

Thesis Title	Effect of Turmeric Curcuminoids on <i>Wilms' tumor1</i> (<i>WT1</i>) Gene and WT1 Protein Expression in Leukemic Cell Lines	
Author	Mr. Singkome Tima	
Degree	Master of Science (Medical Technology)	
Thesis Advisory Committee	Dr. Songyot Anuchapreeda	Chairperson
	Lect. Prasit Chanarat	Member
	Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Limtrakul	Member
	Assist. Prof. Dr. Chadarat Duangrat	Member

ABSTRACT

Leukemias are groups of hematological malignancies with frequent incidence and high mortality rate in patients worldwide. Previous studies showed that *Wilms' tumor1* (*WT1*) gene is highly expressed in leukemic blast cells from leukemia patients. Highly expression of *WT1* gene and WT1 protein correlates with poor prognosis in acute leukemia. Curcuminoids, major active components of the food flavor turmeric (*Curcuma longa* Linn.); consist of curcumin (pure curcumin), demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin that exhibit numerous biological properties. This study aims are to investigate the effect of curcuminoids on *WT1* gene expression and search for a curcuminoid derivative that shows the strongest inhibitory effect on *WT1* gene expression in leukemic cell lines; human erythroid leukemia (K562), human promyeloid leukemia (HL-60), human monocytic leukemia (U937), and human lymphoblastic leukemia (Molt4). MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of turmeric curcuminoids at various concentrations on four leukemic cell lines. The result showed that all curcuminoid derivatives were toxic to all cell lines in a dose dependent manner. The levels of WT1 mRNA and WT1 protein in leukemic cell lines were

assessed by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. It was found that the levels of WT1 mRNA were detected in all 4 types of leukemic cell line. However, the WT1 protein levels were found only on K562 and Molt4 cell lines. To determine the effect of three turmeric curcuminoids including commercial grade curcuminoid (Sigma-Aldrich) and in-house curcuminoids on *WT1* gene expression, all leukemic cell lines were treated with non-cytotoxic concentration (10 μ M) of curcuminoids for 2 days. It was found that all curcuminoids derivatives decreased the WT1 mRNA levels and WT1 protein levels in leukemic cell lines. However, pure curcumin exhibited an excellent inhibitory effect on WT1 mRNA levels in K562, U937, HL-60, and Molt4 by 59, 43, 37, and 17%, respectively, compared with the vehicle control. In addition