	O-Glc	OH	OH	H
(7). Quercetin 6-*C*- glucoside	OH	OH	Glc	OH	OH	OH	H
(8). Quercetin 3-(2"-acetylgalactoside)	O-Y	OH	H	OH	OH	OH	H
(9). Quercetin 3-sulfate-7-*O*-arabinoside	O-Sul	OH	H	O-Ara	OH	OH	H
(10). Quercetin 3-*O*-glucoside-3'-sulfate	O-Glc	OH	H	OH	O-Sul	OH	H
(11). Quercetin 5-methyl ether (azaleatin)	OH	O-M	H	OH	OH	OH	H
(12). Quercetin 7- methyl ether (rhamnetin)	OH	OH	H	O-M	OH	OH	H
(13). Quercetin 3'- methyl ether (isohramnetin)	OH	OH	H	OH	O-M	OH	H
(14). Quercetin 4'- methyl ether (tamarixetin)	OH	OH	H	OH	OH	O-M	H
(15). Quercetin 7-methoxy-3-*O*-glucoside	O-Glc	OH	H	O-M	OH	OH	H
(16). Quercetin 3'- methoxy -3-*O*-galactoside	O-Gal	OH	H	OH	O-M	OH	H
(17). 6,5'-Di-*C*-prenylquercetin	OH	OH	Z	OH	OH	OH	Z

Glc: glucose; Rha: rhamnose; Ara: arabinose; X: rhamnosylglucose; M: $-CH_3$; Sul: $-SO_3Na$; Y: 2-acetylgalactose; Z: prenyl.



ภาพที่ 14 โครงสร้างของ Quercetinและจุดเชื่อมต่างๆ (R1-R7) [61]



Quercetin Isouercetin Rutin

ภาพที่ 15 แสดงโครงสร้างของ Quercetin, Isoquercetin และ Rutin [61]

จากการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอล โดยเฉพาะ quercetin มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับฟลาโวนอยด์ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

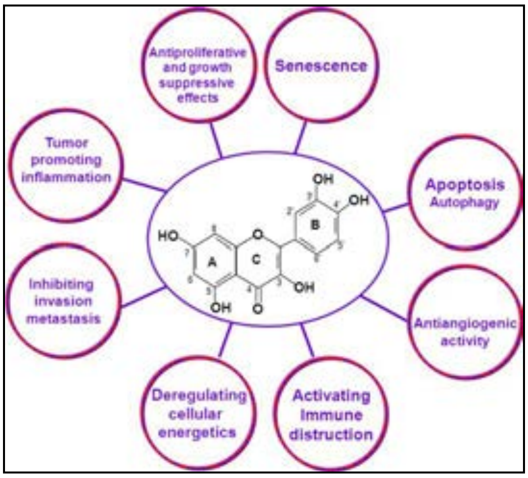
- ต้านการอักเสบ [13, 52] โดย quercetin จะไปลดการทำงานของเอนไซม์ COX-2 [61, 64] และ เอนไซม์ lipooxygenase [44] จึงส่งผลให้ลดการสังเคราะห์ eicosanoid เช่น prostaglandin (PG) ซึ่งเป็นสารสื่อกลางในการก่อให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่า quercetin ลดระดับการหลั่งไซโตไคน์ IL-6, TNF-α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ในกลุ่ม pro-inflammatory cytokines อีกด้วย [46, 47]

- ต่อต้านอาการแพ้โดยจะไปยับยั้งการส่งสัญญาณใน JAK-STAT pathway [53] โดยในการยับยั้งนั้นจะส่งสัญญาณไปยับยั้ง Interleukin-12 (IL-12) ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ [12]

- ต่อต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) โดยฟลาโวนอยด์จะให้ H กับอนุมูลอิสระ (RO●) และจะมีการให้ H แก่อนุมูลอิสระอีกครั้ง หรือเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในฟลาโวนอยด์ [56,64]

- ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง [65-68] โดยจากการที่สารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเป็น anti-oxidant ที่จะไปลดปริมาณของ RO● ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ carcinogensis [50, 54] จะไปยับยั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ growth factors, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase [55] และกระตุ้นการแสดงออกของ Bax และ Bak ในการ

กระตุ้น mitochondrial ให้ปล่อย cytochrome c ทำให้เกิดการเกิด caspase-9 และ caspase-3 และลดการแสดงออกของ Bcl-2, Bcl-X_L ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเกิด apoptosis รวมไปถึงยับยั้ง DNA topoisomerase I/II [69] และควบคุม cell cycle ทำให้เกิดการหยุดการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะใดระยะหนึ่งใน cell cycle ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และยังไปยับยั้งกระบวนการในการก่อให้เกิดมะเร็ง [57-58]



ภาพที่ 16 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสารฟลาโวนอล [50]

Guo และคณะพบว่า % yeild ของสารฟลาโวนอยด์ในพลูคาวมีสูงถึง 0.586 % ซึ่งสารฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพลูคาว คือ Quercetin, Rutin Quercitrin, Hyperin [62] ซึ่งล้วนเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอล (flavonols) ซึ่ง quercitrin เป็นอนุพันธ์ของ quercetin ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาล deoxy rhamnose และ hyperin เป็นอนุพันธ์ของ quercetin ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาล galactose [61] นอกจากนี้ Wu และคณะได้เก็บพลูคาวในแต่ละพื้นที่รวมทั้งหมด 22 จังหวัดในประเทศจีนพบว่าสารฟลาโวนอลพบคือ Quercitrin, Hyperin และ Quercetin ซึ่งในแต่ละพื้นที่สารฟลาโวนอลที่ตรวจได้ไม่แตกต่างกัน [49]

ไซโตไคน์ (Cytokines) [70, 71]

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนขนาดเล็กทำหน้าที่เป็นสารสื่อนำและปฏิสัมพันธ์เพื่อกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นๆต่อไปซึ่งประกอบด้วย interleukins (IL), colony stimulating factors (CSF), tumor necrosis factors (TNF) และ interferons (IFN) โดยไซโตไคน์จะมีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และรวมไปถึงการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์

Interleukin-2 (IL-2) [72, 73]

IL-2 เป็นโปรตีนมีน้ำหนักประมาณ 15.5 kDa เป็นไซโตไคน์หลักที่หลั่งมาจาก CD_4^+ T cells, CD_8^+ T cells นอกจากนี้ยังสามารถหลั่งได้จาก activated dendritic cells (DCs) และ natural killer (NK) cells IL-2เป็นไซโตไคน์ที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด โดยมีบทบาทหลากหลายซึ่งเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory), ตัวกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) และตัวควบคุมภูมิคุ้มกัน (immunoregulatory) สำหรับหน้าที่หลักของ IL-2 นั้น จะช่วยในการเพิ่มจำนวนแบ่งตัว (proliferation) โดยจะไปกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ nuclear factor Kappa B (NF-κB) ยับยั้งการตายแบบอะโพโทซิส (apoptosis) และกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ (autocrine growth factor)

Interleukin-4 (IL-4) [72, 74, 75]

IL-4 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจาก T cell, mast cell และ basophil จัดอยู่ในกลุ่ม Th2 cytokine กระตุ้นการเปลี่ยน naïve Th cell ไปเป็น Th2 cells และยับยั้งการทำงานของ IFN-γ มีผลไปยับยั้งระบบภูมิคุ้ม cell-mediated immune response และนอกจากนี้ยังกระตุ้น isotype class swithing ให้มีการสร้าง IgE และ IgG4

Interleukin-6 (IL-6) [72, 76, 77]

IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างจาก IL-1, TNF-α และ platelet derived growth factor (PDGF) มีคุณสมบัติเป็น proinflammatory cytokines และ anti-inflammatory

cytokine ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม และยังเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด โดยร่วมกับ colony stimulating factor (CSF) และ IL-3 ในการกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์

Interleukin-8 (IL-8) [72, 78-80]

IL-8 หรือ (CXCL8) เป็นไซโตไคน์ที่มีส่วนของ cytoplasmic tail เป็น Toll-lke/IL-1 receptor (TIR) domain สร้างมาจาก mononuclear phagocytes, antigen activated T cells และ epithelial cells ทำหน้าที่เป็น chemotactic ในการเคลื่อนที่และกระตุ้น neutrophils โดยทำให้ neutrophils มีการแสดงออกของ cell-surface adhesion molecule เพิ่มมากขึ้น และควบคุมการทำงานของเม็ดเลือดขาวในกระบวนการอักเสบ อีกทั้ง IL-8 ยังมีคุณสมบัติกระตุ้น angiogenic responses ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์ endothelial และเซลล์มะเร็ง และยังเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ

Interleukin-10 (IL-10) [72, 81]

สร้างจาก T cell, macrophage เป็นส่วนใหญ่ จัดเป็น regulatory cytokine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยยับยั้งการทำงานของ IL-12, การทำงานของ dendritic cell และการแสดงออกของ MHC class II molecules และ co-stimulatory molecules ซึ่งมีผลยับยั้งการกระตุ้น cell-mediated immune response

Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) [72, 82]

GM-CSF สร้างมาจาก T cells, monocyte, fibroblast และ endothelial cells ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่กระตุ้นกระบวนการสร้างเม็ดเลือดและการเจริญเป็นตัวแก่ของเซลล์ granulocyte และ monocyte/macrophage ในปัจจุบันมีการผลิต recombinant GM-CSF ใช้ในการกระตุ้น bone marrow ในผู้ป่วยมะเร็งที่รักษาด้วยยาเคมีบำบัดและการปลูกถ่ายไขกระดูก

Interferon-gamma (IFN-γ) [69, 71, 80]

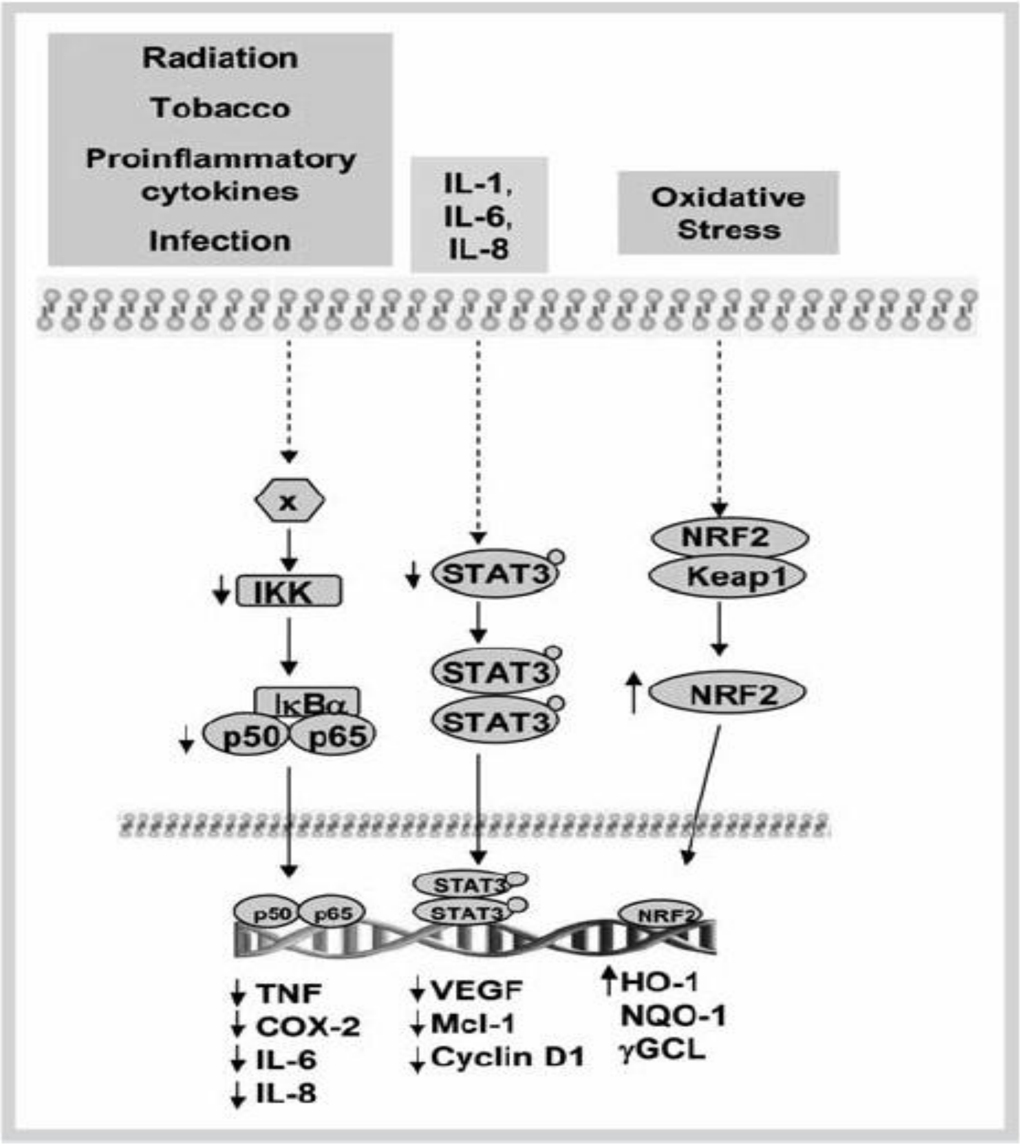
คำว่า “Interferon” มาจากความสามารถของไซโตไคน์ชนิดนี้ในการขัดขวางการเจริญของไวรัส แบ่งได้เป็น 2 type สำหรับ IFN-γ จัดเป็น type II interferon ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สร้างจาก

Tcells และ NK cells (จัดเป็น Th1 cytokine คือสร้างจาก Th1 cells จึงเสริมสร้าง Th1 cells และยับยั้งการทำงานของ Th2 cells) สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดตัวอ่อนเกิดการ differentiation ได้ โดยสามารถกระตุ้น B cells, T cells, NK cells และ macrophages ได้

TNF-α [72, 84, 85]

TNF-α สร้างมาจาก macrophage และ activated T cells เป็นไซโตไคน์ในกลุ่ม proinflammatory cytokines มีบทบาทสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammation) กระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecules การสร้าง chemokines โดย endothelial cells ส่งผลให้มีการเพิ่ม vascular permeability ในการก่อให้เกิดการอักเสบ กระตุ้นให้สร้าง prostaglandin (PG) กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ตัวอื่นๆ เช่น IL-1 และยังเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้าง CSF และ IL-6 นอกจากนี้ยังยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย

ไซโตไคน์ในกลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น จะมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดปกติรวมไปถึงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและรวมไปถึงบทบาทในการก่อให้เกิดการอักเสบ [86, 87] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารในกลุ่มฟลาโวนอลโดยเฉพาะสาร quercetin มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดมะเร็ง โดยจะไปลดปริมาณของvascular endothelial growth factor (VEGF) และ matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการ angiogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่จะทำให้มะเร็งมีการเจริญเติบโตและลุกลามต่อไป [88] นอกจากนี้ยังไปควบคุมการทำงานของ NF-κB ซึ่งมีบทบาทในด้านการแสดงออกของ cytokines และการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ [89-90] โดยจะไปเพิ่มการสะสมของ IκB ที่จะไปจับกับ NF-κB ทำให้ NF-κB ไม่สามารถเข้าไปใน nucleus เพื่อที่จะกระตุ้นการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องได้ ทำให้มีปริมาณของไซโตไคน์ดังกล่าวข้างต้นลดลง ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตของมะเร็งเม็ดเลือดขาวลดลง [91]



ภาพที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารในกลุ่มฟลาโวนอลและไซโตไคน์ [50]

การตายของเซลล์ (Programmed cell death) [91-93]

การตายของเซลล์และการเจริญหรือการสร้างเซลล์เป็นกระบวนการที่จำเป็นและสำคัญมากในการควบคุมสมดุลของสิ่งมีชีวิต การควบคุมการตายของเซลล์ที่ไม่เหมาะสมจะมีความเกี่ยวข้องหรืออาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมาได้ เช่น อัลไซเมอร์เกิดจากการที่เซลล์ไม่สามารถควบคุมตัวกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดการตายส่งผลให้มีการตายของเซลล์มากเกินไป ในขณะที่เซลล์ซึ่งไม่สามารถควบคุมตัวกระตุ้นที่ยับยั้งการตายได้ก็อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง การตายของเซลล์สามารถจำแนกตามความแตกต่างของรูปแบบการตายได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Type-I programmed cell death (Apoptosis) เป็นกลไกที่ทำให้สัตว์หลายเซลล์สามารถควบคุมจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อให้คงที่หรือเกิดความสมดุลและควบคุมพัฒนาการรูปร่างของอวัยวะต่างๆ ในระยะ embryogenesis กำจัดเซลล์ที่เสื่อมสภาพตามอายุขัย การตายแบบอะโพโทซิสจัดเป็นกลไกหนึ่งของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immune response) และ การป้องกันการเป็นมะเร็ง (anticarcinogenesis) ในมนุษย์

2. Type-II programmed cell death (Autophagy) เป็นการตายของเซลล์แบบกินตัวเองของเซลล์ซึ่งเกิดจากมีการสร้าง autophagic vacuoles มีการขยายของไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic reticulum; ER) และการขยายตัวใน Golgi apparatus

3. Type-III programmed cell death (Necrosis) หรือ accidental cell death เป็นการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเอง มีการบวมของเซลล์และแตกออกในรูปที่ไม่มีแบบแผนทำให้องค์ประกอบของเซลล์ถูกปลดปล่อยสู่เซลล์ข้างเคียงทำให้เซลล์ข้างเคียงนั้นได้รับความเสียหายและเกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (inflammatory response) อย่างรุนแรงจึงก่อให้เกิดการอักเสบ (inflammation)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์แบบ apoptosis, autophagy และ necrosis [91-93]

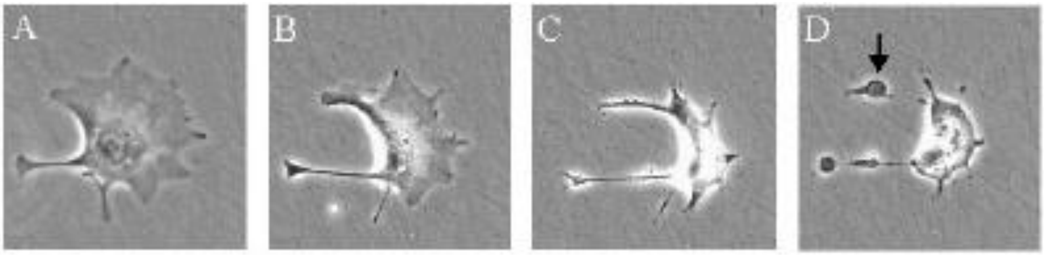
Feature	Apoptosis	Autophagy	Necrosis
Morphological	Cell shrinkage	Cell shrinkage	Cell swelling
	Cell membrane blebbing	Cell membrane blebbing	Loss of cell membrane integrity with release of cellular contents
	Chromatin condensation	Chromatin condensation	Total cell rupture
	Cell fragmentation into smaller bodies	Autophagic vacuoles	Cell membrane is lysed
Nuclease	Pyknotic	Pyknotic	No
Nuclear protein breakdown	Yes	No	No
DNA fragment			
- HMW*	Yes	Yes	Random digestion
- LMW*	Yes	No	Random digestion
Inflammatory response	No	No	Yes
ATP requirement	Yes	Yes	No
Detection	DNA ladder formation assay	Electron microscopy	Gel electrophoresis
	Annexin V and TUNEL	Monodansylcadaverine (MDC)	
	FACS analysis	Autophagosome membrane (LC3)	

HMW* = High molecular weight, LMW* = Low molecular weight

อะโพโทซิส (apoptosis) [91-95]

อะโพโทซิส (apoptosis) เป็นแบบแผนการตายรูปแบบหนึ่งของเซลล์ที่ถูกควบคุมโดยยีน เป็นกลไกที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมพัฒนาการและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ การตายของเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำซึ่งจะเกิดภายหลังจากการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signaling) โดยมีเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง และ pro-apoptotic proteins เช่น Bax, Apaf-1, p53, Bid, Bim และ cytochrome C เป็นตัวชักนำให้เกิดการตาย และมี anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2 และ $BclX_L$ เป็นตัวยับยั้งการตาย

การตายแบบอะโพโทซิสเป็นการตายที่มีลักษณะเฉพาะ คือ เซลล์ที่เกิดอะโพโทซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงของ Plasma membrane โดย phosphotidylserine (PS) ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์จะเคลื่อนที่ออกมายังด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์จะเกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) มีการเกาะกลุ่มกันของโครมาติน (Chromatin aggregation) และดีเอ็นเอถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก (DNA fragmentation) และ เกิดเป็น apoptotic body (formation of apoptotic bodies) ดังแสดงในภาพที่ 18 [95, 96]



ภาพที่ 18 แสดงการเกิดอะโพโทซิสของเซลล์ trophoblast เมื่อดูด้วย

กล้อง time-lapse microscopy [93]

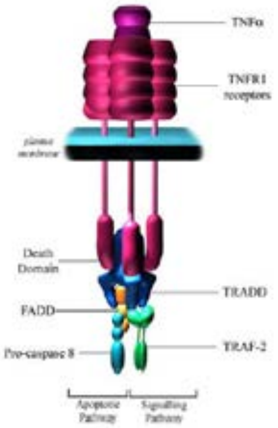
A) เกิดการ breakdown ของโครมาติน B) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ

C) มีการเกาะกลุ่มกันแน่น (packing) D) เกิดเป็น apoptotic body(ลูกศรชี้)

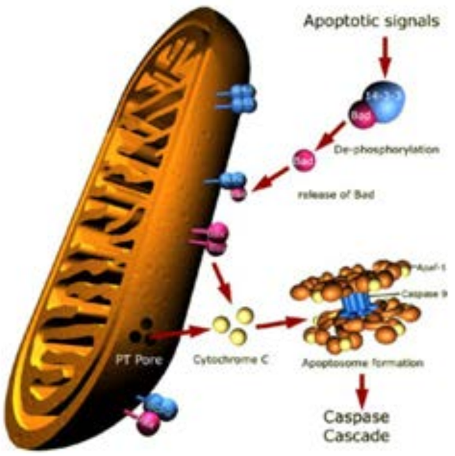
การเหนี่ยวนำให้เกิดอะโพโทซิสมี 2 วิถี คือ

1. Death receptor-inducing extrinsic pathway (extrinsic pathway) หรือวิถีจากภายนอก ซึ่งเหนี่ยวนำโดย death receptors เช่น tumor necrosis factor receptor (TNFR), Fas receptor (FasR), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ที่ได้รับการกระตุ้นจาก death ligand เกิดโครงสร้างที่ประกอบด้วย adaptor protein (TRADD หรือ FADD) และ initiator caspase (pro caspase 8 หรือ pro caspase 10) เรียกว่า death-inducing signaling (DISC) ไปกระตุ้นให้ pro caspase เปลี่ยนเป็น initiator caspase (caspase -2, -4, -8, -9, 10 และ -12) ซึ่งจะไปเหนี่ยวนำให้ effector caspases (caspase-3, -6 และ -7) ทำงานและนำไปสู่การชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิส ดังแสดงในภาพที่ 19 ก และภาพที่ 20

2. Mitochondrial-apoptosome-mediated apoptotic intrinsic pathway (Intrinsic pathway) หรือวิถีจากภายในซึ่งมีไมโตคอนเดรียกับอะโพโทโซมเป็นตัวกลาง เกี่ยวข้องกับการปล่อย cytochrom C ออกมาจากไมโตคอนเดรียเนื่องจากการทำงานของ Bax ที่ไปจับ outer membrane ของไมโตคอนเดรียทำให้ permeability transition pore (PTP) เสียการควบคุมการเข้าออกของ ion ปล่อย ion จากcytosol เข้ามาข้างในทำให้ inner membrane potential ถูกรบกวนเมื่อมีการเสียสมดุลของ ion จะรบกวน electronchemical gradient ทำให้ PTP เปิดออกโดยมีการรั่วของกลุ่มโปรตีน apoptogenic factors เช่น cytochrome C, apoptosis-inducing factor (AIF) และ endonuclease G (Endo G) ออกมาทำให้ไมโตคอนเดรียบวมและ outer membrane เกิดรอยรั่ว จึงทำให้กลุ่มโปรตีนดังกล่าวถูกปล่อยออกมาจากชั้น inner membrane space หลั่งเข้าสู่ cytosol เมื่อ AIF และ Endo G ถูกปลดปล่อยออกมาจากไมโตคอนเดรียจะถูกส่งผ่านไปยังนิวเคลียสทำให้เกิด chromatin condensation และ DNA fragmentation ส่วน cytochrome C เมื่อออกมาสู่ cytosol จะรวมตัวกับ Apaf-1 และ pro caspase-9 เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า อะโพโทโซม (apoptosome) ดังแสดงในภาพที่ 19 ข โดยใช้พลังงานในรูป ATP ในการรักษาโครงสร้างให้เสถียร ซึ่ง caspase-9 จะกระตุ้นการทำงานของ effector caspase เช่น caspase-3 ให้ทำงานและนำไปสู่การชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิส ดังแสดงในภาพที่ 20



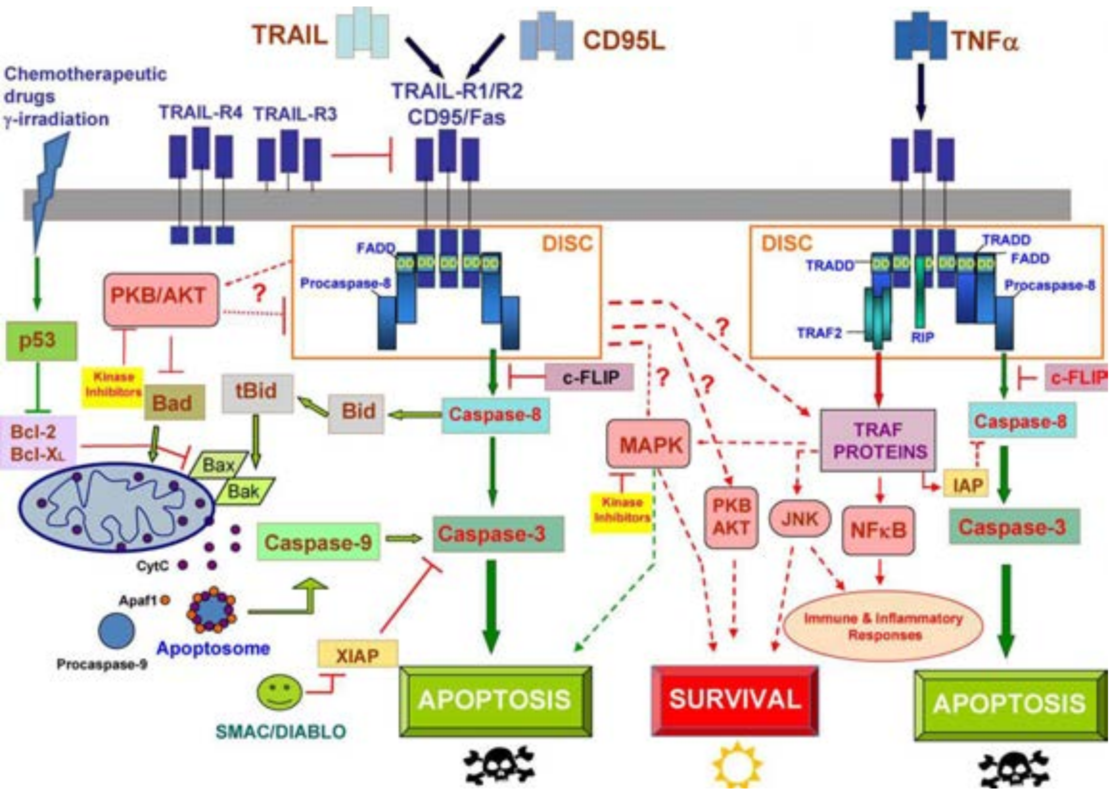
ก



ข

ภาพที่ 19 ก แสดงวิถีการเกิดอะโพโทซิสโดยผ่าน death receptor (Extrinsic pathway)

ข แสดงวิถีการเกิดอะโพโทซิสโดยผ่านไมโตคอนเดรีย (Intrinsic pathway) [93]



ภาพที่ 20 แสดงกลไกของการเกิดอะโพโทซิส (Apoptosis) [92]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. ตัวอย่างสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

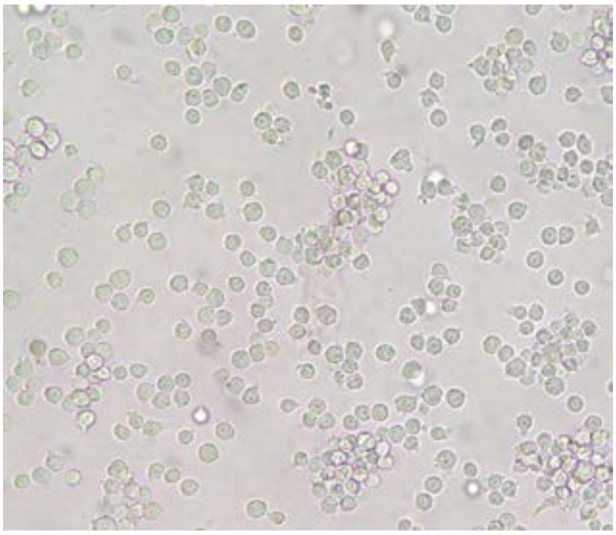
สมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดสอบ คือ พลูคาว จากอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน และทำการยืนยันชนิดของพลูคาวโดยหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Herbarium number 013515 (BCU))

ภาพที่ 21 พลูคาวที่ใช้ในการวิจัย

2. ตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบ

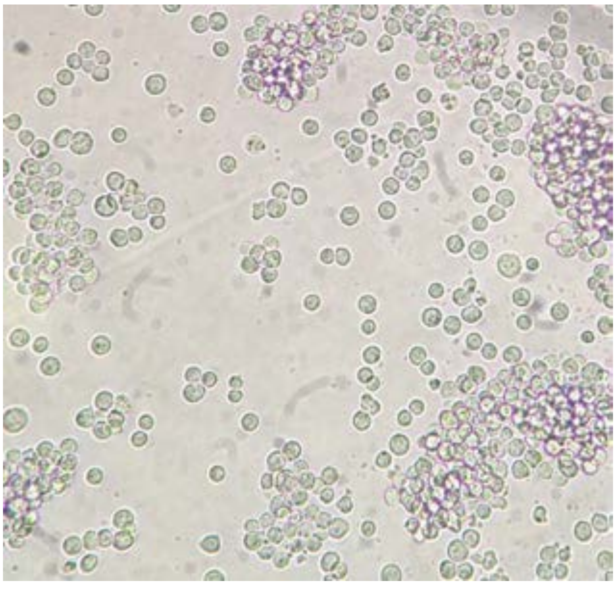
เพื่อให้ครอบคลุมโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างให้มากที่สุด ฉะนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด คือ

2.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat (human acute T cell leukemia)



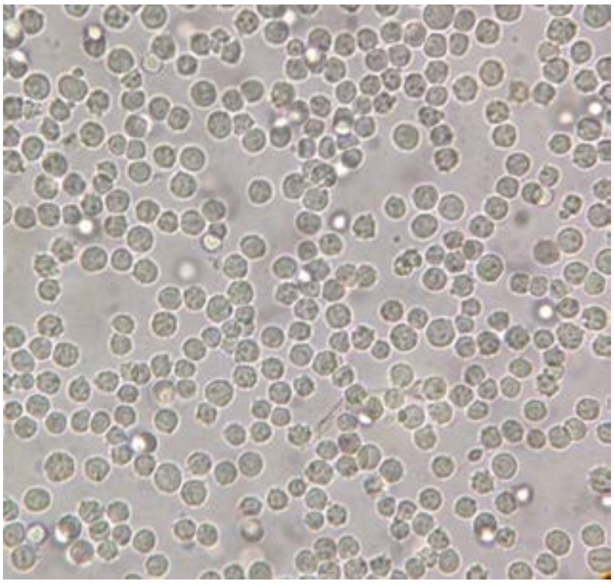
ภาพที่ 22 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat (200x)

2.2 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937 (human chronic myelogenous leukemia cell)



ภาพที่ 23 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง U937 (200x)

2.3 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562 (human chronic myelogenous leukemia cell)



ภาพที่ 24 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562 (200x)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

-20^{o}C freezer	Sanyo, ญี่ปุ่น
-80^{o}C deep freezer	ilshin Lab, เนเธอแลนด์
4^{o}C refrigerator	Mitsubishi, ญี่ปุ่น
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Autoclave	Tomy, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 µl	Gilson, ฝรั่งเศส
Autopipette 10-100 µl	Gilson, ฝรั่งเศส

Autopipette 100-1000 µl	Gilson, ฝรั่งเศส
Bio-Plex system	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Cell culture flask (25 cm^3)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Kokusan, ญี่ปุ่น
CO_2 incubator	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Differential counter	Modulus, สหรัฐอเมริกา
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Flow cytometer	BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา
Freeze dryer	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Invented microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow	Faster, อิตาลี
Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen tank	Air Liquide, ฝรั่งเศส
Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้
Multichannel pipette 5-50 µl	Biohit, ฟินแลนด์
pH meter	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์

Plate shaker	Desaga, เยอรมนี
Rotary evaporator	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Vacuum pump	GelmanSciences, สหรัฐอเมริกา
Volumetric flask (100, 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	Labnet, สหรัฐอเมริกา
Waterbath	Mgw Lauda, เยอรมนี
UV/VIS spectrophotometer	PG instruments, สหราชอาณาจักร

เครื่องแก้วและพลาสติก

6 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
24 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
Beaker (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Centrifuge tube (5, 14, 50 ml)	Falcon, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Cylinder (100, 1000 ml)	Witeg Diffico, เยอรมนี
Disposable Serological pipette (5, 10, 25 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Flask (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Glass bottles (100, 200, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี

Microtube 1.5 ml	Hycon, สหรัฐอเมริกา
Serological pipette (1, 5, 10, 25 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Tip (10, 20, 100, 200, 1000 μl)	Sorenson, สหรัฐอเมริกา
Volumetric flask (100, 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Aluminium chloride ($AlCl_3$)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Annexin V- Alexa 488/	
Propidium iodide (PI)	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Bio-Plex PRO magnetic cytokine	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
(8-Plex Panel)	
Bovine serum albumin (BSA)	Fisher,สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, เยอรมนี
Ethyl alcohol	Merck, เยอรมนี
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Human IL-6 ELISA kit	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Human TNF-α kit	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
In vitro toxicology assay kit (TOX2)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Isoquercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Leucoagglutinin PHA-L (PHA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
L-glutamine	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Penicillin/Streptomycin	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride (KCl)	Merck, เยอรมนี
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, เยอรมนี
Quercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Rutin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Roswell Park Memorial Institute medium-1640 (RPMI-medium 1640)	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride (NaCl)	Merck, เยอรมนี
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, เยอรมนี
Sodium nitrite ($NaNO_2$)	Merck, เยอรมนี
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, เยอรมนี
Tetramethylbenzidine	R&D diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Trizma base	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Trypan blue	The British Drug Houses, อังกฤษ

Tween20	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Vincristine	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

วิธีการวิจัย

1. การสกัดพลูคาว

1.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดพลูคาวโดยนำส่วนใบและลำต้นพลูคาวสดมาล้างให้สะอาด และผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนพลูคาวแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียดซึ่งจะได้ลักษณะดังภาพที่ 25 เพื่อที่จะนำมาทำการสกัดต่อไป

ภาพที่ 25 ลักษณะของพลูคาวที่ผ่านการอบแห้งและบดเพื่อเตรียมการสกัด

1.2 การสกัดพลูคาวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% (ethanolic extract) โดยทำการสกัดและดัดแปลงวิธีการบางส่วนจาก Ampasavate และคณะ [94] โดยมีวิธีการสกัดดังนี้

นำพลูคาวแห้งจำนวน 50 กรัม มาทำการแช่ลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิห้องจำนวน 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้สารสกัดที่มีลักษณะดังรูปที่ 26 จากนั้นนำไปทำการ evaporation ด้วยเครื่อง rotary evaporator ซึ่งเป็นเครื่องเตรียมสารให้เข้มข้น โดยใช้การกลั่นสารละลายที่อุณหภูมิต่ำและความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ

45 องศาเซลเซียส เพื่อทำการแยกเอาแอลกอฮอล์ออกจากสารสกัด แล้วจึงนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมที่จะทำการระเหิดให้แห้งต่อไป

ภาพที่ 26 ลักษณะของสารสกัดพลูคาวที่ผ่านการสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 3 วัน

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

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

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

2. การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์

การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพลูคาว จะทำการตรวจวัดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay

การตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์จะทำตามวิธีของ Kim และคณะ [95, 96] โดย aluminium chloride จะทำปฏิกิริยากับ C-4 keto group และ C-3 หรือ C-5 hydroxyl group ของฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavones และ flavonols เกิดเป็นสารประกอบ complex ที่ทนต่อกรดที่มีสีเขียว และ aluminium chloride จะทำปฏิกิริยากับ ortho-dihydroxyl group ในวงแหวน A- หรือ B- ของฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสารประกอบ complex ที่ไม่ทนต่อกรด ที่มีสีเขียว ที่จะแปรผันตามปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัด โดยการตรวจวิธีนี้ใช้ rutin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonol เป็นสารมาตรฐาน ค่าปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะรายงานในหน่วย µg เมื่อเทียบกับ rutin ต่อน้ำหนักของสารสกัดพลูคาวแห้ง (µg RE/mg dried H.*cordata* extract) และหน่วย mg เมื่อเทียบกับ rutin ต่อน้ำหนักของพลูคาวแห้ง (mg RE/g dried H.*cordata*)

2.1 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 rutin ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 และ 7.8125 µg/ml

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

ตารางที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids) ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric assay [95]

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

3. การเตรียมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล

3.1 นำสารสกัดแห้งจากพลูคาว 50 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 500 mg/ml ทำการเจือจางต่อไปด้วย RPMI-1640 ในอัตราส่วนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25 และ 78.125 µg/ml โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 1%

3.2 นำสารฟลาโวนอล คือ quercetin, rutin และ isoquercetin 10 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml ทำการเจือจางต่อไปด้วย RPMI-1640 ในอัตราส่วนเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 μg/ml โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 1%

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat (Human acute T cell leukemia) (ATCC TIB-152), K562 (Human erythromyeloblastoid leukemia cell line)(ATCC CCL-243) และ U937 (Human leukemic monocyte lymphoma cell line) (ATCC CRL-1593.2) ในอาหารเพาะเลี้ยง RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) medium โดยทำการเติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ที่ heat inactivated แล้ว (โดยการบ่ม FBS ที่ละลายแล้วที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 นาที) จากนั้นเติม 1% L-glutamine, ยาปฏิชีวนะ penicillin G 100 units/ml และ streptomycin 100 μg/ml ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ CO_2 โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C

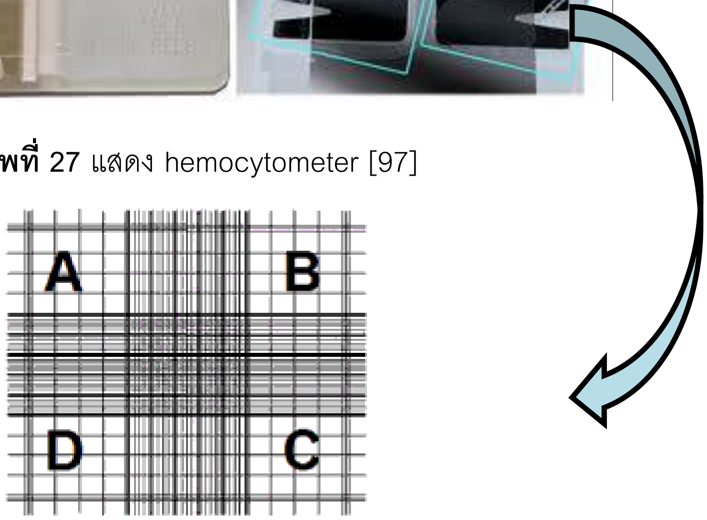
4.2 การเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงควรเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อจะทำการทดสอบในขั้นตอนต่างๆต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และตรวจดูเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion method ซึ่งเซลล์ที่จะนำไปใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่างๆต้องมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

4.3 การนับจำนวนเซลล์ โดยการนำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง (cell suspension) มาใส่ลงใน hemocytometer ข้างละ 10 μl ดังภาพที่ 27 จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า นับเซลล์จากช่อง A, B, C และ D ดังภาพที่ 28 (ทำทั้งสองด้านรวมทั้งหมดนับ 8 ช่อง) นำมาหาค่าเฉลี่ยต่อ 1ช่อง แล้วคำนวณเพื่อหาปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการตรวจนับการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion method อาศัยหลักการ คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่แข็งแรงจึงไม่ยอมให้สิ่งแปลกปลอมหรือสีย้อม เช่น trypan blue ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วเยื่อหุ้มเซลล์จะเสียสภาพหรือถูกทำลายไปทำให้สีย้อมซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทำให้แยก

เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ซึ่งมีลักษณะเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม วาวใส ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะติดสีน้ำเงิน การคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอด (% cell viability) สามารถคำนวณได้จากสูตร

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

ภาพที่ 27 แสดง hemocytometer [97]



ภาพที่ 28 ลักษณะตารางของ hemocytometer [97]

5. **การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล**

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดจากพลูคาวและสารฟลาโวนอล จะทำการทดสอบ 2 วิธี คือ วิธี XTT assay และ วิธี microscopic analysis

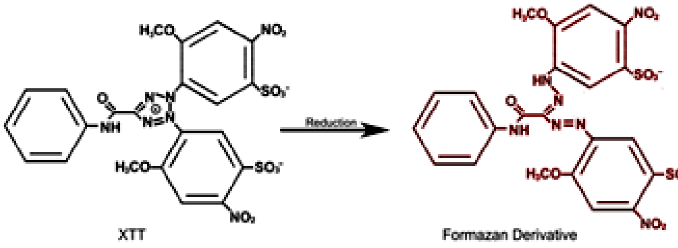
5.1การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการแบ่งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดจากพลูคาว และสารฟลาโวนอล โดยวิธี XTT assay

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี XTT assay จะทำการทดสอบและดัดแปลงวิธีของ Chiang และคณะ[99] อาศัยหลักการทำให้เกิดสี (colorimetric method) ซึ่งเป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสีโดยสารประกอบ XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) ซึ่งมีสีเหลือง จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ภายในไมโตคอนเดรียของเซลล์ คือ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่ยังมีชีวิต เปลี่ยน tetrazolium ของ XTT ให้เป็นผลผลิต formazan สีส้มที่ละลายน้ำ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 450 และ 690 nm โดยงานวิจัยในครั้งนี้ใช้น้ำยา In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based (Sigma, สหรัฐอเมริกา) ในการตรวจสอบโดยมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

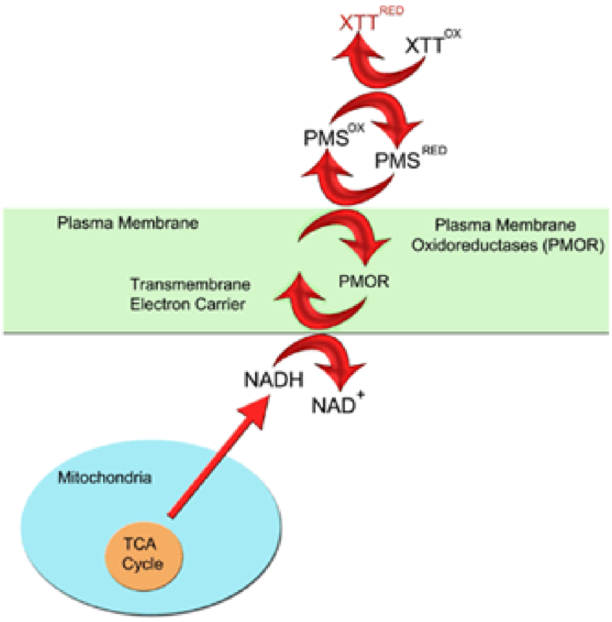
ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 well-plate) โดยการใส่เซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณ $5x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 90 µl จากนั้นเติมสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.1 และ 3.2) ลงไปหลุมละ 10 µl โดยมีกลุ่มควบคุม คือ RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine เป็น positive control จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลาทำการเติม XTT working solution จำนวน 20 µl ลงไปในแต่ละหลุมและนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 และ 690 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % cell viability

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Mean absorbance test}}{\text{Mean absorbance control}} \times 100$$

จากนั้นหาค่า IC_{50} (half maximal inhibitor) จากกราฟ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง



ภาพที่ 29 แสดงการ reduction XTT ให้กลายเป็น formazan [99]



ภาพที่ 30 แสดงขั้นตอนการ reduction XTT ด้วยเอนไซม์ภายในเซลล์ [99]

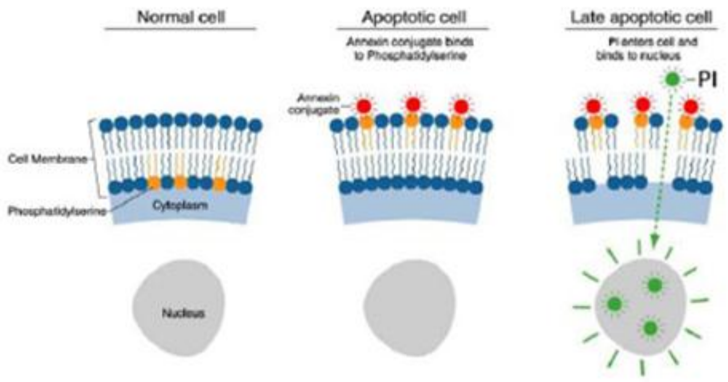
5.2 การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการแบ่งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดจากพลูคาว และสารฟลาโวนอล ด้วยวิธี microscopic analysis ซึ่งเป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยดูปริมาณของเซลล์ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ที่สามารถมองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ โดยมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

นำเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเซลล์แล้ว มาทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 well-plate) โดยเตรียมเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใส่เซลล์ในแต่ละหลุม จำนวน 90 µl จากนั้นเติมสารสกัดพลูคาวที่ความเข้มข้น 3000 µg/ml และสารฟลาโวนอลที่ความเข้มข้น 500 µg/ml ลงไป 10 µl ในแต่ละหลุม โดยมีกลุ่มควบคุม คือ RPMI-

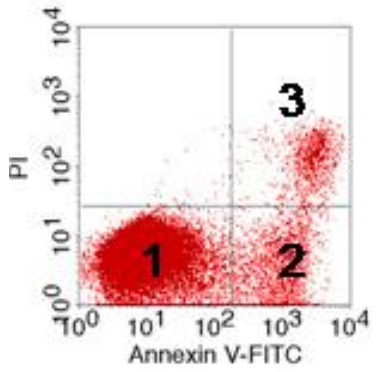
1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine เป็น positive control จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 และ 2 วัน เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100x และ 200x เพื่อดูลักษณะความแตกต่างในด้านปริมาณและลักษณะรูปร่างของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

6. การทดสอบฤทธิ์ในการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสของสารสกัดหยาบจากพลูคาว, quercetin, isoquercetin และ rutin โดยการวัดปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

การตรวจสอบปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เพื่อตรวจวัดการเกิดอะโพโทซิสของเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล 3 ชนิด คือ quercetin, rutin และ isoquercetin จะใช้วิธีย้อมสี Annexin V และ Propidium iodide (PI) โดยอาศัยหลักการ คือ เซลล์ระยะเริ่มเกิดอะโพโทซิส (early apoptosis) จะมีการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาเมมเบรนโดย phosphatidylserine (PS) ซึ่งปกติอยู่ด้านในจะเคลื่อนที่ออกมาที่ผิวด้านนอกทำให้ย้อมติด Annexin V ที่มีคุณสมบัติสามารถจับกับประจุลบของ PS ได้ ในขณะที่เซลล์ในระยะนี้จะไม่ติดสีย้อม propidium iodide เนื่องจากยังไม่สามารถผ่านซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 31 แต่เมื่อเซลล์ตายในระยะ late apoptosis ซึ่งระยะนี้จะเกิดพลาสมาเมมเบรนจะสูญเสียคุณสมบัติ และเกิด chromatin condensation ดังนั้นการจะตรวจสอบการตายแบบอะโพโทซิสด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จึงใช้ Annexin V ที่เชื่อมกับสารเรืองแสง (fluorescein) เช่น Alexa 488 หรือ FITC ร่วมกับ propidium iodide (PI) ซึ่งสามารถย้อมติดดีเอ็นเอ จะทำให้สามารถแยกเซลล์ออกเป็นกลุ่มๆได้ คือ กลุ่มเซลล์มีชีวิตอยู่ในช่องที่ 1 (Annexin V-/ PI-), กลุ่ม early apoptotic cell อยู่ในช่องที่ 2 (Annexin V+/ PI-) และกลุ่ม late apoptotic cell อยู่ในช่องที่ 3 (Annexin V+/ PI+) ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 31 ลักษณะของผิวเซลล์เมื่ออยู่ในระยะ early และ late apoptosis [93]



ภาพที่ 32 แสดงบริเวณของเซลล์ในแต่ละระยะ เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ [93]

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24 well-plate) โดยนำเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเซลล์แล้วปรับให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วใส่เซลล์ลงไปในแต่ละหลุม 900 µl จากนั้นเติมสารสกัดพลูคาวที่ความเข้มข้น 3000 µg/ml และ 2500 µg/ml (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) และสารฟลาโวนอลคือ quercetin,rutin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) ลงไป 100 µl ในแต่ละหลุม โดยมีกลุ่มควบคุมคือ RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO เป็น negative control และ vincristine 10 ng/ml เป็น positive control จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 12,24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดเซลล์ใส่ในหลอดปั่นล้างด้วย cold PBS 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้ว resuspend ด้วย 1X binding buffer 100 µl แล้วจึงเติม Annexin V ที่เชื่อมกับสารเรืองแสง

Alexa 488 (Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) ปริมาณ 5 µl และ PI 1µl ลงไปในแต่ละหลอดแล้วค่อยๆ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาเติม 1X binding buffer อีกหลอดละ 200 µl จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (FACSCalibur;Becton Dickinson Bioscience,สหรัฐอเมริกา) คำนวณเปอร์เซนต์ของเซลล์แต่ละระยะด้วยโปรแกรม CellQuest (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา)

7. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาว, quercetin, isoquercetin **และ** rutin **ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง**

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทำโดยการทดสอบ 2 วิธี คือ วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และวิธี bead-based multiplex sandwich immunoassay (Bio-plex)

7.1 การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA เป็นการตรวจวัดปริมาณไซโคไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยหลักการจับกันของ Ag-Ab complex โดยทำการ coat บริเวณก้นหลุมของ ELISA plate ด้วย capture antibody แล้วจึงเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปั่นเก็บได้ (supernatant) เพื่อให้ antibody จับกับ antigen ซึ่งก็คือไซโตไคน์ที่เซลล์หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงเติม antibody อีกตัวหนึ่งคือ detection antibody ที่มีการติดฉลากด้วย biotin เพื่อจะได้จับกับ antigen คือไซโตไคน์ที่เราต้องการวัดปริมาณ แล้วจึงเติม streptavidin ที่ conjugated กับ horseradish peroxidase (HRP) เพื่อต้องการให้ streptavidin จับกับ biotin ที่เติมไปในขั้นตอนก่อนนี้ สุดท้ายทำการเติม substrate เพื่อให้ HRP ทำปฏิกิริยาและมีสีเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ELISA plate reader เพื่อคำนวณหาปริมาณของไซโตไคน์ ในการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA ในการวิจัยครั้งนี้ทำการตรวจวัดไซโตไคน์ IL-6 และ TNF-α

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24 well-plate) นำเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเซลล์แล้ว โดยเตรียมเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วใส่เซลล์ลงไปในแต่ละหลุม 900 µl จากนั้นเติมสารสกัดพลูคาวที่ความเข้มข้น 3000 µg/ml (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) และสารฟลาโวนอลคือ quercetin,rutin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) ลงไป 100 µl ในแต่ละหลุม จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมากระตุ้นด้วย PMA 12.5 ng/ml และ PHA 250 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยง Jurkat และ K562 ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยง U937 นำมากระตุ้นด้วย LPS 1µg/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาสำหรับการกระตุ้นเซลล์แล้วนำมาปั่นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) โดยดูดใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,200 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง microcentrifuge จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 °C จนกว่าจะทำการทดสอบ ELISA

เมื่อจะทำการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA ต้องทำการ coat บริเวณก้นหลุมของ ELISA plate ด้วย capture antibody เป็นเวลา 1 คืนก่อนทำการตรวจ เมื่อครบกำหนดเวลานำ ELISA plate มาล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง จากนั้นทำการเติมสารมาตรฐานหรือเติม supernatant ที่เก็บไว้ลงไป 100 µl ในแต่ละหลุม แล้วจึงนำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วจึงเติม detection antibody 100 µl ลงไปในแต่ละหลุม แล้วนำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วจึงเติม streptavidin-HRP 100 µl ลงไปในแต่ละหลุมแล้วจึงนำไปวางบน plate shaker เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบเวลานำออกมาล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง แล้วเติม substrate ลงไปหลุมละ 100 µl นำไปวางบน plate shaker อีกครั้งเป็นเวลา 20นาที โดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution (2N H_2SO_4) ลงไปหลุมละ 50 µl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 nm คำนวณค่าปริมาณของไซโคไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยกราฟมาตรฐาน

7.2 การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี multiplex (Bio-plex)

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex เป็นการตรวจวัดปริมาณไซโคไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยหลักการ bead-based multiplex sandwich immunoassay ซึ่งมีข้อดีกว่าวิธี ELISA คือ สามารถตรวจวัดไซโตไคน์ได้หลายชนิดภายในครั้งเดียว ซึ่งในขั้นตอนการ coat บริเวณก้นหลุมของ plate ด้วย capture antibody นั้นจะทำการ coat ติดกับ bead ที่มีสีแดงของสี fluorescene และสีของ inflared ซึ่งจะมีอัตราส่วนของสีทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของไซโตไคน์ โดย bead ที่ coat ไว้ด้วย capture antibody นั้นจะจับกันอย่างจำเพาะกับไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการปั่นแยกเก็บส่วนใส (supernatant) และเมื่อใช้ antibody อีกตัวหนึ่งคือ detection antibody ที่เชื่อมต่อกับ biotin มาจับกับไซโตไคน์อีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงเติม streptavidin ที่เชื่อมต่อกับ phycoerythrin (PE) เพื่อให้จับกับ biotin แล้วทำการอ่านค่าโดยการวัดสีแดงของสี fluorescene และสี infrared เพื่อเป็นการแยกชนิดของไซโตไคน์ และตรวจวัดสีของ PE เพื่อวัดปริมาณของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวัดไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-plex จำนวนทั้งสิ้น 8 ไซโตไคน์ คือ IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24 well-plate) นำเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเซลล์แล้ว โดยเตรียมเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วใส่เซลล์ลงไปในแต่ละหลุม 900 µl จากนั้นเติมสารสกัดพลูคาวที่ความเข้มข้น 3000 µg/ml (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) และสารฟลาโวนอลคือ quercetin,rutin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC_{50}) ลงไป 100 µl ในแต่ละหลุม จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมากระตุ้นด้วย PMA 12.5 ng/ml และ PHA 205 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยง Jurkat และ K562 ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยง U937 นำมากระตุ้นด้วย LPS 1µg/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาสำหรับการกระตุ้นเซลล์แล้วนำมาปั่นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) โดยดูดใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,200

รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง microcentrifuge จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 °C จนกว่าจะทำการทดสอบ

ในการทำการวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex จะต้องทำการ prewet filter plate เพื่อให้บริเวณ filter ที่ก้นหลุมเปียกพร้อมที่จะทำการทดสอบด้วย assay buffer ลงไปหลุมละ 100 μl แล้วทำการ filter เอา assay buffer ออกจาก plate จากนั้นจึงเติมเม็ด bead ที่ทำการ coat ด้วย antibody ต่อ cytokines ชนิดต่างๆลงไปหลุมละ 50 μl และนำไป incubate โดยนำไปวางบน shaker plate เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาทำการ filter wash ด้วย wash buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 100 μl และทำการเติมสารมาตรฐานหรือ supernatant ที่เก็บไว้ลงไปหลุมละ 50 μl แล้วจึงทำการ seal plate และปิดทับด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้โดนแสงแล้วจึงนำไปวางบน plate shaker ที่ความเร็วรอบ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบเวลาปรับความเร็วรอบเป็น 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 100 μl แล้วจึงเติม detection antibody ลงไป 25 μl ในแต่ละหลุม และทำการ seal plate และปิดทับด้วยกระดาษฟอยด์เพื่อไม่ให้โดนแสงแล้วจึงนำไปวางบน plate shaker ที่ความเร็วรอบ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบเวลาปรับความเร็วรอบเป็น 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 100 μl แล้วจึงเติม streptavidin-PE ลงไป 50 μl ในแต่ละหลุมจากนั้น ทำการ seal plate และปิดทับด้วยกระดาษฟอยด์เพื่อไม่ให้โดนแสงแล้วจึงนำไปวางบน plate shaker ที่ความเร็วรอบ 1100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบเวลาปรับความเร็วรอบเป็น 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 100 μl จากนั้นทำการเติม assay buffer ลงไป 125 μl ในแต่ละหลุมแล้วทำการ seal plate อีกครั้งหนึ่งแล้วนำไปวางบน plate shaker ที่ปรับความเร็วรอบเป็น 1100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงนำแผ่น seal ออก และนำไปวัดด้วยเครื่อง Bio-plex ในทันที

การวิเคราะห์ข้อมูล

1.การทดสอบปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงของสารสกัดจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลทั้ง 3 ชนิด คือ quercetin, rutin และ isoquercetin โดยวิธี XTT assay จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM)

2.การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM) และทำการทดสอบทางสถิติ โดยคำนวณหาความแตกต่างกันระหว่างค่าปริมาณของไซโตไคน์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับค่าปริมาณของไซโตไคน์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล ด้วยสถิติ one-way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (p<0.05)

3.การตรวจสอบปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เพื่อตรวจวัดการเกิดอะโพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงจะทำการทดสอบทางสถิติโดยคำนวณหาความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ในกลุ่มควบคุม คือ negative control และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล ด้วยสถิติ one-way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (p<0.05)

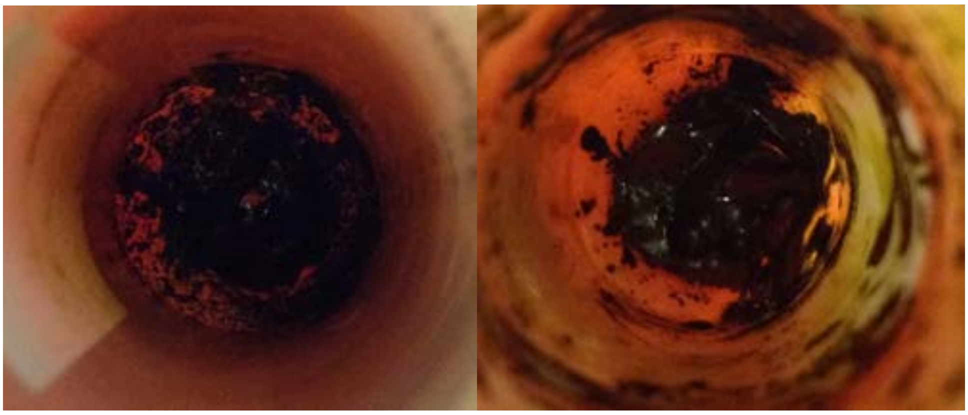
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1.ผลของสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากพลูคาว

ลักษณะของสารสกัดพลูคาวเมื่อทำการบ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จะได้สารสกัดลักษณะเหนียวหนืดมีสีเขียวเข้ม ดังภาพที่ 33 ปริมาณของสารสกัดหยาบทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 5.14 กรัม เมื่อคำนวณหาปริมาณ % yield ได้เท่ากับ 10.28%



ภาพที่ 33 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วทำการระเหิดแห้ง

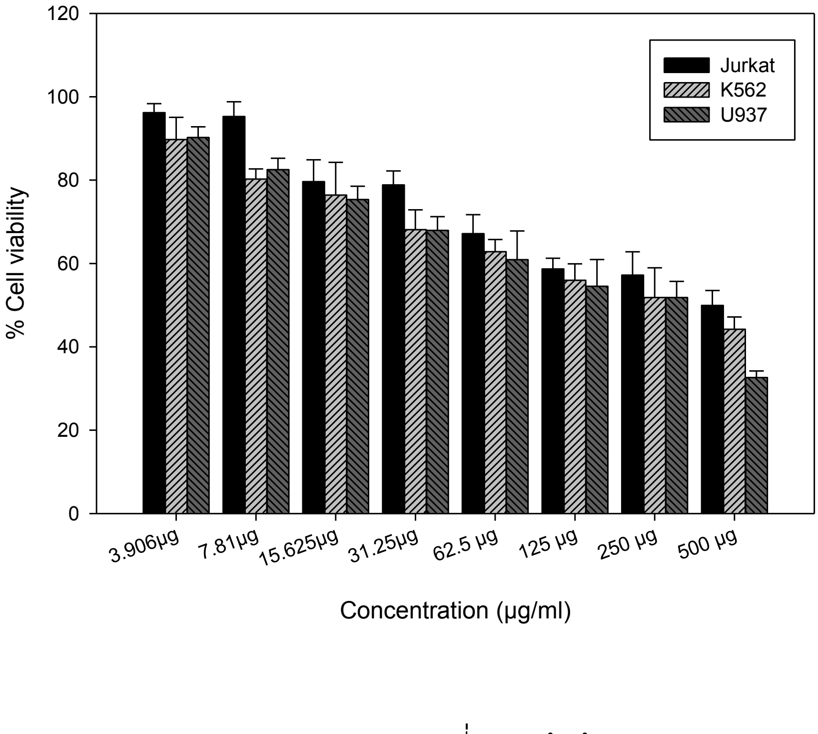
2.ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบ

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 1326.74 ± 45.06 µg RE/g dried *H.cordata* extract หรือเท่ากับ 258.12 ± 8.78 mg RE/g dried *H.cordata*

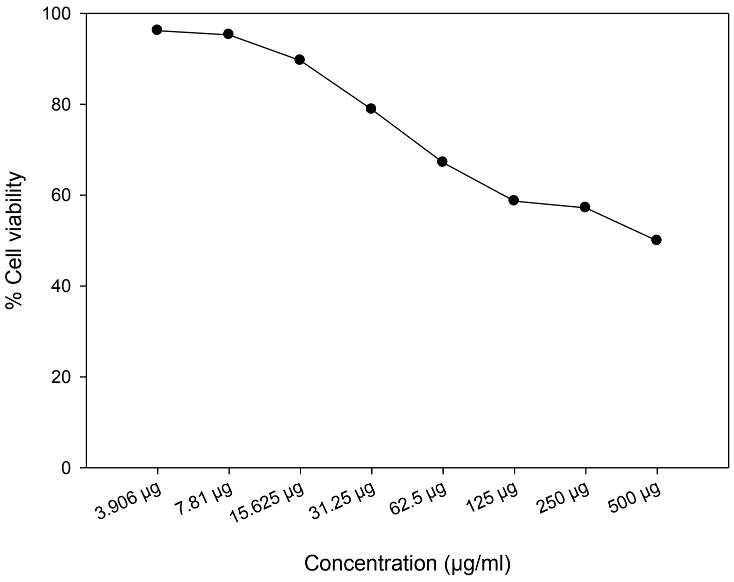
3.ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล

3.1ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลด้วยวิธี XTT assay

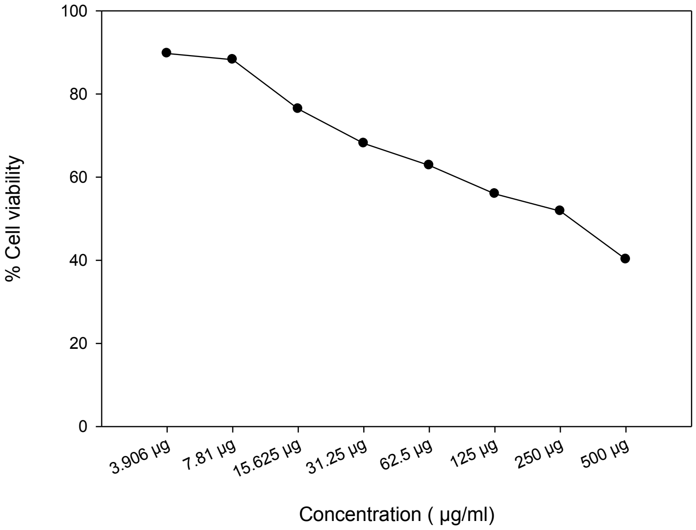
จากการทดสอบเซลล์ Jurkat, K562 และ U937 ด้วยสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอลทั้ง 3 ชนิด คือ quercetin, rutin และ isoquercetin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (negative control) และเซลล์ที่รับยา vincristine (positive control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา และนำเซลล์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี XTT assay แล้วจึงคำนวณค่า % cell viability เพื่อที่จะสร้างกราฟและหาค่า IC_{50} โดยกราฟที่ได้มีลักษณะดังภาพที่ 34- 49



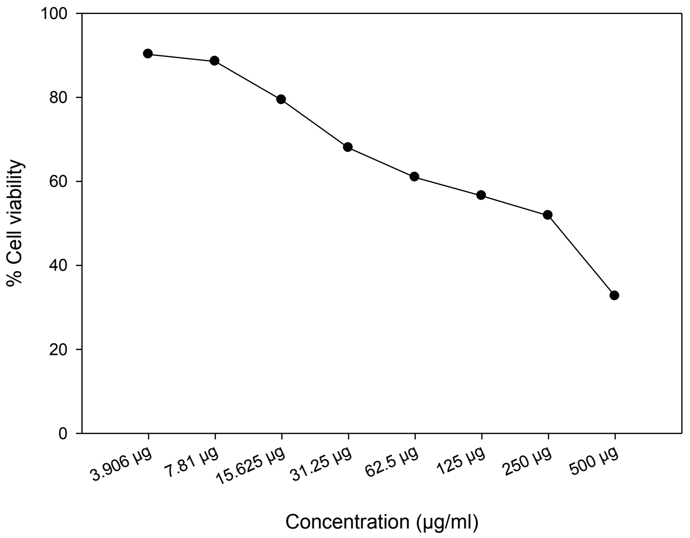
ภาพที่ 34 กราฟระหว่างสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ Jurkat, K562 และ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากพลูคาวในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



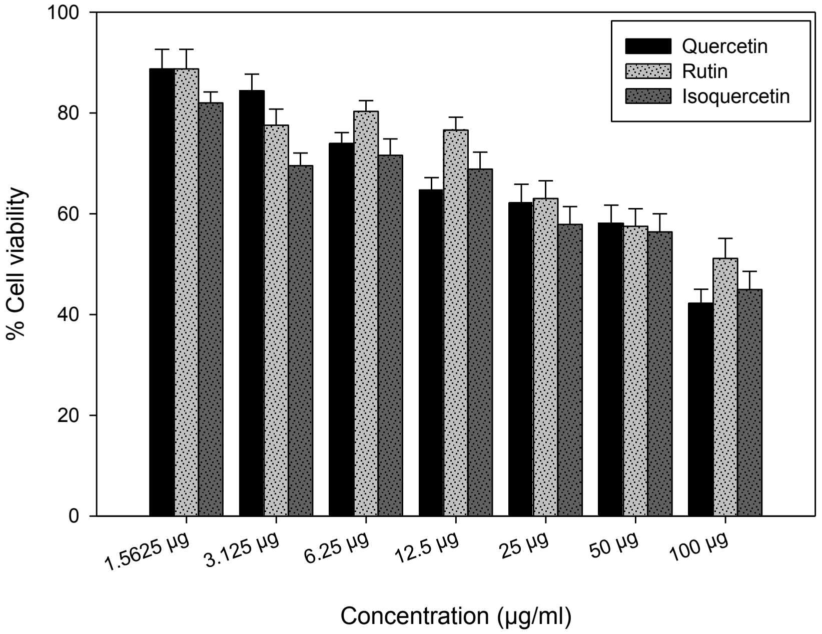
ภาพที่ 35 กราฟระหว่างสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากพลูคาวในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



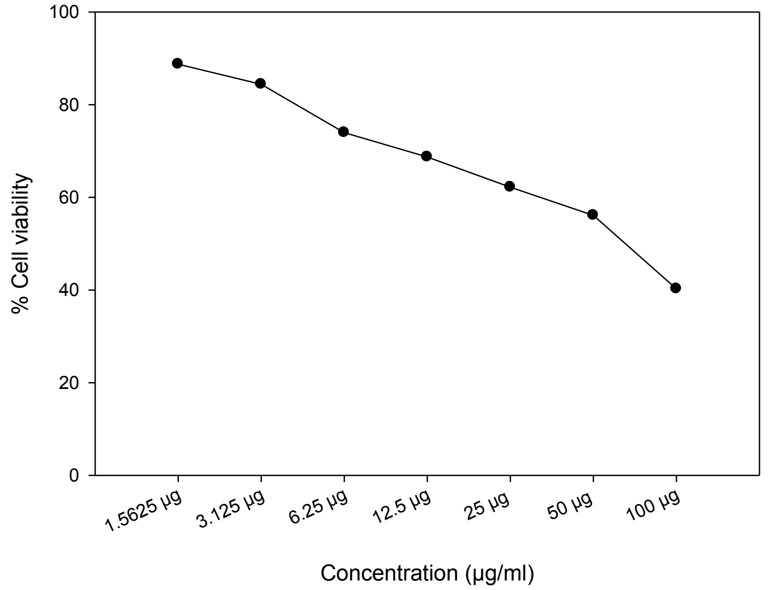
ภาพที่ 36 กราฟระหว่างสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ K562 เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากพลูคาวในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



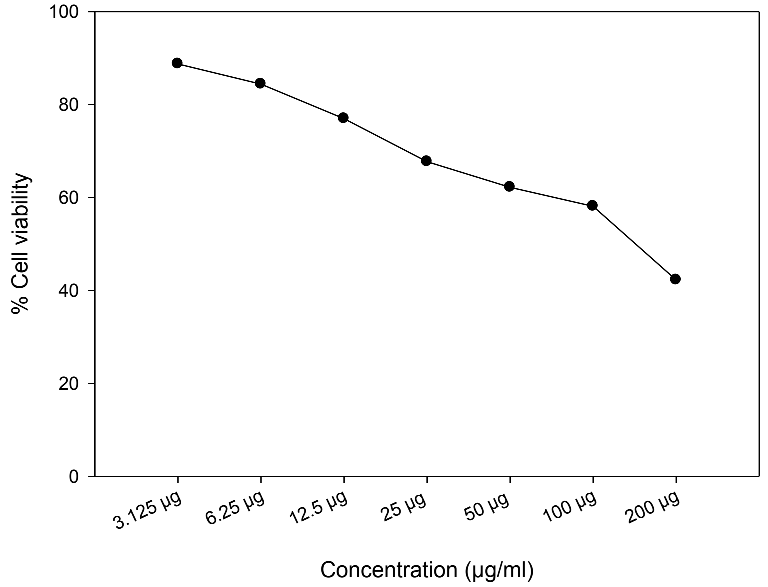
ภาพที่ 37 กราฟระหว่างสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากพลูคาวในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



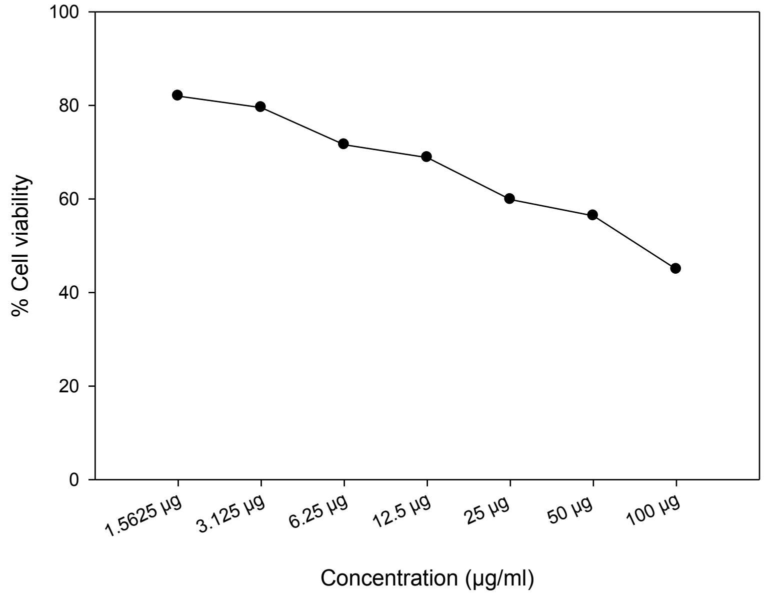
ภาพที่ 38 กราฟระหว่างสารฟลาโวนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทำการทดสอบผลของสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



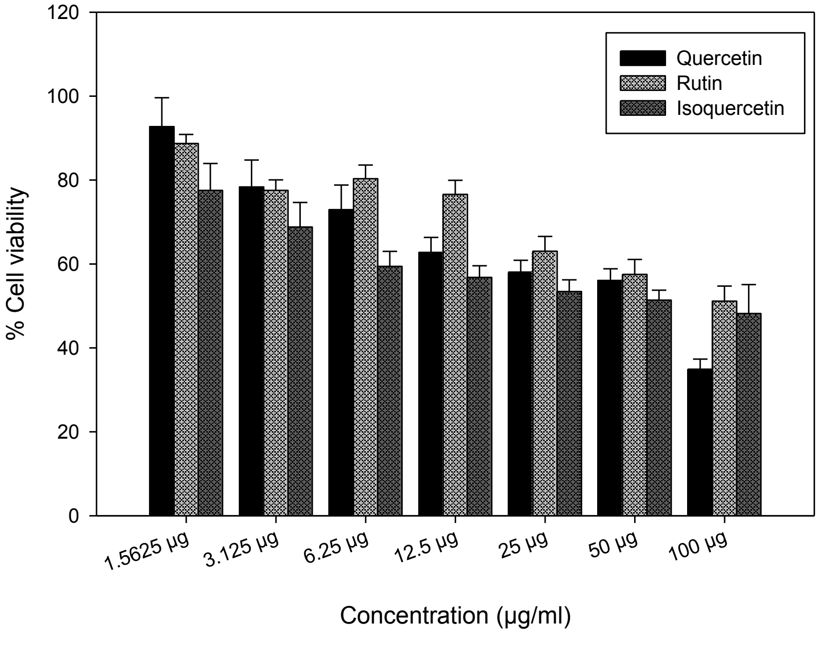
ภาพที่ 39 กราฟระหว่างสาร quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทำการทดสอบผลของสาร quercetin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



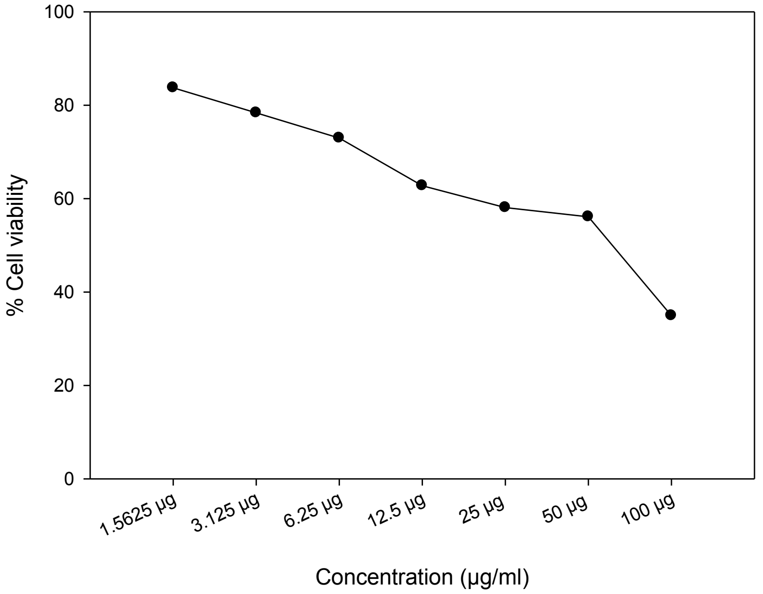
ภาพที่ 40 กราฟระหว่างสาร rutin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทำการทดสอบผลของสาร rutin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



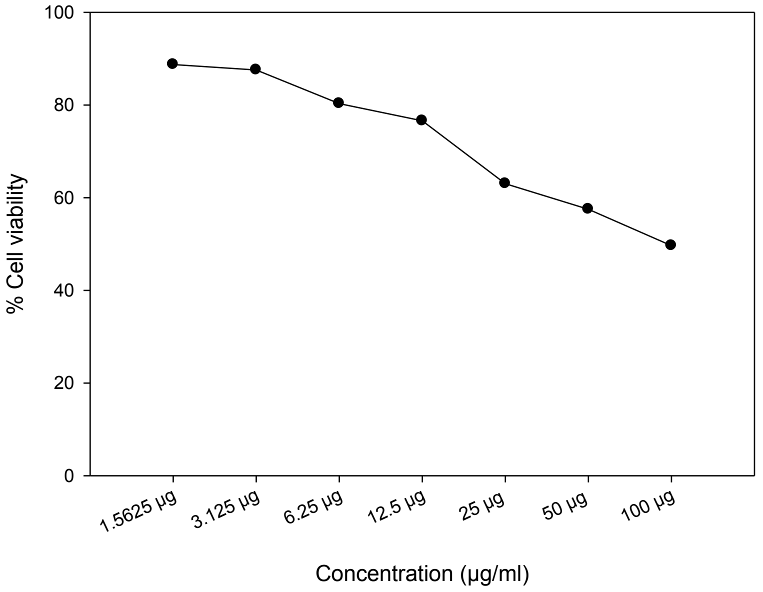
ภาพที่ 41 กราฟระหว่างสาร isoquercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทำการทดสอบผลของสาร isoquercetin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



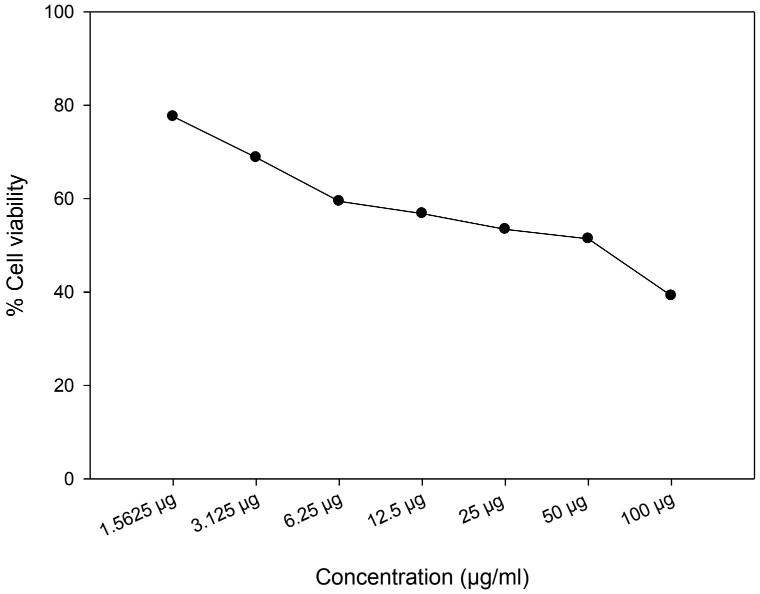
ภาพที่ 42 กราฟระหว่างสารฟลาโวนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ K562 เมื่อทำการทดสอบผลของสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



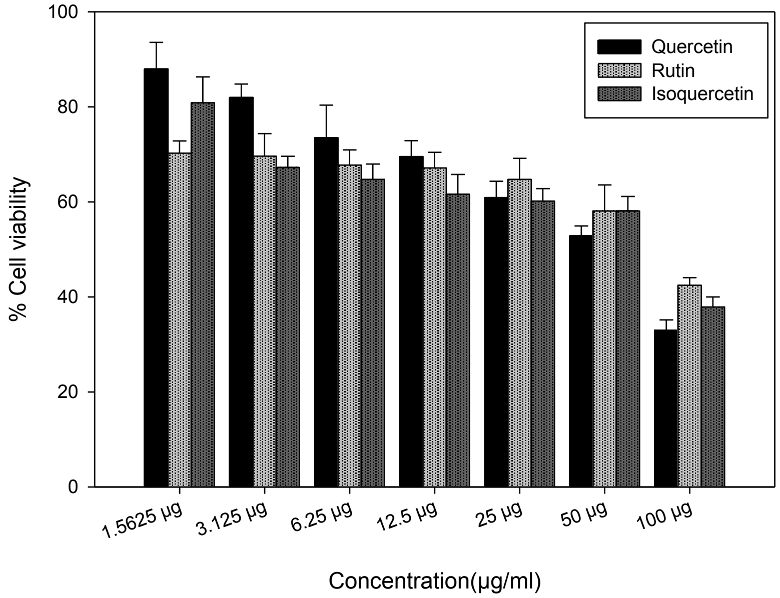
ภาพที่ 43 กราฟระหว่างสาร quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ K562 เมื่อทำการทดสอบผลของสาร quercetin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



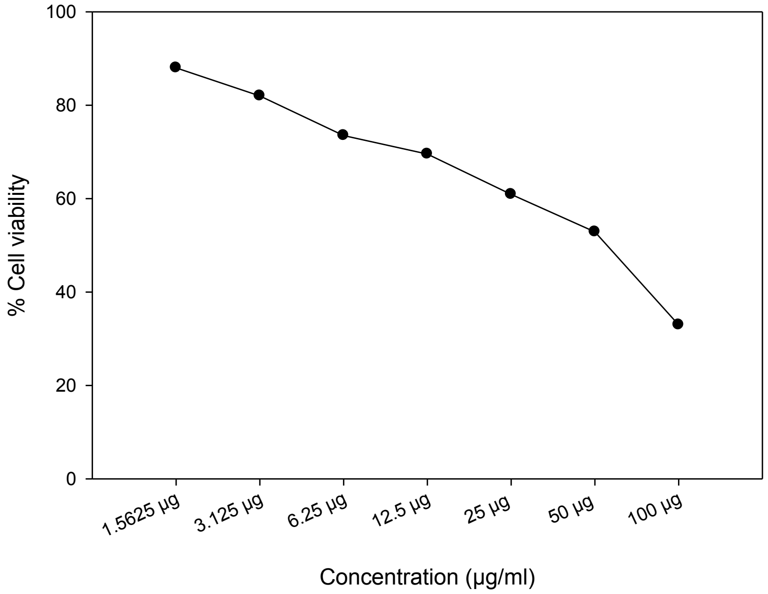
ภาพที่ 44 กราฟระหว่างสาร rutin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ K562 เมื่อทำการทดสอบผลของสาร rutin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



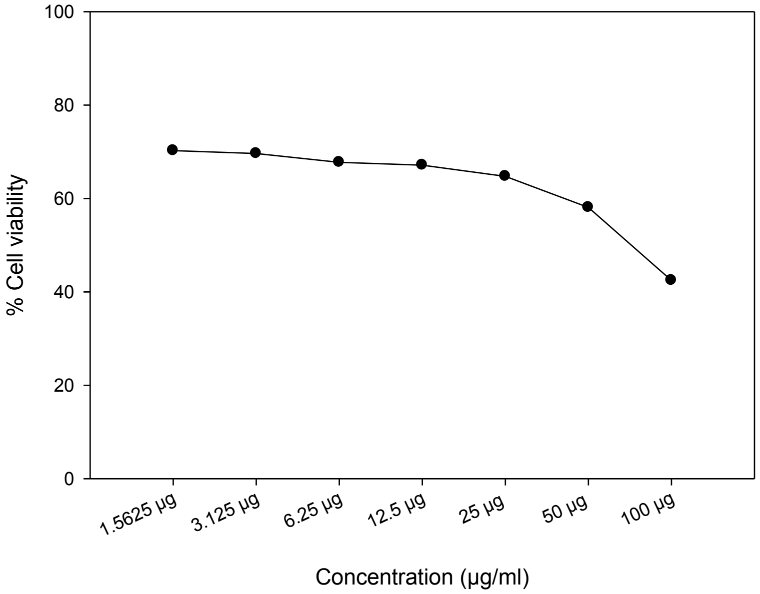
ภาพที่ 45 กราฟระหว่างสาร isoquercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ K562 เมื่อทำการทดสอบผลของสาร isoquercetin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



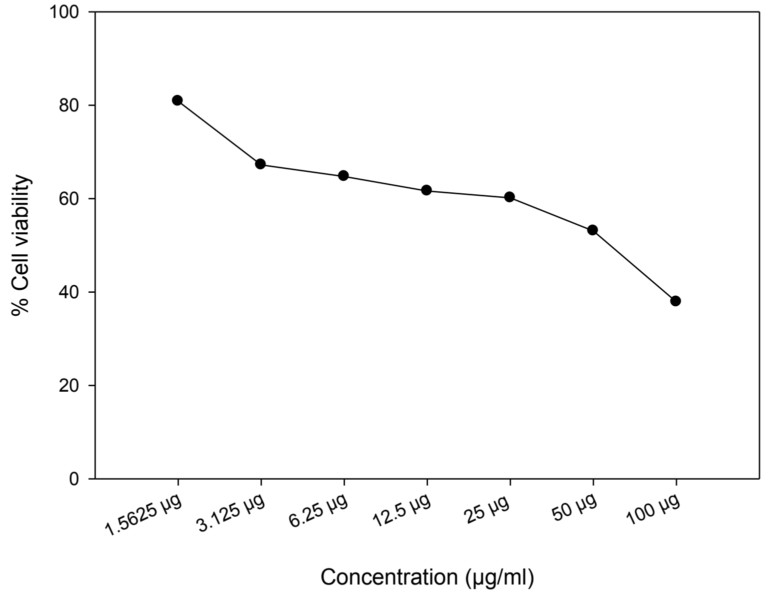
ภาพที่ 46 กราฟระหว่างสารฟลาโวนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และ % cell viability ของเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



ภาพที่ 47 กราฟระหว่างสาร quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆและ % cell viability ของเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสาร quercetin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



ภาพที่ 48 กราฟระหว่างสาร rutin ที่ความเข้มข้นต่างๆและ % cell viability ของเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสาร rutin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์



ภาพที่ 49 กราฟระหว่างสาร isoquercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆและ % cell viability ของเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบผลของสาร isoquercetin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์

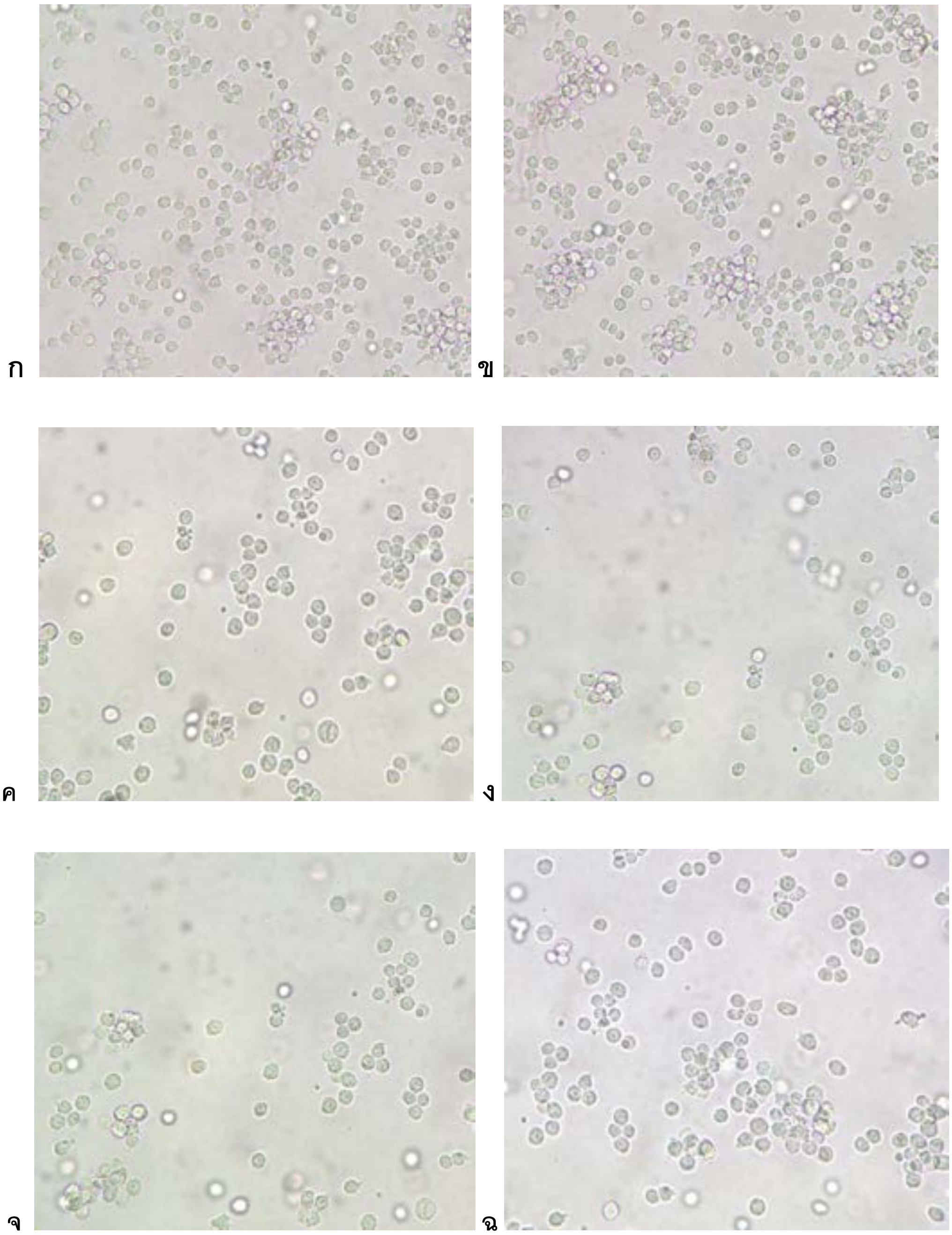
เมื่อได้กราฟจะทำการอ่านค่าจากกราฟ โดยจะอ่านจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cell viability) ก็จะได้ค่าของ IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอล ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลในเซลล์ชนิดต่างๆ

	ค่า IC_{50} (µg/ml)		
	Jurkat	K562	U937
Quercetin	71.34	65.54	61.48
Rutin	114.16	98.56	91.97
Isoquercetin	79.35	71.14	66.53
สารสกัดพลูคาว	469.01	414.35	408.24

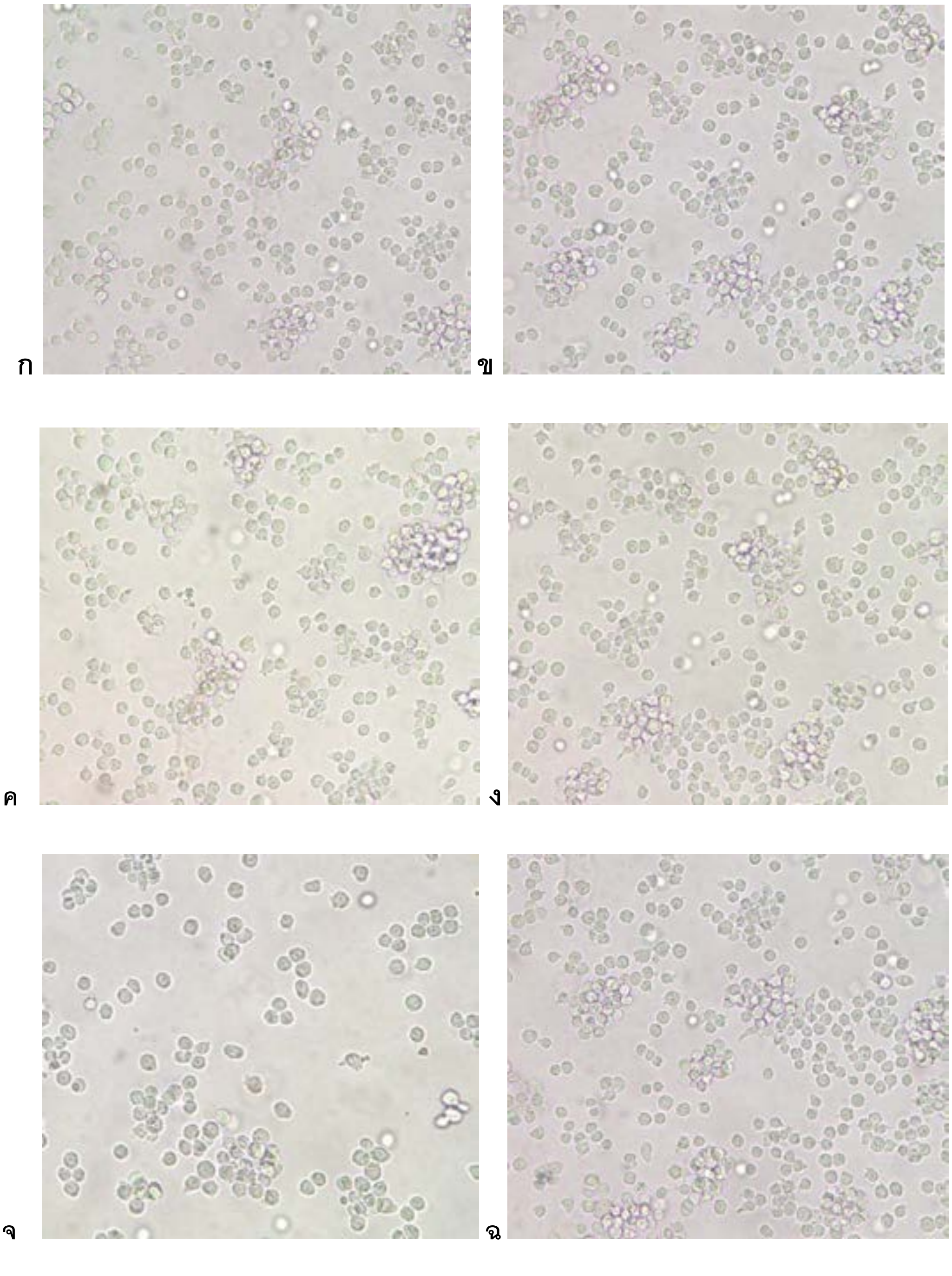
3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลด้วยวิธี microscopic analysis

จากการทดสอบเซลล์ Jurkat, K562 และ U937 ด้วยสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอล ทั้ง 3 ชนิด คือ quercetin, rutin และ isoquercetin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ(negative control) และเซลล์ที่ได้รับยา vincristine (positive control) เป็นเวลา 24 และ 48ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา และนำเซลล์ไปทำการตรวจดูเซลล์ด้วยวิธี microscopic analysis พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม คือ เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (negative control) จะมีปริมาณของเซลล์เป็นจำนวนมาก ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับสาร vincristine (positive control) จะมีปริมาณของเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดทั้งในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์เมื่อได้รับสารสกัดพลูคาว และสารฟลาโวนอล จะมีการลดลงของจำนวนเซลล์เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง มากกว่าเซลล์ที่ได้รับสารในเวลา 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 50-57



ภาพที่ 50 ลักษณะของเซลล์ Jurkat ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.
ค. vincristine (positive control) 24 ชม.
ง. vincristine (positive control) 48 ชม.
จ. รับสาร quercetin 50 μg/ml 24 ชม.
ฉ. รับสาร quercetin 50 μg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 51 ลักษณะของเซลล์ Jurkat ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.

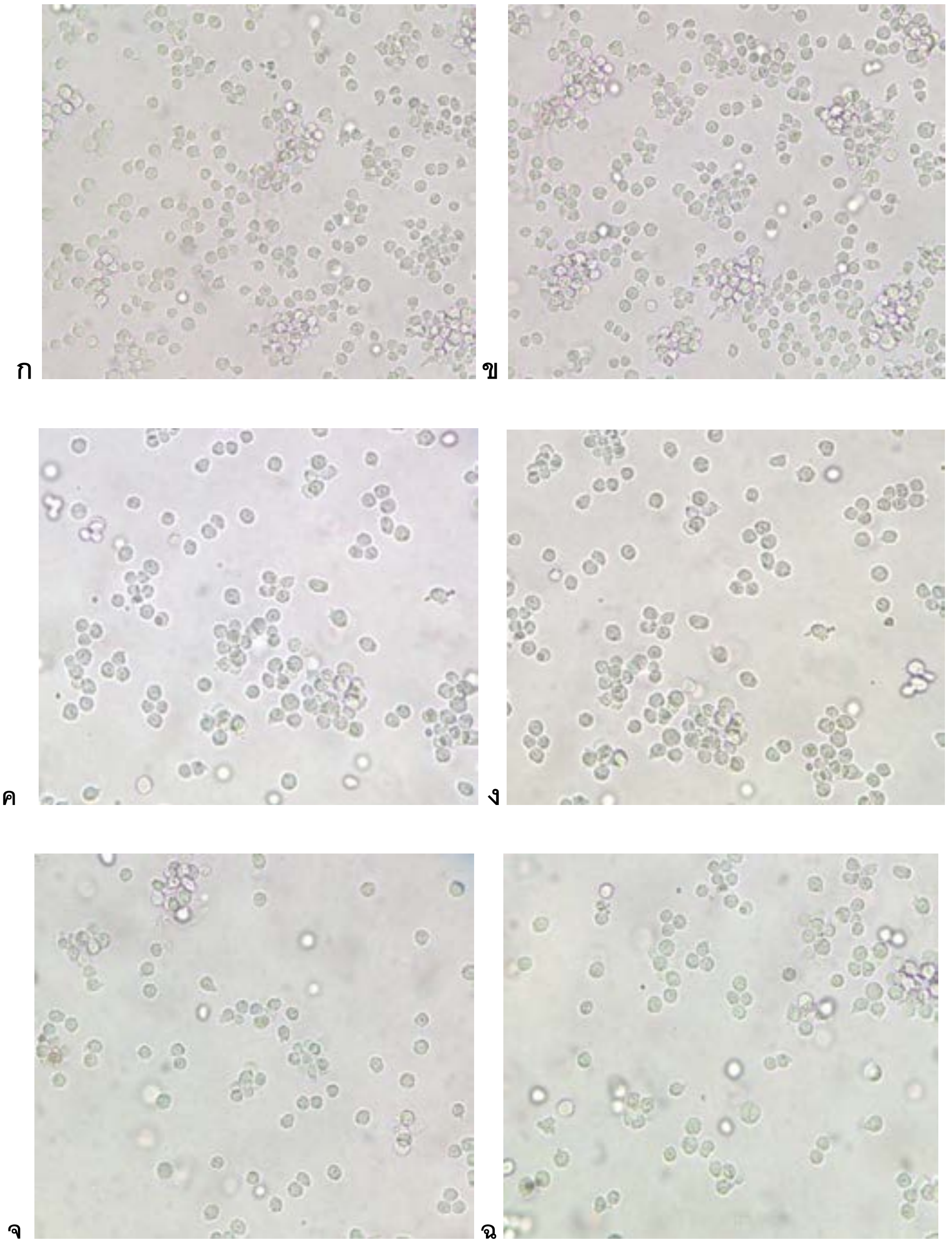
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. รับสาร rutin 50 μg/ml 24 ชม

ง. รับสาร rutin 50 μg/ml 48 ชม.

จ. รับสาร isoquercetin 50 μg/ml 24 ชม.

ฉ. รับสาร isoquercetin 50 μg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 52 ลักษณะของเซลล์ Jurkat ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.

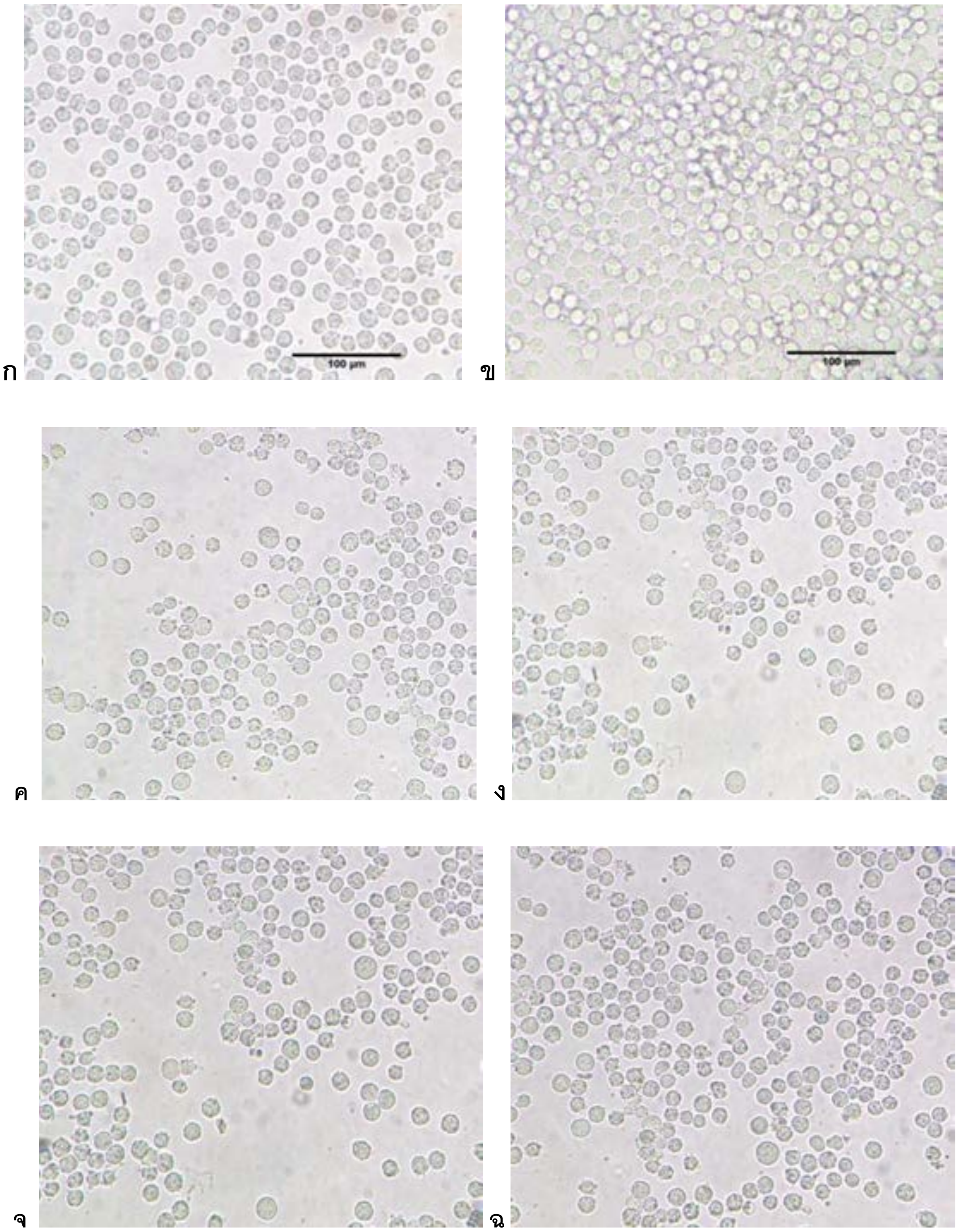
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. รับสารสกัดพลูคาว 250 µg/ml 24 ชม.

ง. รับสารสกัดพลูคาว 250 µg/ml 48 ชม.

จ. รับสารสกัดพลูคาว 300 µg/ml 24 ชม.

ฉ. รับสารสกัดพลูคาว 300 µg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 53 ลักษณะของเซลล์ K562 ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.

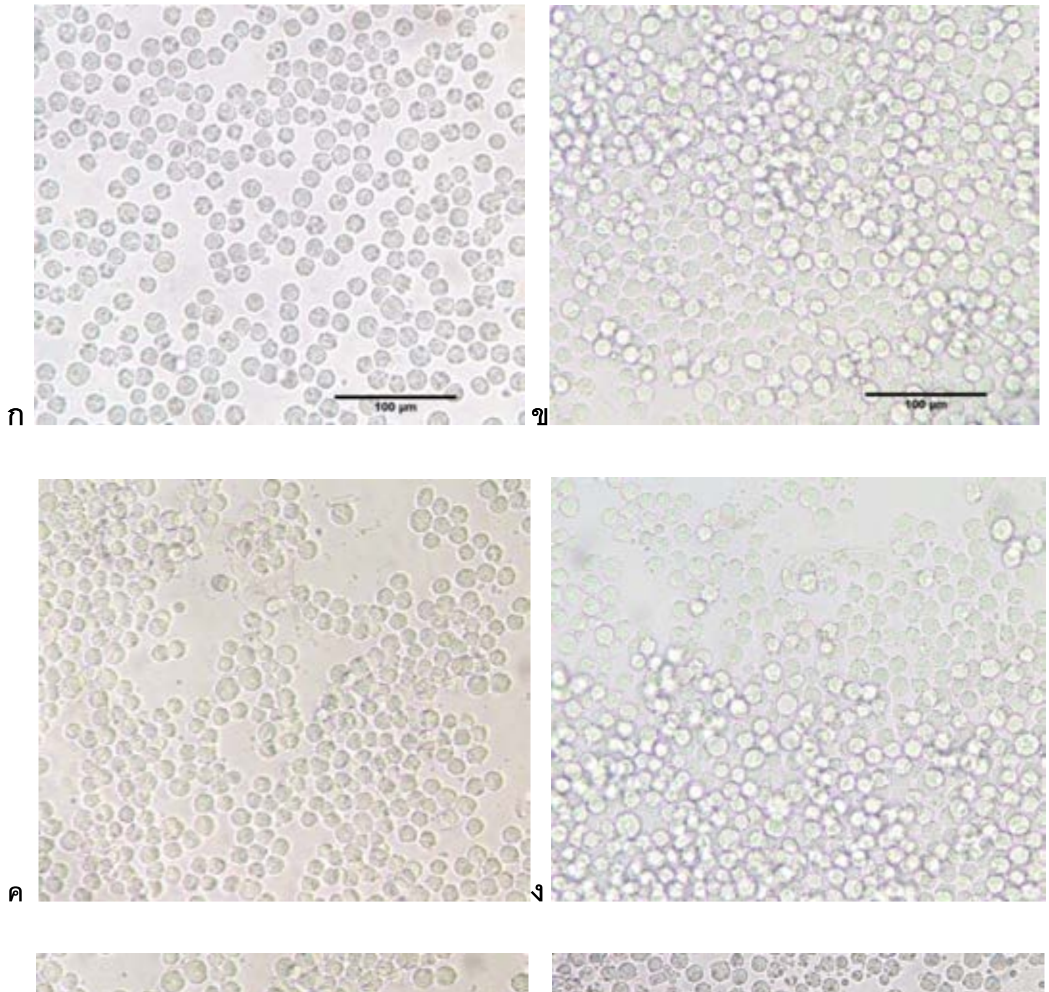
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. vincristine (positive control) 24 ชม.

ง. vincristine (positive control) 48 ชม.

จ. รับสาร quercetin 50 µg/ml 24 ชม.

ฉ. รับสาร quercetin 50 µg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 54 ลักษณะของเซลล์ K562 ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.

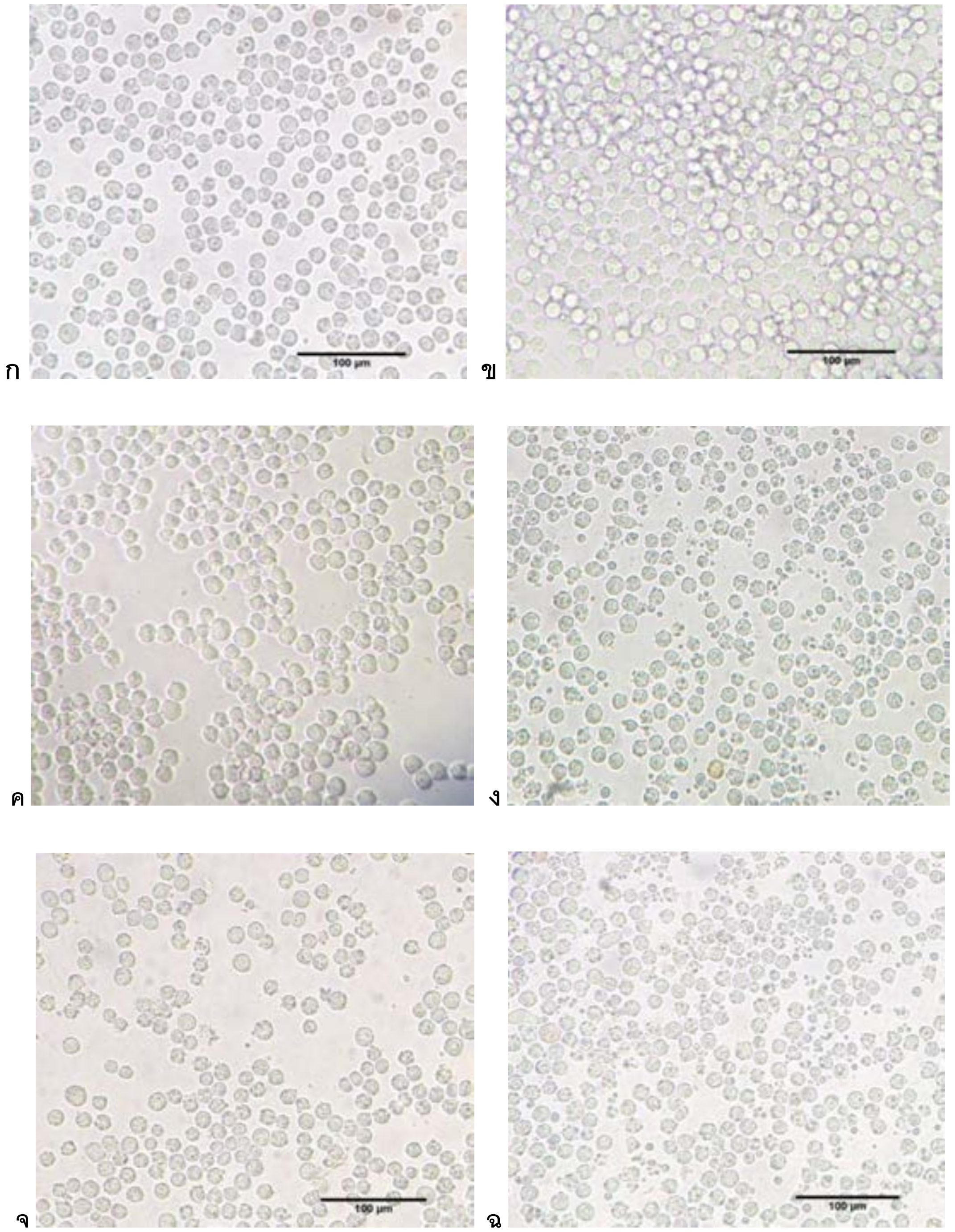
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. รับสาร rutin 50 µg/ml 24 ชม.

ง. รับสาร rutin 50 µg/ml 48 ชม.

จ. รับสาร isoquercetin 50 µg/ml 24 ชม.

ฉ. รับสาร isoquercetin 50 µg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 55 ลักษณะของเซลล์ K562 ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.

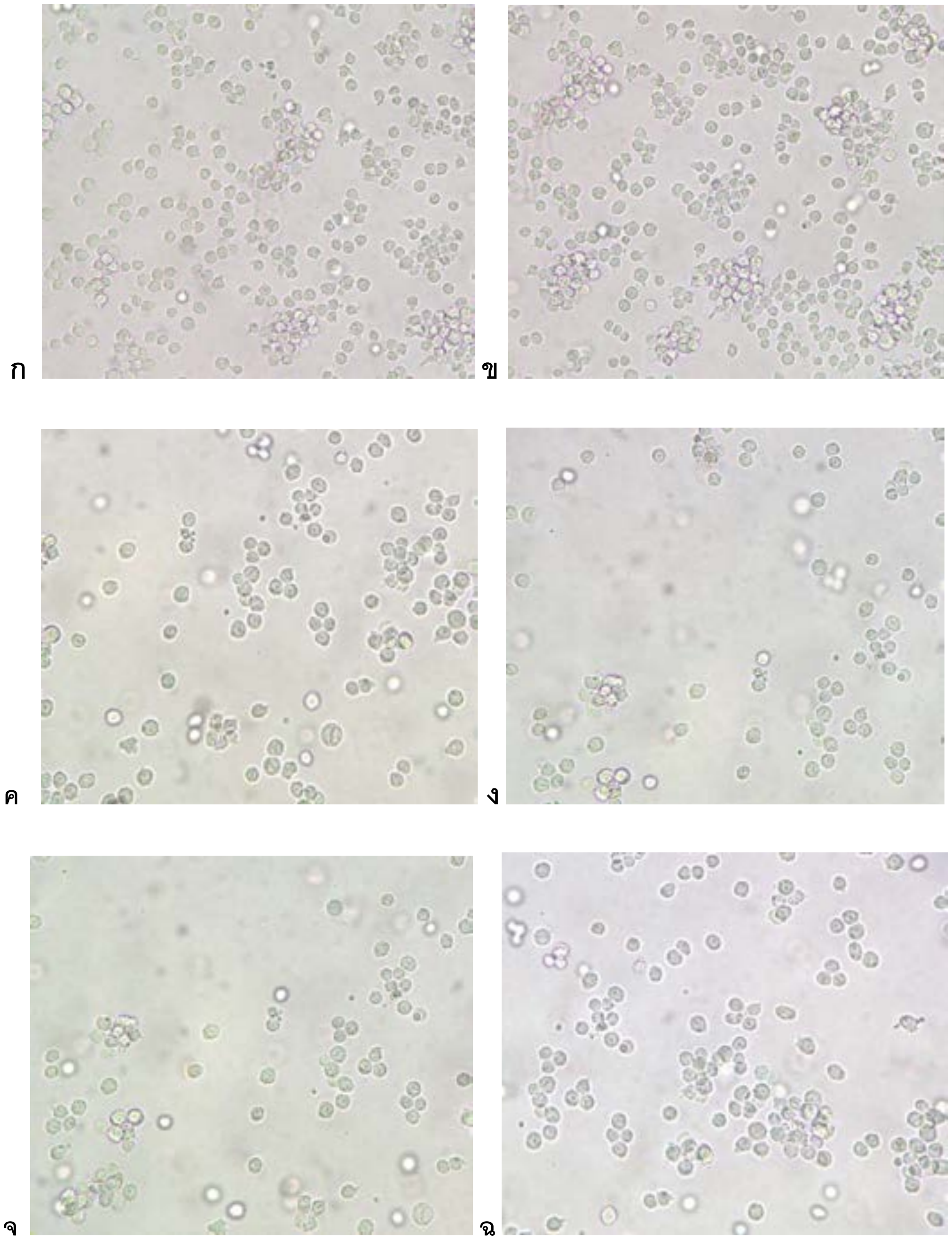
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. รับสารสกัดพลูคาว 250 µg/ml 24 ชม.

ง. รับสารสกัดพลูคาว 250 µg/ml 48 ชม.

จ. รับสารสกัดพลูคาว 300 µg/ml 24 ชม.

ฉ. รับสารสกัดพลูคาว 300 µg/ml 48 ชม.

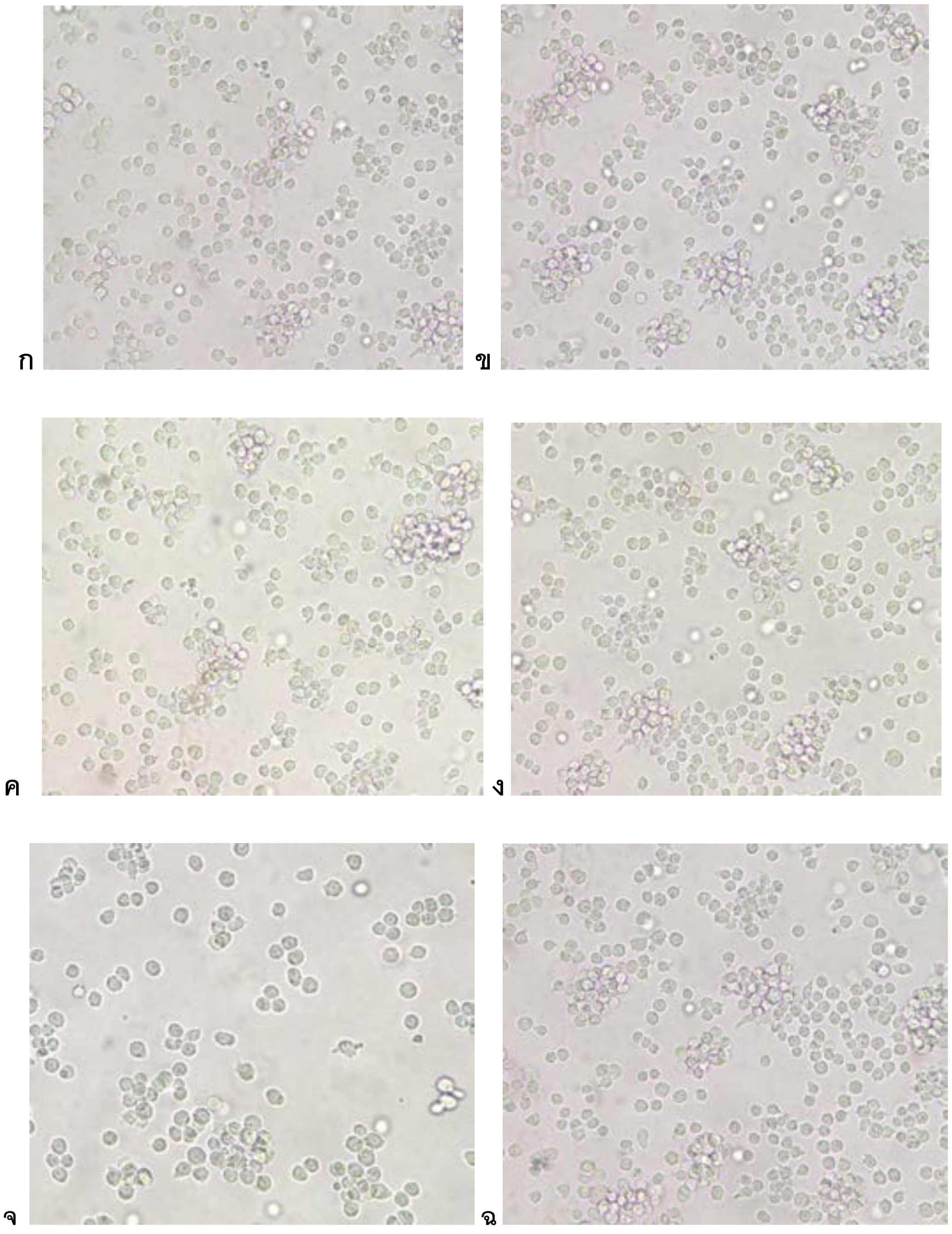


ภาพที่ 56 ลักษณะของเซลล์ U937 ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.   ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. vincristine (positive control) 24 ชม.   ง. vincristine (positive control) 48 ชม.

จ. รับสาร quercetin 50 µg/ml 24 ชม.   ฉ. รับสาร quercetin 50 µg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 57 ลักษณะของเซลล์ U937 ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม.

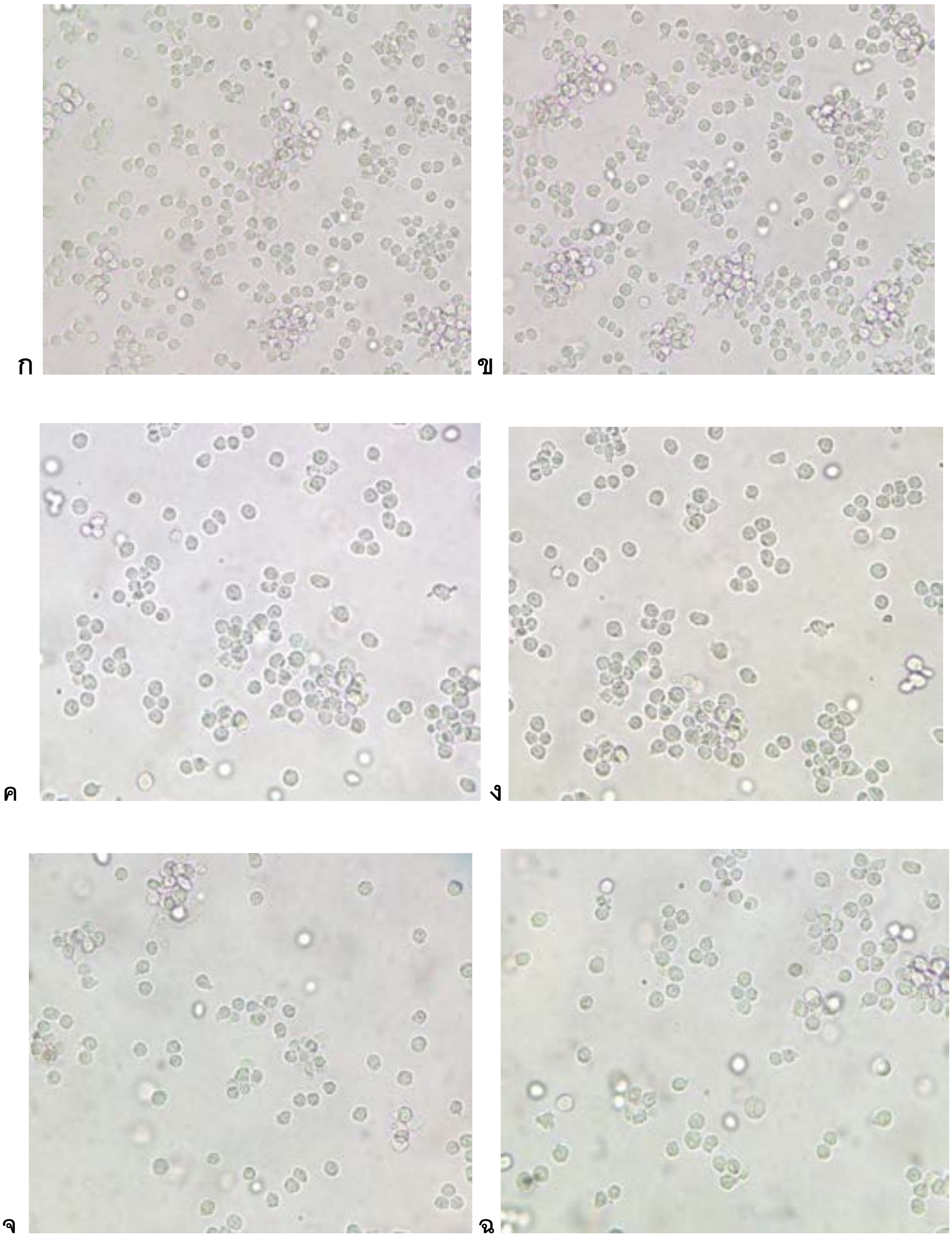
ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. รับสาร rutin 50 µg/ml 24 ชม

ง. รับสาร rutin 50 µg/ml 48 ชม.

จ. รับสาร isoquercetin 50 µg/ml 24 ชม.

ฉ. รับสาร isoquercetin 50 µg/ml 48 ชม.



ภาพที่ 58 ลักษณะของเซลล์ U937 ในภาวะต่างๆ

ก. ไม่ได้รับสาร (negative control) 24 ชม. ข. ไม่ได้รับสาร (negative control) 48 ชม.

ค. รับสารสกัดพลูคาว 250 µg/ml 24 ชม. ง. รับสารสกัดพลูคาว 250 µg/ml 48 ชม.

จ. รับสารสกัดพลูคาว 300 µg/ml 24 ชม. ฉ. รับสารสกัดพลูคาว 300 µg/ml 48 ชม.

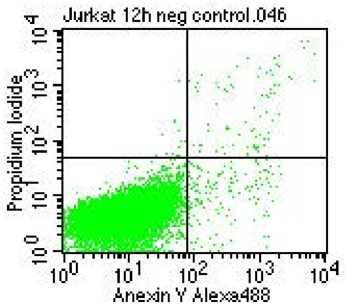
4. ผลการชักนำการตายแบบอะโพโทซิสด้วยสารสกัดพลูคาว, quercetin, isoquercetin **และ** rutin **โดยการตรวจสอบปริมาณ** phosphatidylserine (PS) **บนผิวเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์**

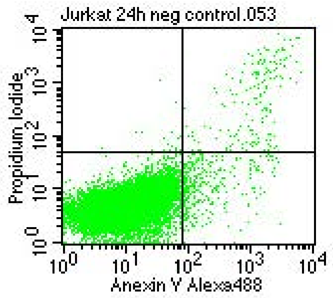
การตรววัดปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เพื่อตรวจวัดการเกิดอะโพโทซิสของเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับสารสกัดพลูคาวและสาร quercetin, rutin และ isoquercetin จะใช้วิธีย้อมสี Annexin V ที่เชื่อมกับสารเรืองแสงซึ่งมีคุณสมบัติสามารถจับกับประจุลบของ PS และใช้ propidium iodide (PI) ซึ่งสามารถย้อมติดดีเอ็นเอ เมื่อนำเซลล์ไปวัดปริมาณ PS บนผิวเซลล์ จะทำให้สามารถแยกเซลล์ออกเป็นกลุ่มๆได้ คือ กลุ่มเซลล์มีชีวิต (Annexin V-/ PI-) , กลุ่ม early apoptotic cell (Annexin V+/ PI-) และกลุ่ม late apoptotic cell (Annexin V+/ PI+) เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย Annexin V-Alexa 488 และ propidium iodide แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณ PS บนผิวเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทุกชนิดมีเซลล์ที่เกิดการอะโพโทซิสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารพลูคาวหรือสารฟลาโวนอล ดังแสดงในภาพที่ 59-64

4.1 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ Jurkat ด้วย quercetin,rutin, isoquercetin และสารสกัดหยาบจากพลูคาว เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

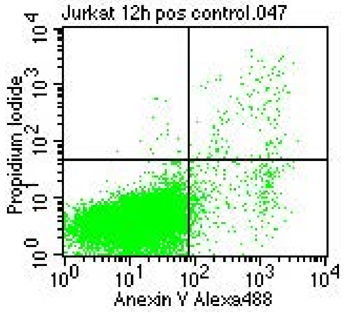
ก) Negative control (0.1% DMSO)

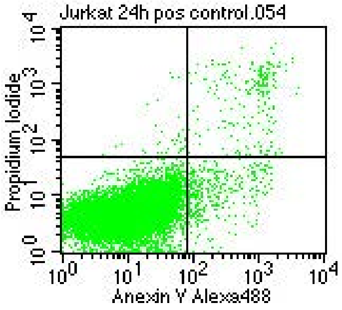
12 ชั่วโมง | 24 ชั่วโมง



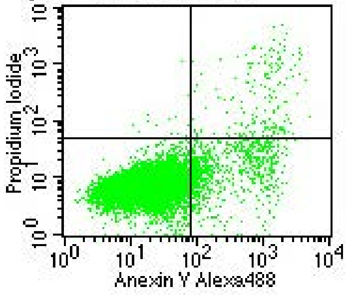


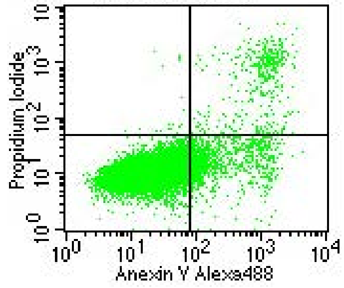
ข) Positve control (Vincristine 10 ng/ml)





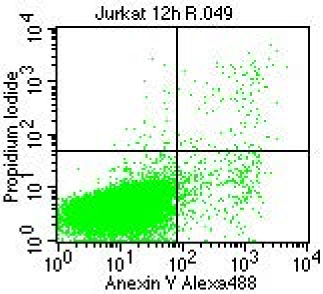
ค) Quercetin 50 µg/ml

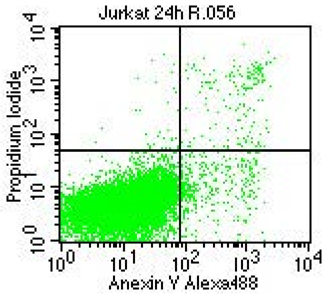




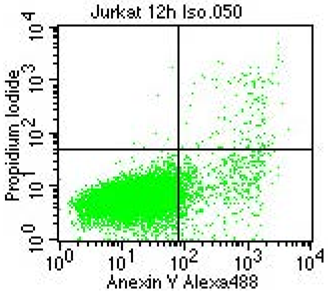
ง) Rutin 50 µg/ml

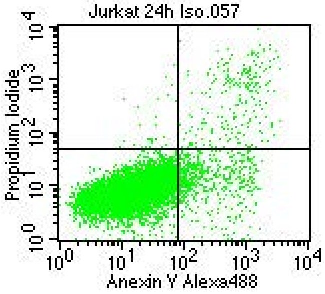
12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง



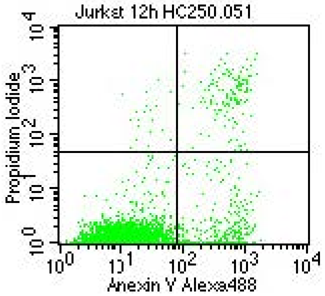


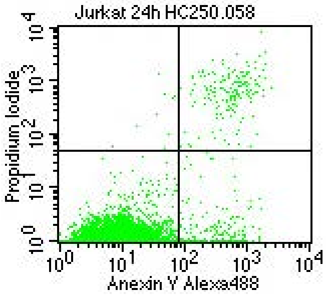
จ) Isoquercetin 50 µg/ml





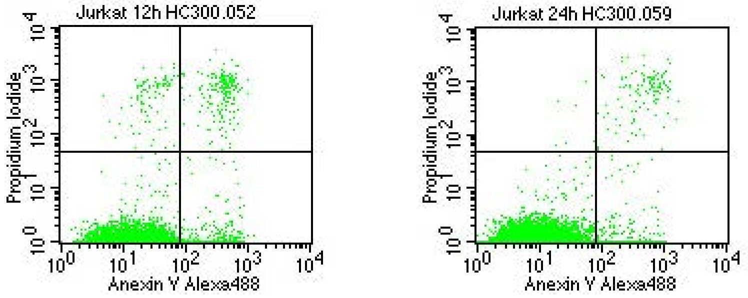
ฉ) สารสกัดหยาบจากพลูคาว 250 µg/ml



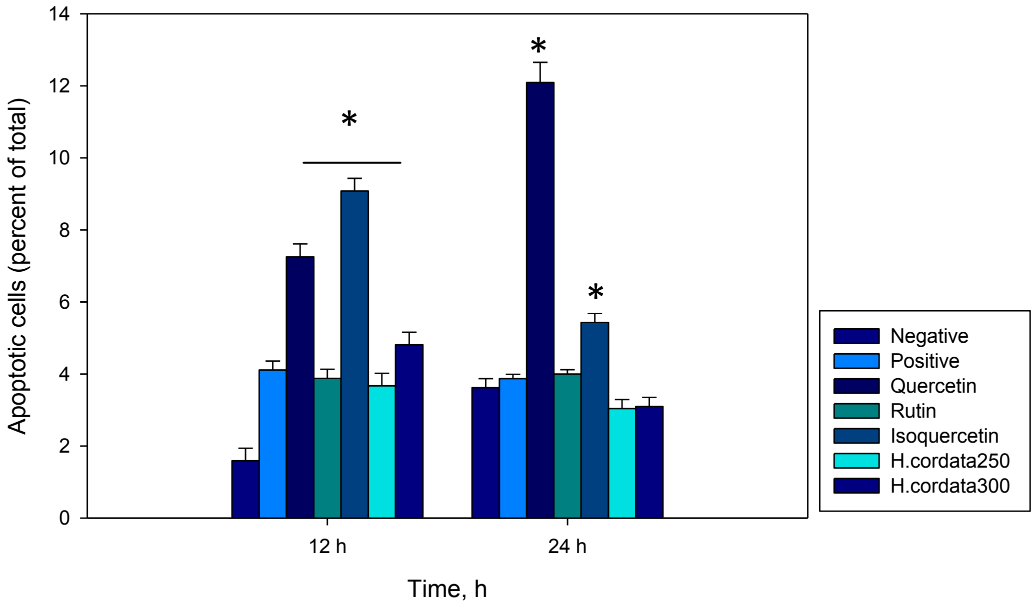


ช) สารสกัดหยาบจากพลูคาว 300 μg/ml

12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 59 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์ Jurkat ในสภาวะต่างๆ



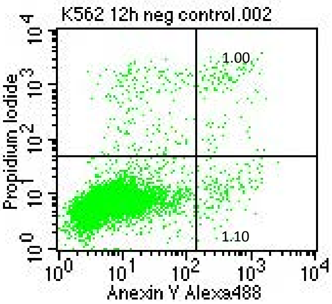
ภาพที่ 60 แสดงปริมาณ apoptotic cells ของเซลล์ Jurkat ในภาวะต่างๆ

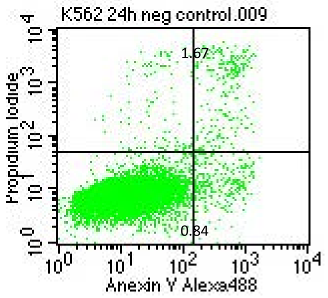
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบบเทียบกับ negative control (RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO)

4.2 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ K562 ด้วย quercetin,rutin, isoquercetin และสารสกัดหยาบจากพลูคาว เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

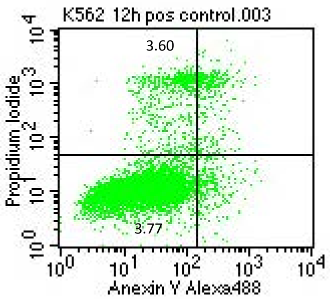
ก) Negative control (0.1% DMSO)

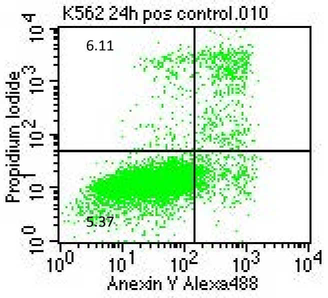
12 ชั่วโมง　　　　24 ชั่วโมง



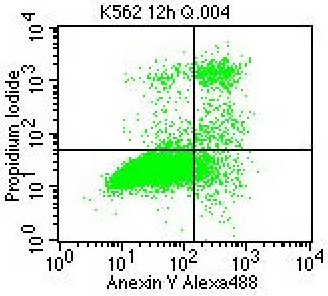


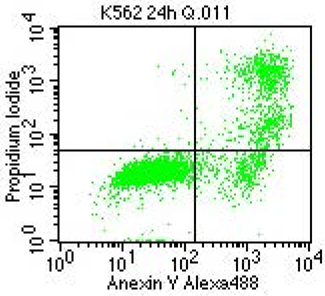
ข) Positve control (Vincristine 10 ng/ml)





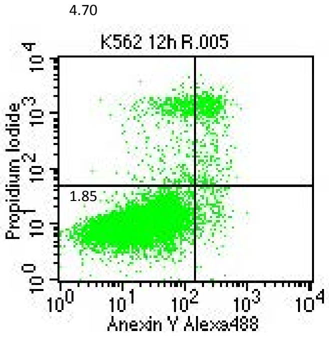
ค) Quercetin 50 µg/ml

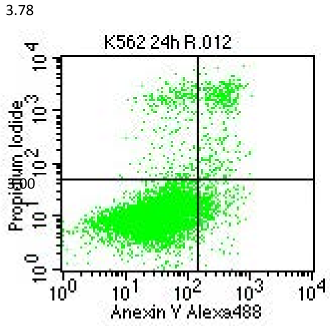




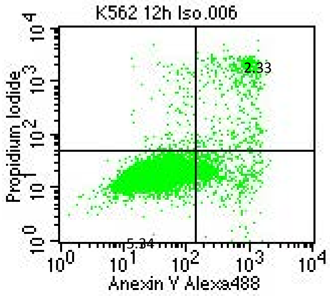
ง) Rutin 50 µg/ml

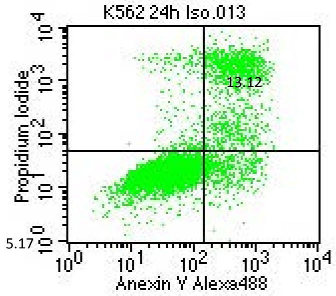
12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง



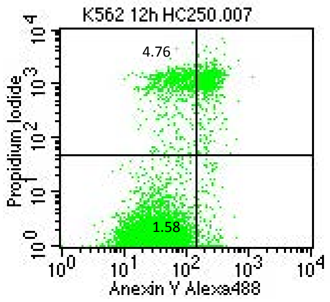


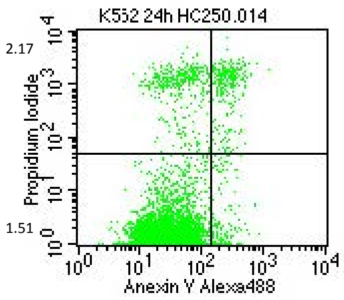
จ) Isoquercetin 50 µg/ml





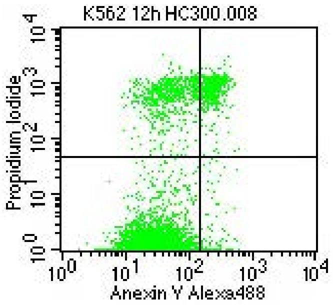
ฉ) สารสกัดพลูคาว 250 µg/ml

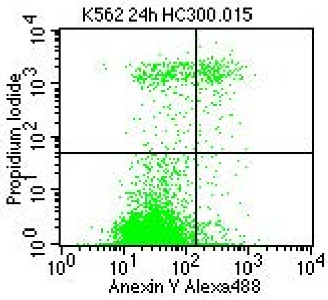




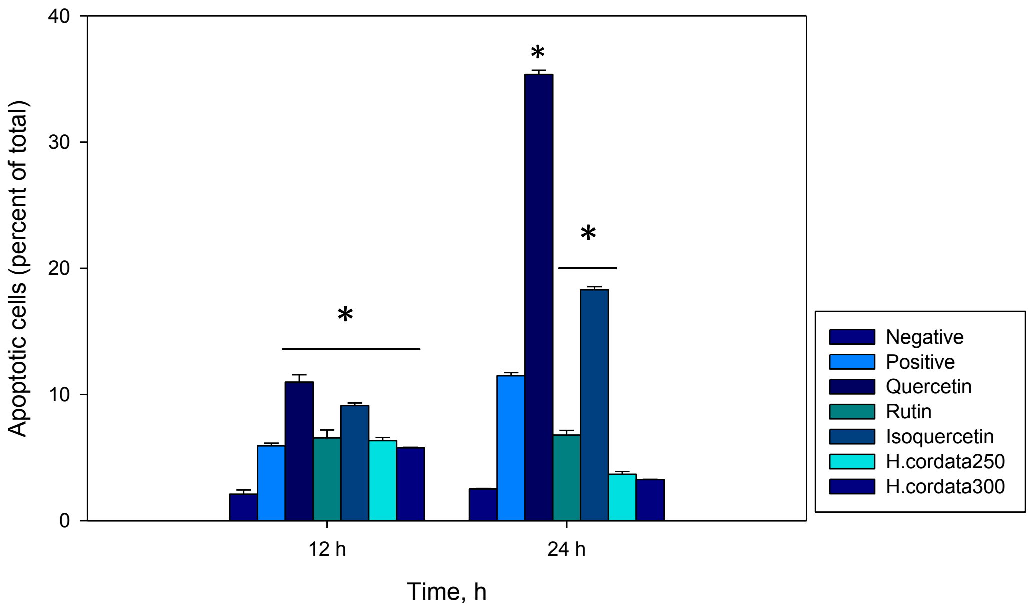
ช) สารสกัดพลูคาว 300 µg/ml

12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง





ภาพที่ 61 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์ K562 ในสภาวะต่างๆ



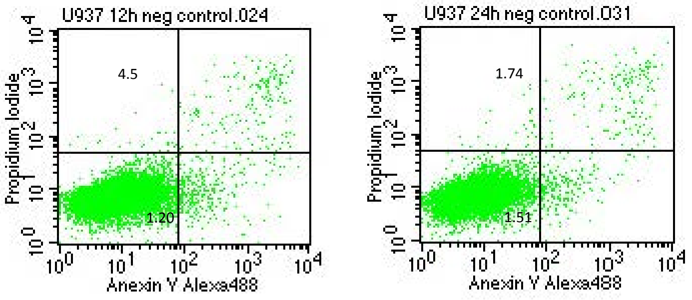
ภาพที่ 62 กราฟแสดงปริมาณ apoptotic cells ของเซลล์ K562 ในภาวะต่างๆ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO)

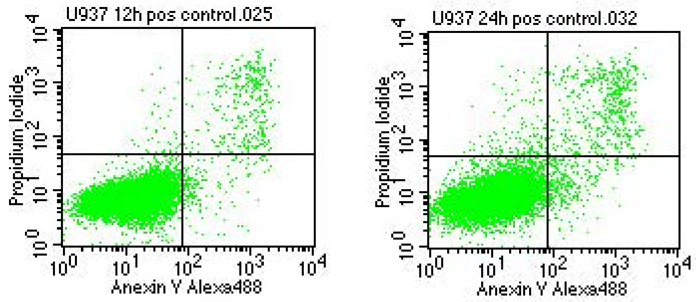
4.3 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ U937 ด้วย quercetin,rutin, isoquercetin และสารสกัดหยาบจากพลูคาว เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

ก) Negative control (0.1% DMSO)

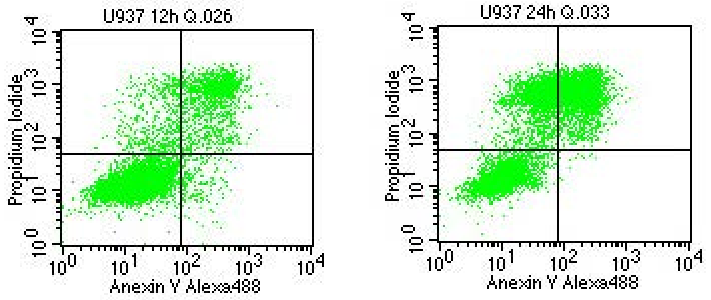
12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง



ข) Positive control (Vincristine 10 ng/ml)

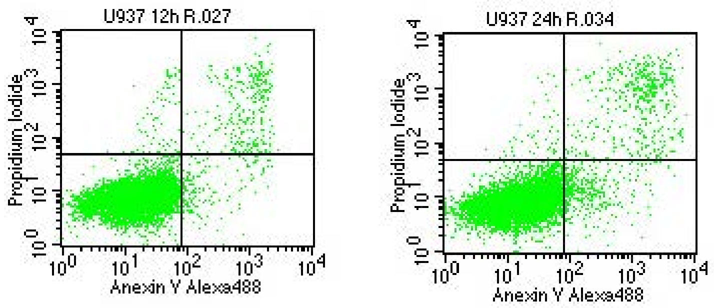


ค) Quercetin 50 µg/ml

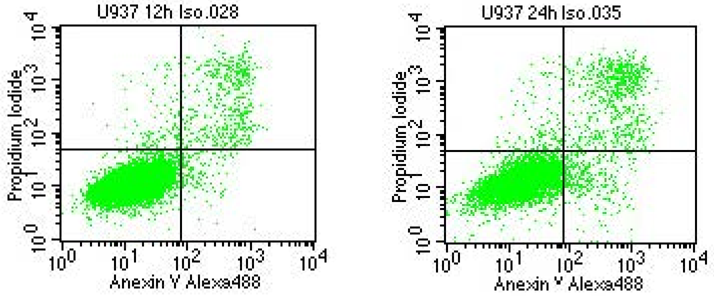


ง) Rutin 50 µg/ml

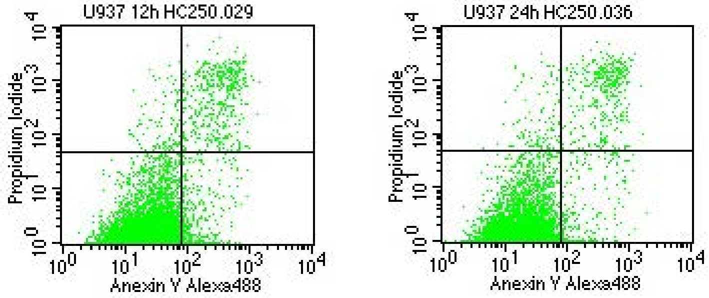
12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง



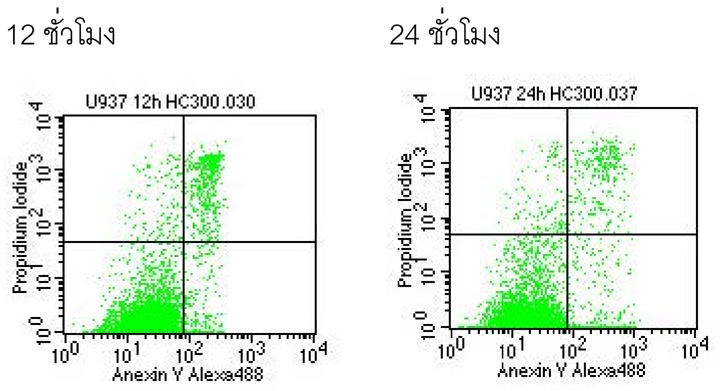
จ) Isoquercetin 50 µg/ml



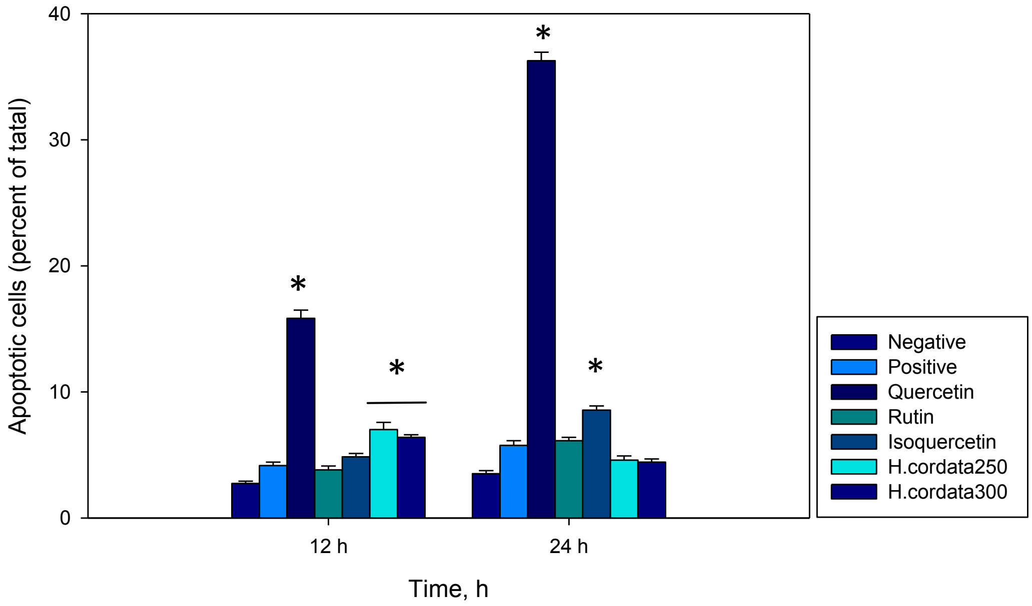
ฉ) สารสกัดพลูคาว 250 µg/ml



ฉ) สารสกัดพลูคาว 300 µg/ml



ภาพที่ 63 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์ U937 ในสภาวะต่างๆ



ภาพที่ 64 กราฟแสดงปริมาณ apoptotic cells ของเซลล์ U937 ในภาวะต่างๆ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (RPMI-1640 ที่มี 0.1% DMSO)

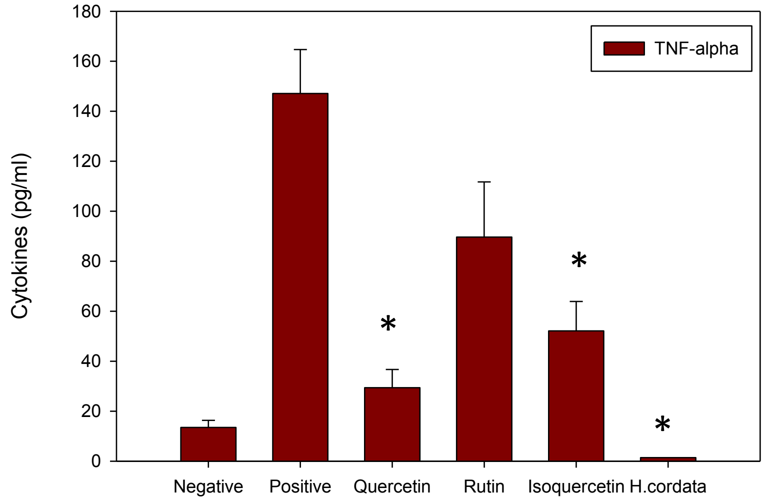
5.ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาว, quercetin, isoquercetin **และ** rutin **ต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย**

5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาว, quercetin, isoquercetin และ rutin ต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยด้วยวิธี ELISA

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA ในงานการศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจวัดIL-6 และTNF-α เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาว, quercetin, isoquercetin และ rutin ต่อการยับยั้งหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และ U937 การตรวจปริมาณของไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PHAและPMA (positive control) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 147.14 ± 17.56 pg/ml ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่เติม 0.1% DMSO (Negative control) มีปริมาณ TNF-α เท่ากับ 13.52 ± 2.81pg/ml เมื่อทำการเติมสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 300 µg/ml สาร quercetin, rutin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml (ในระดับที่ต่ำกว่า IC_{50}) และทำการกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PHAและPMA พบปริมาณของ TNF-α น้อยกว่า 1.40 pg/ml สำหรับสารสกัดหยาบจากพลูคาว, 29.39±7.29 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 89.67±22.06 pg/ml สำหรับสาร rutin และ 52.13±11.78 pg/ml สำหรับสาร isoquercetin ในขณะที่ปริมาณของ IL-6 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Jurkat ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี ELISA

ผลการตรวจปริมาณของไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS (positive control) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบมีปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 1139.94±47.54 pg/ml ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่เติม 0.1% DMSO (Negative control) มีปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 525.34±31.05 pg/ml เมื่อทำการเติมสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 300 µg/ml สาร quercetin, rutin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml (ในระดับที่ต่ำกว่า IC_{50}) แล้วทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณของ TNF-α เท่ากับ 836.62±173.92 pg/ml สำหรับสารสกัดหยาบจากพลูคาว, 496.53±38.32 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 1055.67±133.16 pg/ml สำหรับสาร rutin และ 816.36±173.35 pg/ml สำหรับ

สาร isoquercetin ในการตรวจวัดปริมาณ IL-6 ในการทดลองแบบเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้นพบปริมาณของ IL-6 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ U937 หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS เท่ากับ 29.93±2.47 pg/ml ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่เติม 0.1% DMSO (Negative control) มีปริมาณของ IL-6 เท่ากับ 29.93±2.47 pg/ml เมื่อทำการเติมสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 300 µg/ml สาร quercetin, rutin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml (ในระดับที่ต่ำกว่า IC_{50}) แล้วทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณของ IL-6 เท่ากับ 34.52±4.02 pg/ml สำหรับสารสกัดหยาบจากพลูคาว, 31.41±0.38 pg/ml สำหรับสาร quercetin, 36.12±2.59 pg/ml สำหรับสาร rutin และ 38.16±9.16 pg/ml สำหรับสาร isoquercetin

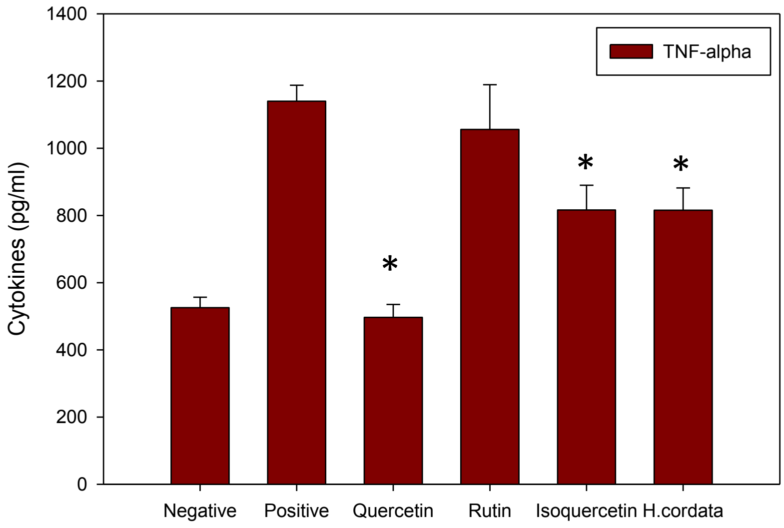


ภาพที่ 65 กราฟปริมาณไซโตไคน์ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat โดยวิธี ELISA

ตารางที่ 7 ปริมาณ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurket ด้วยวิธี ELISA

	TNF-α (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	10.33	14.57	15.65	13.52$\pm$2.81
Positive control	159.92	154.38	127.12	147.14$\pm$17.56
Quercetin	24.31	26.12	37.75	29.39$\pm$7.29*
Rutin	98.41	64.57	106.03	89.67$\pm$22.06
Isoquercetin	49.27	42.03	65.07	52.12$\pm$11.78*
สารสกัดพลูคาว	<1.40	1.40	<1.40	<1.40*

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

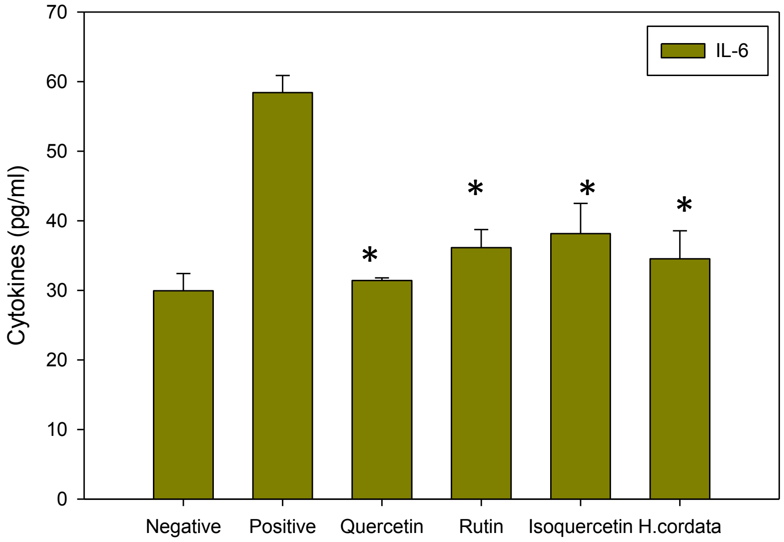


ภาพที่ 66 กราฟปริมาณไซโตไคน์ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 โดยวิธี ELISA

ตารางที่ 8 ปริมาณ TNF-α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 ด้วยวิธี ELISA

	TNF-α (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	518.15	559.36	498.51	525.34±31.05
Positive control	1160.06	1174.11	1085.65	1139.94±47.54
Quercetin	475.02	473.80	540.79	496.53±38.32*
Rutin	1091.78	908.16	1167.04	1055.67±133.16
Isoquercetin	954.43	872.84	621.80	816.36±73.35*
สารสกัดพลูคาว	989.44	873.06	647.36	836.62±73.92*

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



รูปที่ 67 กราฟปริมาณ IL-6 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 โดยวิธี ELISA

ตารางที่ 9 ปริมาณ IL-6 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 ด้วยวิธี ELISA

	IL-6 (pg/ml)			
	1	2	3	**เฉลี่ย**
Negative control	31.68	28.81	30.61	29.93±2.47
Positive control	56.66	60.14	59.99	58.40±6.45
Quercetin	31.14	31.68	32.12	31.41±0.38*
Rutin	37.96	34.29	38.63	36.12±2.59*
Isoquercetin	44.63	31.68	38.93	38.16±4.33*
สารสกัดจากพลูคาว	37.36	31.68	35.32	34.52±4.02*

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

5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาว, quercetin, isoquercetin และ rutin ต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยด้วยวิธี ด้วยวิธี Bio-Plex

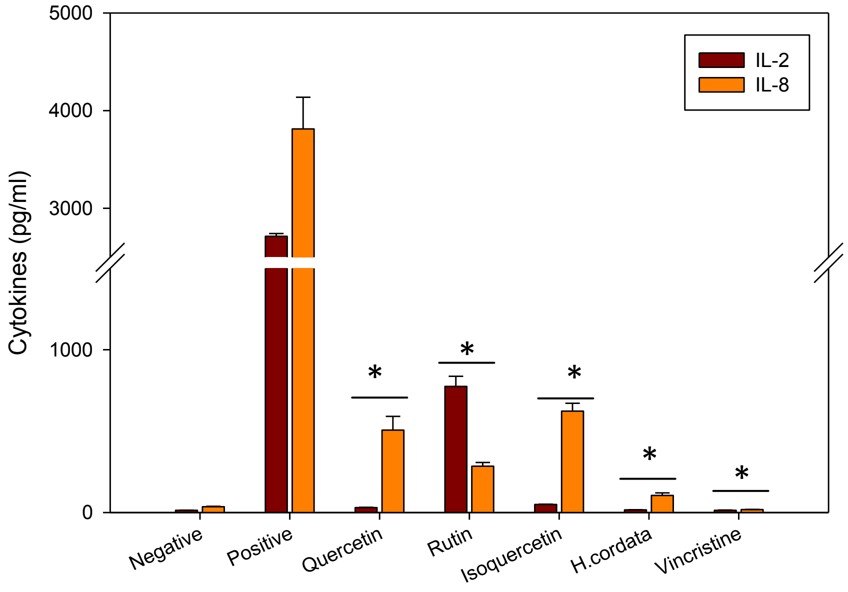
การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Bio-plex ในงานการศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจวัดไซโตไคน์ทั้งสิ้น 8 ไซโตไคน์ คือ IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α ซึ่งหากจัดแบ่งไซโตไคน์ตามหน้าที่หลักของไซโตไคน์จะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic cytokines) ได้แก่ IL-2 และ GM-CSF และอีก 6 ไซโตไคน์จัดเป็นกลุ่มไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ Jurkat ด้วย PMA/PHA ทำให้เซลล์ Jurkat หลั่งไซโตไคน์ IL-2,IL-8, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α และเมื่อเซลล์ Jurkat ได้รับสารสกัดจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลก่อนทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย PMA/PHA พบว่ามีการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-2,IL-8, IFN-γ และ TNF-α ดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 68,69 สำหรับการตรวจวัดปริมาณการหลั่งไซโตไคน์ ในเซลล์ U937 พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย LPS ทำให้เซลล์ U937 หลั่งไซโตไคน์ IL-2,IL-8, IFN-γ และ TNF-α และเมื่อเซลล์ U937 ได้รับสารสกัดจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลก่อนทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS พบว่ามีการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-8 และ TNF-α ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 70

ตารางที่ 10 แสดงระดับไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ Jurkat ด้วยวิธี Bio-plex

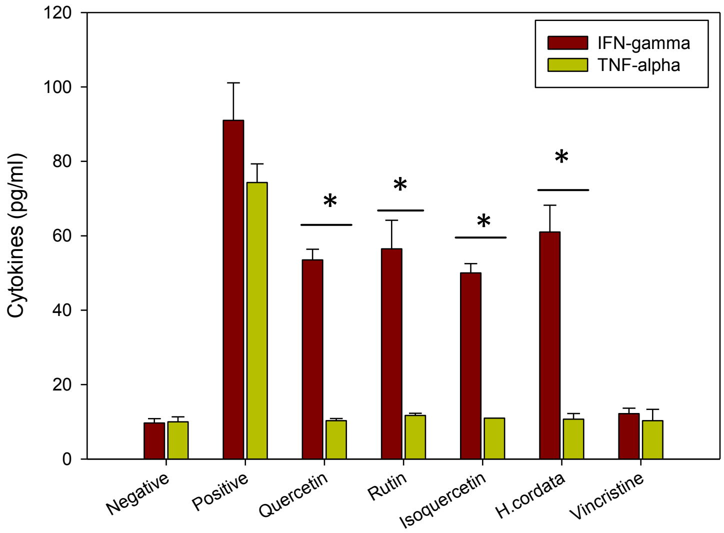
Jurket	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFN-ϒ	TNF-α
Negative	13.8±0.76	8.5±0.87	10.8±0.76	35.3±3.21	27.7±0.58	115.5±8.26	9.7±1.15	10±1.32
Positive	2713.7±27.75	13.7±0.58	14±1.0	3813.5±323.73	32.8±2.75	126.5±5.2	91±10.1	74.3±5.01
Quercetin	30.3±1.44	9.3±1.04	13.2±1.89	506±84.01	32.3±3.82	129.3±4.16	53.5±2.9	10.3±0.58
Rutin	774.5±62.65	9.3±1.15	11±0.5	284.7±22.68	32.3±1.26	131.5±11.95	56.5±7.6	11.7±0.58
Isoquercetin	49.5±2.18	9.8±1.44	11±1.0	623.2±48.1	31±5.57	129.2±1.04	50±2.5	11±0.5
H.cordata	15.8±1.26	9.3±1.61	11.5±1.32	105±15.39	30.5±2.6	133.3±2.36	61±7.2	10.7±1.53
Vincristine	14±1.73	9.3±0.58	10.7±2.08	18.3±0.58	31.2±0.76	106.8±3.75	12.2±1.4	10.3±3.06

ตารางที่ 11 แสดงระดับไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ U937 ด้วยวิธี Bio-plex

U937	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFN-ϒ	TNF-α
Negative	11.7±2.31	11.3±0.58	11.3±0.58	140±20.22	32.5±0.87	126.8±3.18	12.3±2.36	662.25±139.13
Positive	13.3±0.58	11.8±1.04	13.2±1.26	340.8±62.09	35.2±2.84	126.3±5.11	66±1.45	1329.075±112.29
Quercetin	11.3±2.08	10.8±0.29	14±1.73	55.2±10.56	31.5±3.04	141.2±4.37	60±5.0	550.5±97.56
Rutin	11.8±1.89	10.3±2.08	14.3±1.15	159±15.52	30.8±1.89	132±6.73	62.5±6.6	944.45±120.64
Isoquercetin	11.7±1.53	12±0.5	14.7±1.53	1083±151.93	34.7±3.51	138.7±14.94	68.5±7.65	988.325±126.85
H.cordata	11.7±0.76	10.3±0.29	13.2±0.76	136.8±52.42	28.7±2.31	155.5±10.48	69±5.2	844.2±133.52
Vincristine	11.7±2.08	12±0.5	13±2.65	45.2±5.3	32.7±0.58	146.7±3.06	11.5±1.32	15.5±3.12

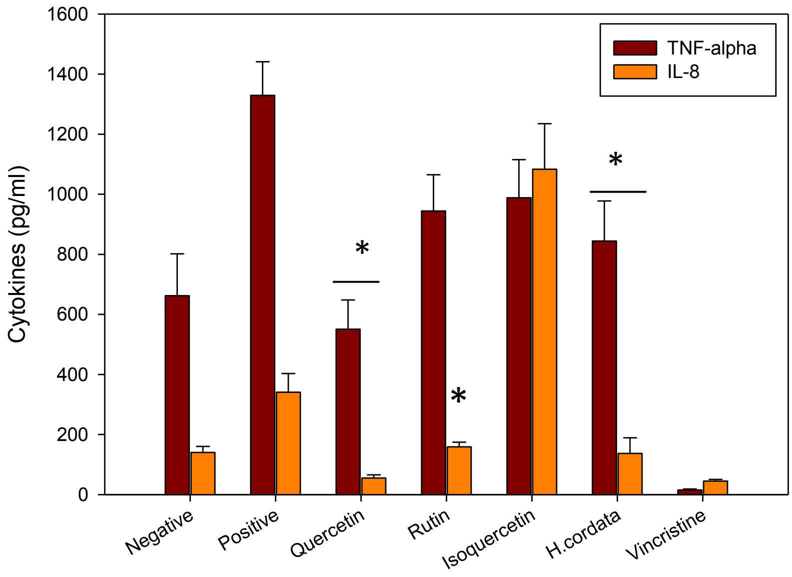


ภาพที่ 68 กราฟปริมาณ IL-2 และ IL-8 ที่หลั่งจากเซลล์ Jurkat โดยวิธี Bio-plex



ภาพที่ 69 กราฟปริมาณ IFN-γ และ TNF-α ที่หลั่งจากเซลล์ Jurkat โดยวิธี Bio-plex

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



ภาพที่70 กราฟปริมาณ IFN-γ และ IL-8 ที่หลั่งจากเซลล์ U937 โดยวิธี Bio-plex

* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (ได้รับสาร PMA/PHA เพียงอย่างเดียวใน K562 และ LPS เพียงอย่างเดียวใน U937)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการสร้างและเจริญแก่ตัวของเซลล์เม็ดเลือดซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งในสายของเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเกร็ดเลือด การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีอยู่หลายวิธีซึ่งในทางปฏิบัติมักจะใช้การรักษาหลายๆวิธีร่วมกันโดยมีจุดประสงค์เพื่อต้องการผลการรักษาที่ดีที่สุดและลดผลข้างเคียง (side effect) อันเนื่องจากการรักษาในแต่ละวิธี ปัจจุบันพืชสมุนไพรได้เข้ามามีบทบาทในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆมากขึ้นรวมไปถึงโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรนั้นเป็นสารจากธรรมชาติไม่ผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์เหมือนยาเคมีบำบัด ในส่วนของการสกัดพืชสมุนไพรนั้นมีรายงานว่าชนิดของตัวทำละลายในการสกัดจะทำให้ได้ปริมารสารสกัดและสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน[19, 20] จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยการเปรียบเทียบวิธีการสกัดพลูคาวด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ 95% คณะผู้วิจัยพบว่าการสกัดพลูคาวด้วย 95% ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (total flavonoids) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าวิธีการสกัดด้วยน้ำ [90] จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาต่อยอดผลของสารสกัดพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% ในด้านการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวและต้านการอักเสบ ทั้งนี้ในการทดลองแต่ละขั้นตอน คณะผู้วิจัยได้ใช้สารมาตรฐาน quercetin, rutin และ isoquercetin ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนอลที่ที่พบในพลูคาวมาทำการศึกษาเปรียบเทียบควบคู่กันกับสารสกัดหยาบจากพลูคาว

จากการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) ในสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% พบมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 258 ± 8.78 mg RE/g dried *H.cordata* ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ จตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย [20] ซึ่งนำพลูคาวจากแหล่งเดียวกันมาทำการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำ พบว่าการใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวสกัดทำให้ได้ปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์มากกว่าการใช้น้ำและยังให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ด

เลือดขาวได้ดีกว่าด้วย จากการศึกษาของ Ramos และคณะซึ่งศึกษาผลการใช้ตัวสกัดหลายชนิด เช่น ethanol, methanol, acetone, ethyl acetate และ ether ต่อชนิดและปริมาณของสารที่สกัดออกมาได้พบว่า สารสกัดที่ได้มาจากตัวสกัด ethanol และ methanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงนั้นทำให้ได้สารสกัดในกลุ่มฟลาโวนอยด์ออกมามากกว่าการใช้ acetone หรือ ethyl acetate ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง ในขณะที่ตัวทำละลายซึ่งมีขั้วต่ำเช่น ether จะสกัดสารในกลุ่ม fatty acid, terpenids และ alkaloids ออกมามาก [19] คณะผู้วิจัยเลือกใช้ ethanol เป็นตัวสกัดเนื่องจาก ethanol มีความเป็นพิษน้อยกว่า methanol สามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย

เพื่อให้ครอบคลุมโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆให้มากที่สุด คณะผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ Jurkat, K562 และ U937 เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสาย lymphoid lineage (human acute T cell leukemia), myeloid lineage (human erythromyeloblastoid leukemia) และ myeloid lineage (human leukemia monocyte lymphoma cell line) ตามลำดับ จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี XTT assay พบว่า สารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสาย myeloid lineage ได้ดีกว่าในสาย lymphoid lineage (Jurkat cell) สำหรับในสาย myeloid lineage นั้นพบว่าสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95%และสารฟลาโวนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ดีกว่าเซลล์ K562 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างในด้านคุณสมบัติของเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ สิงห์คำ ธิมา และคณะ [17] ได้ทำการศึกษาสารสกัดพลูคาวโดยแยกเป็นจากส่วนใบและลำต้นแล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์ปกติ (PBMCs) ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งรายงานว่าสารสกัดพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 80% สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HL-60 (human promyelocytic leukemia cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ในสาย myeloid lineage มากกว่าเซลล์ Molt4 (human lymphoblastic leukemia cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ในสาย lymphoid lineage โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 500 ถึง 800 µg/ml ในขณะที่สารสกัดพลูคาวจากทั้งส่วนใบและส่วนลำต้นไม่แสดงความเป็นพิษกับเซลล์ PBMCs โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 800 µg/ml และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang JS และคณะ [16] ที่พบว่าสารสกัดพลูคาวด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์

มะเร็งเพาะเลี้ยง 5 ชนิด คือ U937, K562, Raji, P3HR1 และ L1210 cells โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 478 ถึง 662 µg/ml ในส่วนผลของสารฟลาโวนอลที่มาทำการศึกษาเปรียบเทียบนั้นพบว่า quercetin จะมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมากที่สุด ตามมาด้วย isoquercetin และ rutin ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่มีหมู่น้ำตาลเข้ามาเชื่อมต่อตรงตำแหน่งคาร์บอน-3 ของ quercetin ทำให้คุณสมบัติทางเคมี ลักษณะทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ของ quercetin คือ isoquercetin และ rutin เปลี่ยนแปลงไป

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี microscopic analysis พบว่าในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบ (negative control) และพบว่าสารสกัดหยาบจากพลูคาวจะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ U937 ได้ดีที่สุด ตามมาด้วยเซลล์ K562 และ Jurkat ตามลำดับ ในส่วนของสารฟลาโวนอลพบว่า quercetin มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีที่สุด ตามมาด้วย isoquercetin และ rutin ตามลำดับ ซึ่งผลจะสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี XTT assay

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลต่อการชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสโดยการวัดปริมาณ phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์ชั้นนอกซึ่งเป็นตัวชี้วัดการตายของเซลล์แบบอะโพโทซิส (apoptosis) โดยการย้อมสี Annexin V-Alexa 488 และ Propidium iodide ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่า ผลการทดสอบที่เวลา 12 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากพลูคาวและสารฟลาโวนอลทุกชนิดที่นำมาทดสอบสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะโพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิด แต่ผลการทดสอบที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีเพียงสาร quercetin และ isoquercetin เท่านั้นที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะโพโทซิส จากผลการทดลองในส่วนของสารฟลาโวนอลที่ได้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยจากหลายๆแห่งที่กล่าวว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอลโดยเฉพาะ quercetin สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งหลายชนิดเกิดการตายแบบอะโพโทซิส เช่น การศึกษาของ Hung H [104] และ Tan J และคณะ [105] ซึ่งรายงานว่า quercetin ชักนำให้เซลล์ HepG2 (human hepatoma cell line) ตายแบบอะโพโทซิสโดยการไปเพิ่มระดับ p23, p21 และ p27 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มกระตุ้นให้เกิด

การตาย (pro-apoptotic protein) และลดระดับ Bcl-2 และ survivin ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มยับยั้งการตายของเซลล์ (anti-apoptotic protein) และทำให้เกิด cell cycle arrest ที่ระยะ G1 phase และระยะ G2/M phase นอกจากนี้ยังมีรายการศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29 cell, Caoo-2 cell) เซลล์มะเร็งเต้านม (MFC-7 cell, MDA-MB-435 cell, MDA-468 cell) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (HGC-27 cell, NUGC-2 cell, MKN-28) เซลล์มะเร็งปอด (A459 cell) เซลล์มะเร็งผิวหนัง (MNT1 cell, M10 cell, M14 cell) เซลล์มะเร็งรังไข่ (OVCA33 cell) ซึ่งพบว่าquercetin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ดังกล่าวและชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิส [100-108] ในด้านกลไกในการชักนำให้เกิดอะโพโทซิสมีรายงานว่า quercetin สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสโดยผ่านวิถีจากภายใน (mitochondrial-dependent pathway)

จากผลการศึกษาชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสของสารสกัดหยาบจากพลูคาว พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Tang JY และคณะ [14] ที่พบสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 50% ที่ความเข้มข้น 450 μg/ml สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสผ่านทาง mitochondrial-dependent pathway ในเซลล์ HT-29 (human colon adenocarcinoma cells) โดยพบว่าสารสกัดพลูคาวไปเพิ่มปริมาณ ROS เพิ่มการแสดงออกของ Bax ยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 และลดระดับของ mitochondria membrane potential (MMP) จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการปล่อย cytochrome c ออกมาจาก mitochondria ซึ่ง cytochrome c ที่ปล่อยออกมานี้จะไปกระตุ้น Apaf-1 จากนั้นจะทำให้เพิ่มของ caspase-9 ซึ่งจะไปทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ caspase-3 จึงทำให้เกิดตายแบบอะโพโทซิสต่อไป นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2010 Lai และคณะยังได้ทำการทดลองในเซลล์มะเร็งลำไส้จากผู้ป่วยจำนวน 3 ราย พบว่า สารสกัดพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 50% ที่ความเข้มข้น 250 μg/ml สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสด้วยกลไกผ่านทาง mitochondrial-dependent pathway เช่นเดียวกัน [15]

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลในการต้านการอักเสบของสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลโดยศึกษาจากการลดการหลั่งปริมาณไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-γ และ TNF-α ด้วยวิธี ELISA และวิธี Bio-plex พบว่า เมื่อเซลล์ Jurkat ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล ก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย

PMA/PHA ทำให้ลดการหลั่งไซโตไคน์ IL-2, IL-8, IFN-γ และ TNF-α ในการทดสอบเซลล์ U937 เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอล ก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS พบว่า มีเพียงสารสกัดพลูคาวและสาร quercetin เท่านั้นที่ทำให้เซลล์ U937 ลดการหลั่งไซโตไคน์ TNF-α

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดพลูคาวและสารฟลาโวนอลมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและต้านการอักเสบโดยวิเคราะห์จากผลที่สารดังกล่าวมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งการทดสอบโดยวิธี XTT assay การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และศึกษาการชักนำการตายของแบบอะโพโทซิสด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดพลูคาวและสาร ฟลาโวนอลยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิเคราะห์จากผลที่เซลล์ลดการหลั่งไซโตไคน์ IL-2, IL-6, IL-8, IFN-γ และ TNF-α ซึ่งผลของการลดการหลั่งไซโตไคน์นั้นอาจแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างในคุณสมบัติของเซลล์และความแตกต่างของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด

ข้อเสนอแนะ

1. ในด้านวิธีการสกัดพลูคาวผู้วิจัยเสนอว่าควรใช้ตัวสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น เอทานอล หรือ เมทานอล เนื่องจากทำให้ได้ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้ได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงเหมาะกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งมะเร็งและต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยในการบริโภค

2. ในการศึกษาวิจัย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง (*In vivo* model)นอกเหนือจากการศึกษาในหลอดทดลอง (*In vitro* model) เนื่องจากผลที่ได้อาจแตกต่างกันโดยเฉพาะกลไกในการดูดซึม ตัวอย่างเช่น isoquercetin และ rutin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ quercetin ที่มีหมู่น้ำตาลมาเชื่อมต่อตรงตำแหน่งคาร์บอน-3 แต่พบว่าเมื่อบริโภคเข้าไปจะถูกแยกหมู่น้ำตาลออกและถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กเหลือเป็นรูปที่ไม่มีน้ำตาลเกาะ (aglycone)คือ quercetin ดังนั้นสารออกฤทธิ์ที่แท้จริงอาจเป็น quercetin จึงควรมีการศึกษาโดยละเอียดเพิ่มเติมต่อไป

3. จากผลการศึกษาสารสกัดหยาบจากพลูคาวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารฟลาโวนอลคือ quercetin, isoquercetin และ rutin สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจึงควรศึกษากลไกการตายว่าเกิดจากวิถีจากภายใน (mitochondrial-dependent pathway) เช่น การวัดระดับของ caspase-3 และ -9 หรือวิถีจากภายนอก (extrinsic pathway) เช่น การวัดระดับของ caspase-8 และ -9 หรือ การวัดระดับของ anti-CD95 หรือ recombinant TRAIL รวมถึงศึกษาการตายในรูปแบบอื่น ได้แก่ autophagy เนื่องจากในผลการทดลองพบว่า rutin และสารสกัดหยาบจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้โดยวิธี XTT assay และวิธี microscopic analysis แต่ให้ผลการทดสอบในการชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสโดยการวัดปริมาณ phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์น้อยซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสามารถชักนำให้เกิดการตายในรูปแบบอื่นซึ่งจะทำการศึกษาในลำดับต่อไป

4. ในด้านเทคนิคการทดสอบการวัดระดับปริมาณไซโตไคน์ในการศึกษาวิจัยจรั้งนี้พบว่าวิธีการตรวจวัดปริมาณการหลั่งไซโตไคน์นั้นควรวิเคราะห์ด้วยวิธี Bio-plex เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะมากกว่าวิธี ELISA ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณของ IL-6 ในเซลล์ Jurkat นั้นไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในขณะที่วิธี Bio-plex นั้นสามารถตรวจวัดได้ทั้งนี้เป็นเพราะหลักการของทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกัน

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า พลูคาวซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีมากทางภาคเหนือของประเทศไทยสามารถนำมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาหรือป้องกัน โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเนื่องจากในสารสกัดพลูคาวนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวอย่างชัดเจน และลดระดับปริมาณของไซโตไคน์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และ การอักเสบของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

รายการอ้างอิง

[1] Visvader, J.E. Cells of origin in cancer. Nature 469, 7330 (2011): 314-322.

[2] นพดล ศิริธนารัตนกุล. โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=323 [2554, ธันวาคม 12]

[3] Kharfan-Dabaja, M.A., and Bazarbachi, A. Hematopoietic stem cell allografting for chronic lymphocytic leukemia: a focus on reduced-intensity conditioning regimens. Cancer Control 19, 1 (2012): 68-75

[4] Carballido, E., et al. Immunomodulatory drugs and active immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. Cancer Control 19, 1 (2012): 54-67.

[5] Wu, X., Patterson, S., and Hawk, E. Chemoprevention - History and general principles. Best Pract Res Clin Gastroenterol 25, 4 (2011): 445-459.

[6] Antonio, T.M. Cancer origin in committed versus stem cells: Hypothetical antineoplastic mechanism/s associated with stem cells. Critical Reviews in Oncology/Hematology 80,2 (2011): 209-224.

[7] Wierda, W.G., et al. Chronic Lymphocytic Leukemia: New Concepts for Future Therapy. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia 10, 5 (2010): 369-378.

[8] Yang, L., and Jiang, J.G. Bioactive components and functional properties of *Hottuynia cordata* and its applications. Pharmaceutical Biology 47, 12 (2009): 1154-1161.

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

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

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

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

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

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

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

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

[17] Tima S, Phaphuech B, Anuchapreeda S. Cytotoxicity study of *Houttuynia cordata* Thunb crude extracts on HL-60 and Molt4 leukemic cell line. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 43, 1 (2010): 30-38.

[18] Sriwanthana B, et al. *In vitro* effects of Thai medical plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin J Sci.Technol 29, 1 (2007): 18-26.

[19] Ramos, R.Bioactve Phytocompounds. [online]. 2006. Available from: http://www.media weley,com/product_data/excerpt/35273153/3527315306.pdf [2011,December 12]

[20] จตุรวัฒน์ ปวีณวงศ์ชัย. การชักนำการตายแบบอะโพโทซิสและการหลั่งไซโตไคน์ของสารฟลาโวนอยด์จากพลูคาวในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.

[21] จิรายุ เอื้อวรากุล. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์, 2552.

[22] พรเทพ เทียนสิวากุล. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

[23] Passegue, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E., and Weissman, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci USA 100 Suppl 1 (2003): 11842-11849.

[24] Pui, C. H., Robison, L. L., and Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 371, 9617 (2008): 1030-1043.

[25] Druker, B.J.Translation of the Philadelphia chromosome into therapy of CML. Blood 112 (2008): 4808-4817.

[26] Baron, F., Storb, R., and Little, M.T. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. Arch Med Res 34 (2003): 528-544.

[27] Leukemia [online]. 2010. Available from:

http://www.graphicshunt.com/health/images/acute_lymphoblastic_leukemia-157.htm [2011, December 12]

[28] จิรายุ เอื้อวรากุล. อาการทางคลินิกของมะเร็งเม็ดเลือดขาว. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับ เซลล์และโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์. 2552. 63-70.

[29] Leukemia [online]. 2010. Available from:

http://www.trialx.com/curebyte/2011/07/10/images-related-to-acute-myelogenous-leukemia.[2012,March 2]

[30] Path Wiki. HemaSlide23 [online]. 2011. Available from:

http://pathwiki.pbworks.com/w/page/14674003/HemaSlide23. [2012, March 21]

[31] Haematological Malignancy Diagnostic Service. The Chronic Myeloproliferative Disorders [online]. 2003. Available from: http://www.hmds.org.uk/mpd.html. [2012, March 21]

[32] Leukemia [online]. 2010. Available from: http://www. medicalook.com/Blood_disorders/Chronic_Myelocytic_Leukemia.html. [2012,March 2]

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

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

[35] นพดล ศิริธนารัตนกุล. โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=323 [2554, ธันวาคม 12].

[36] Leukemia [online]. 2010. Available from:

http://www.medicinenet.com/leukemia/article.htm [2011, December 12].

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

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

[39] ภัทรา นันทวัน. Chemical carcinogens induce leukemi. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. พิมพ์ครั้ง ที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. 17-28.

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

[41] สาคร พรประเสริฐ. มะเร็งเม็ดเลือดขาว. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่: ดาราววรรณการพิมพ์. 2552.1-98.

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

[43] สถาบันวิจัยสมุนไพร. ผักคาวตอง [ออนไลน์]. 2552 แหล่งที่มา: http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/Plant/MPRI/Q_Houttuynia.shtm. [2554, ธันวาคม 9]

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

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

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

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

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

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

[50] Prasad, S., Phromnoi, K., Vivek, R., Madan, M.C., and Aggarwal B. Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoids for Prevention and Treatment of cancer. Planta Med 76 (2010): 1044-1063.

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

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

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

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

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

[56] Seifried HE., Anderson DE., Fisher EI., et al. 2007. A review of the interation among dietary antioxidant and reactive oxygen spicies. Journal of N Biochemistry 18 (2007): 567-579

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

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

[59] Aggarwal, B.B., Kuiken Van, M.E., Iyer, L.H., Harikumar, K.B., and Sung, B. Molecular Targets of Nutraceuticals Derived from Dietary Spices: Potential Role in Suppression of Inflammation and Tumorigenesis. Exp Biol Med 234, 8 (2009): 825-849.

[60] Gupta, S.C., Kim, J.H., Prasad, S., and Aggarwal, B.B. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. Cancer Metastasis Rev 29 (2010): 405-434

[61] Malgorzata, M. Quercetin and Its derivative: Chemical structure and Bioactivity – A review. Pol J Food Nutr Sci 58, 4 (2008): 407-413

[62] Guo, Y.H., and Xu, Y.J. Extraction and purification of *Houttuynia cordata* flavonoids and identification of flavonoids type. Food Sci (2007): 287-291

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[91] Burz, C., et al. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy target. Acta Oncologiga 48, 2 (2009): 811-821.

[92] Russo, M., et al. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. Biochemical Pharmacology 80 (2010): 674-682

[93] Burz, C., et al., Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. Acta Oncol 48, 6 (2009): 811-821

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

.

ภาคผนวก

แบบรายงานผลการพิสูจน์ชนิดของพลูคาว

แบบขอใช้บริการพิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 6 / 2555 วันที่ 12 สิงหาคม 2555

1. ชื่อผู้ขอใช้บริการ นางสาว เชาวณี วังช่วย (Miss CHAOWANEE WANGCHUAY)
2. ที่อยู่ [illegible] คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   โทรศัพท์ติดต่อ 081-8273553 โทรสาร ...

   E-mail ch_mouse@hotmail.com
3. วัตถุประสงค์การขอใช้บริการ
   - ☑ ตรวจระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์ไม้ จำนวน 1 ตัวอย่าง
   - ☐ สอบถามข้อมูลพันธุ์ไม้
   - ☑ ทำ Voucher Specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง
   - ☐ อื่นๆ (พลูคาว จาก จังหวัด ลำพูน)

ลงชื่อ เชาวณี วังช่วย
(เชาวณี วังช่วย)
ผู้ขอใช้บริการ

แบบรายงานผล

เลขที่ 6 / 2555 วันที่ 10 พฤษภาคม 2555

รายการงานที่ทำ ตรวจระบุชื่อวิทยาศาสตร์ และทำ Voucher specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ / สืบค้นข้อมูล

ชื่อไทย : พลูคาว ผักคาวทอง ผักคาวตอง พลูผก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Houttuynia cordata* Thunb.

ชื่อวงศ์ : Saururaceae

Herbarium Number : 013515 (BCU)

Collector Number : Chaowanee Wangchuay 1

ค่าบริการ 200 บาท (=สองร้อยบาทถ้วน=)

ลงชื่อ [signature]
([illegible])
ผู้ให้บริการ

การเตรียมสารเคมี

- อาหารเลี้ยงเซลล์

- RPMI-1640	90 มิลลิลิตร
- fetal bovine serum	10 มิลลิลิตร
- 1% L-glutamine	1 มิลลิลิตร
- 100x penicillin-streptomycin	1 มิลลิลิตร

- สารละลาย XTT 1 mg/ml

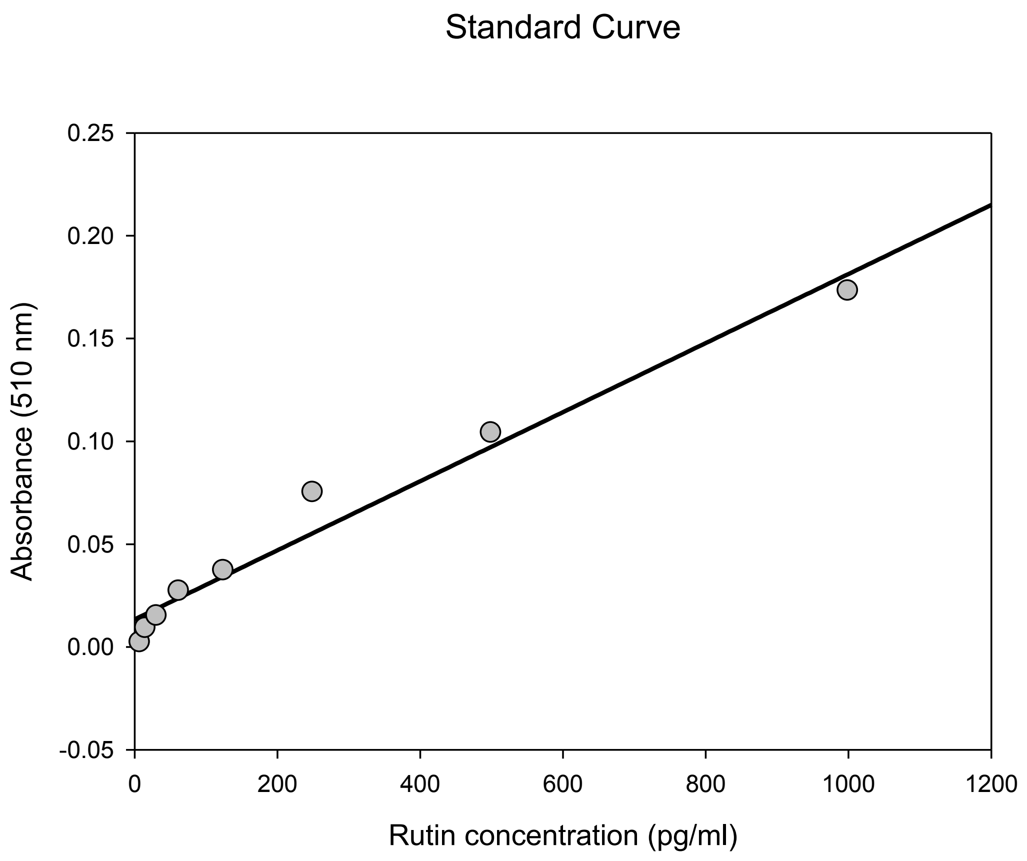
- XTT	5 มิลลิกรัม
- PMS	0.5 มิลลิกรัม
- RPMI-1640	5 มิลลิลิตร

- Phosphate buffer saline

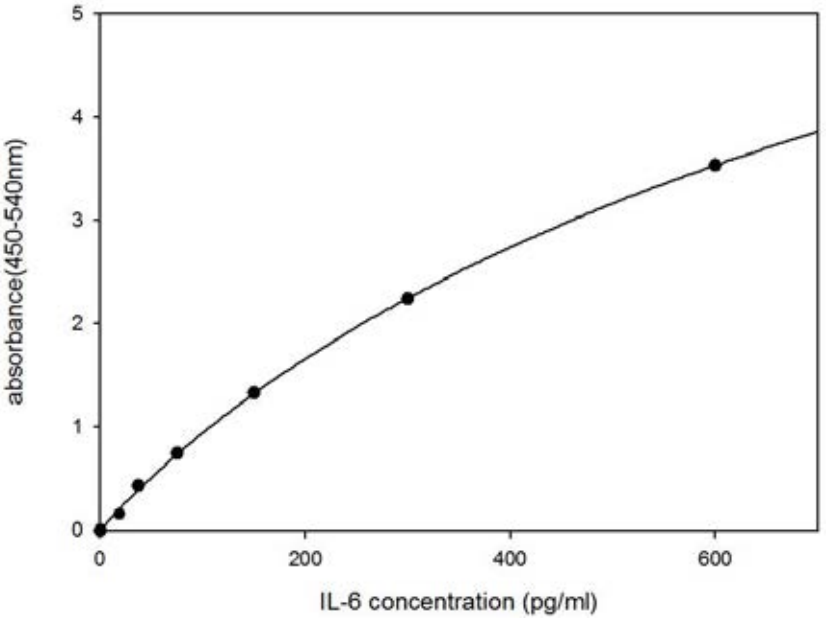
- NaCl	8 กรัม
- KCl	0.2 กรัม
- Na_2HPO_4	1.15 กรัม
- KH_2PO_4	0.20 กรัม

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

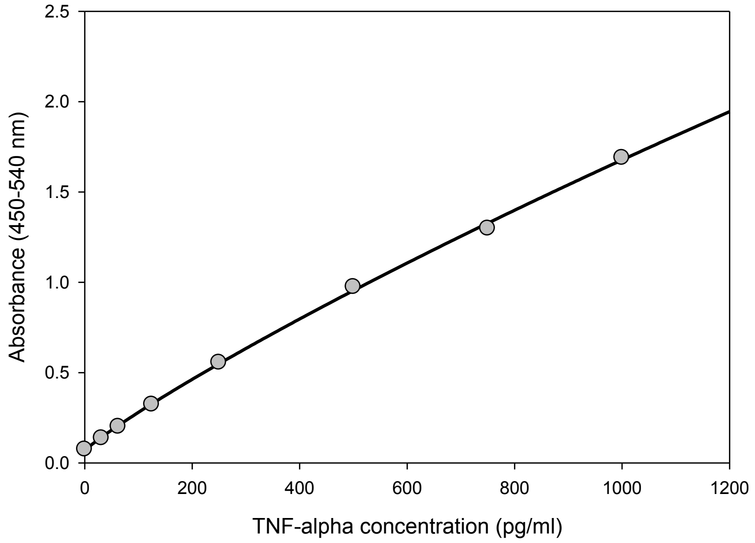
กราฟมาตรฐาน



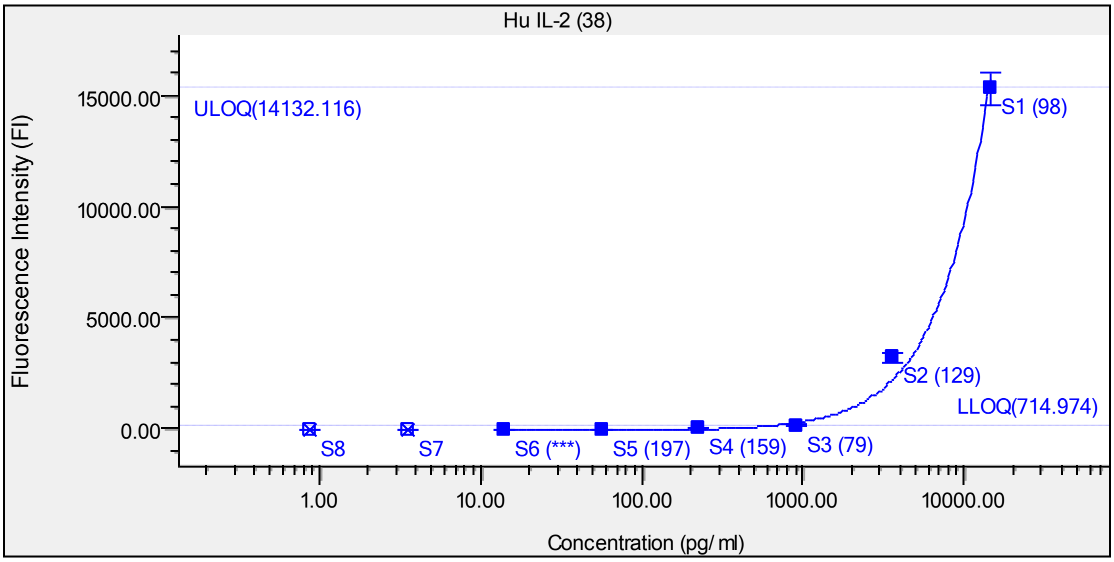
ภาพที่ 70 กราฟมาตรฐานของ rutin ในการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากพลูคาว โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay



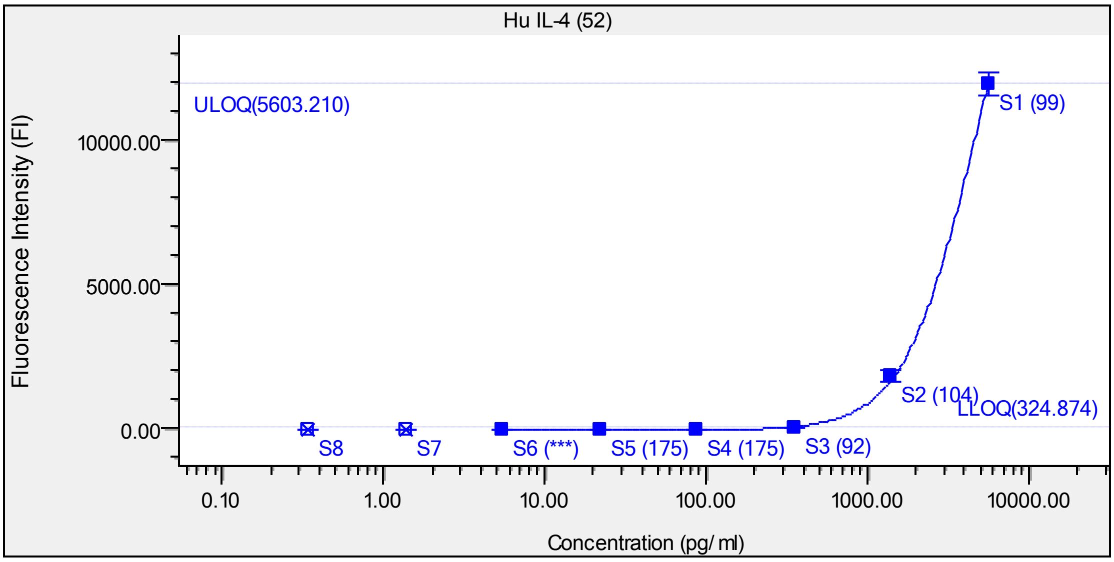
ภาพที่ 71 กราฟมาตรฐานของ IL-6 ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA



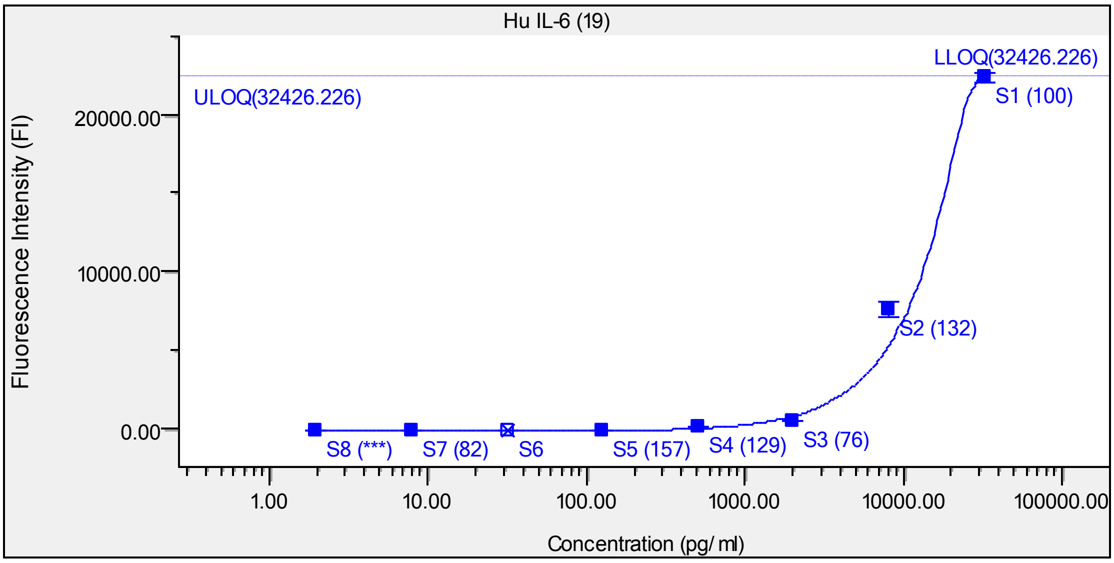
ภาพที่ 72 กราฟมาตรฐานของ TNF-α ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA



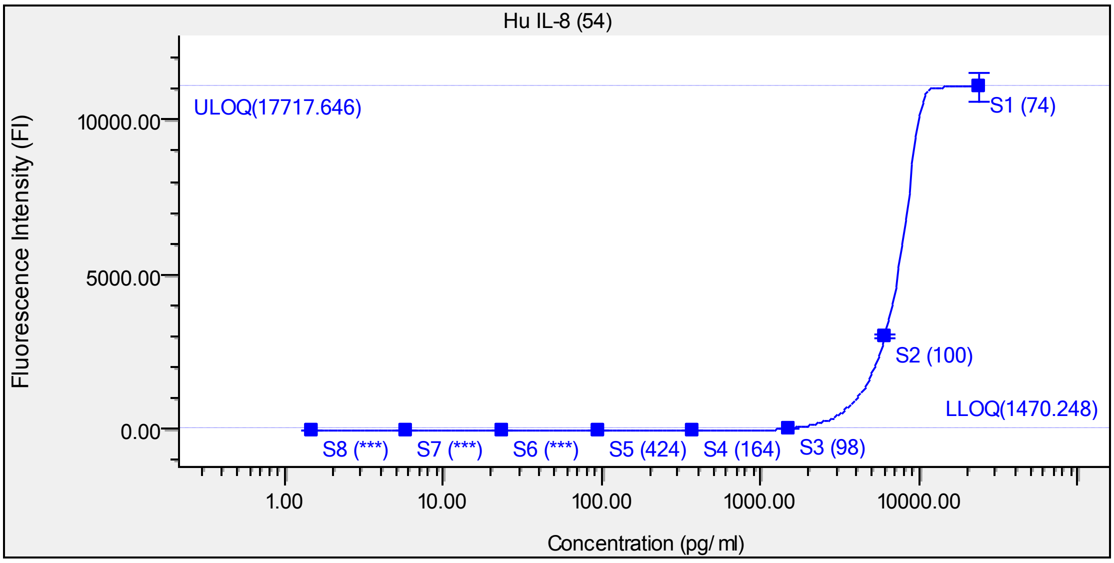
ภาพที่ 73 กราฟมาตรฐานของ IL-2 ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



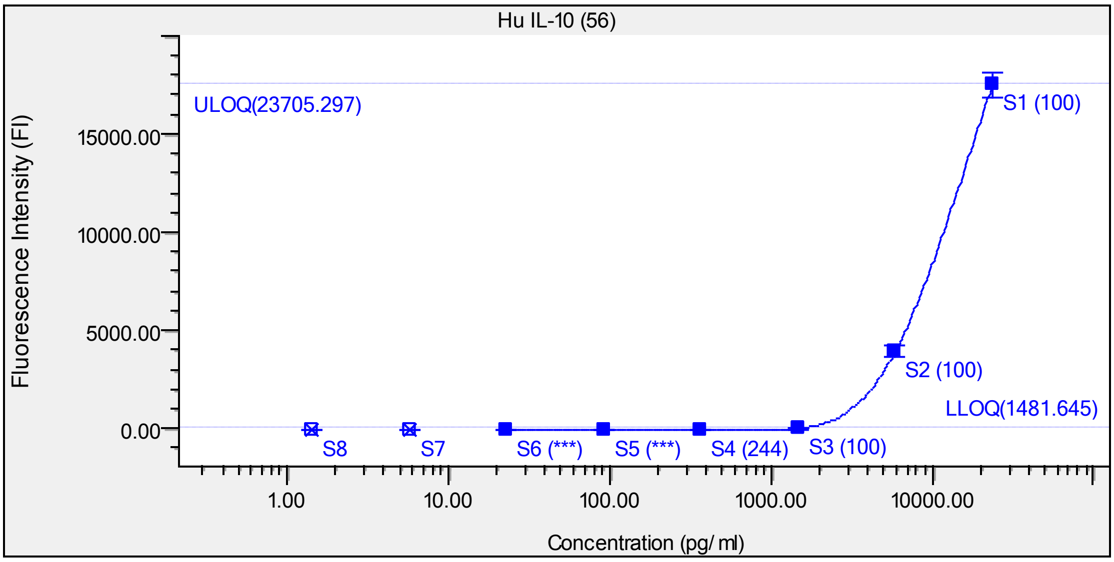
ภาพที่ 74 กราฟมาตรฐานของ IL-4 ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



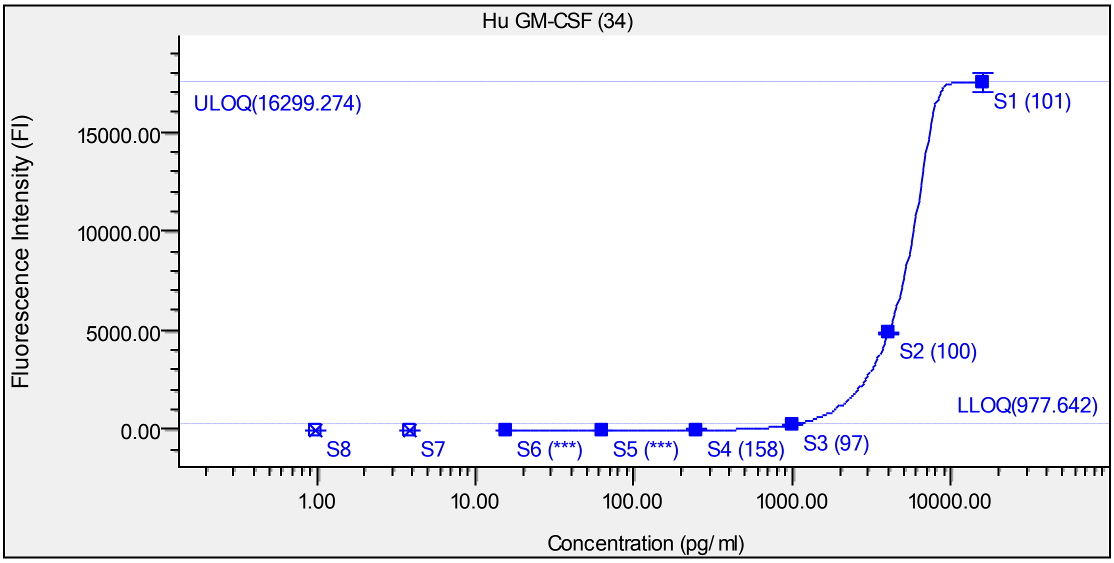
ภาพที่ 75 กราฟมาตรฐานของ IL-6 ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



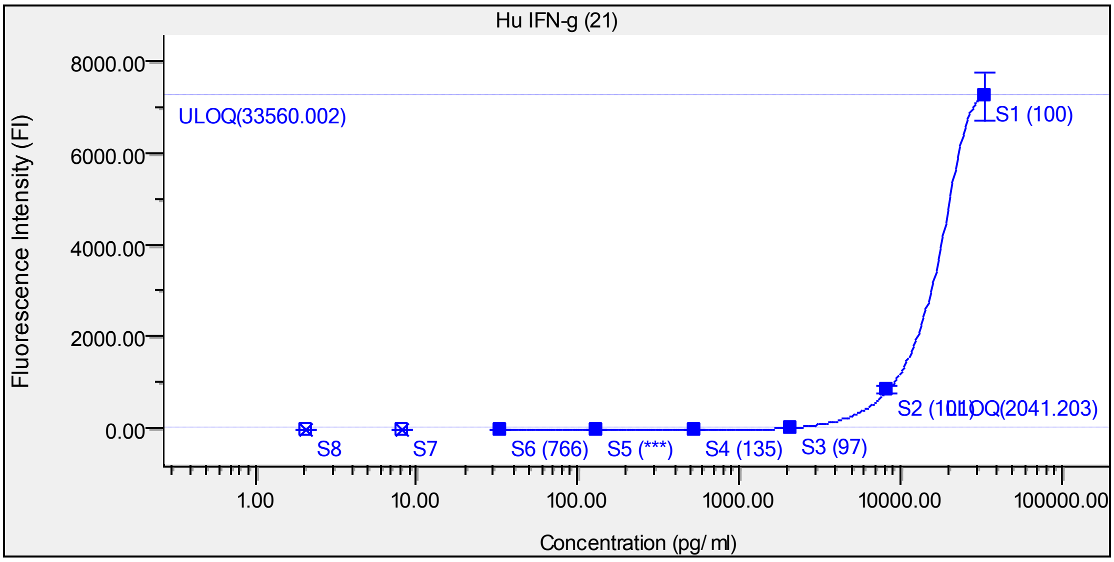
ภาพที่ 76 กราฟมาตรฐานของ IL-8 ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



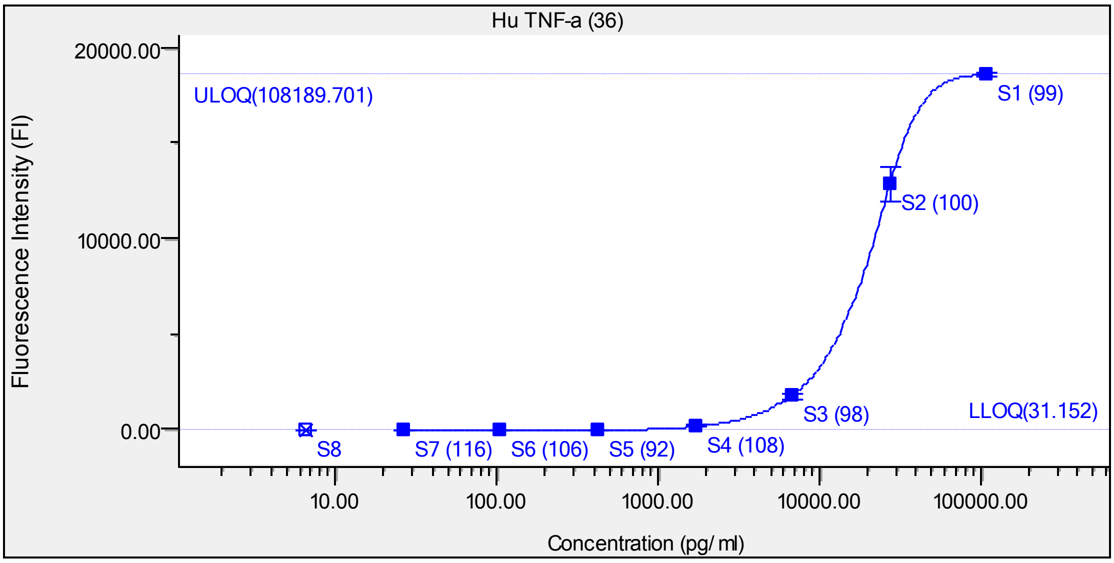
ภาพที่ 77 กราฟมาตรฐานของ IL-10 ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



ภาพที่ 78 กราฟมาตรฐานของ GM-CSF ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



ภาพที่ 79 กราฟมาตรฐานของ IFN-γ ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex



ภาพที่ 80 กราฟมาตรฐานของ TNF-α ในการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี Bio-Plex

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเชาวณี วังช่วย เกิดเมื่อ วันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และปฏิบัติงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และลาศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา ทุนอุดหนุนเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 18 ครั้งที่ 2/2555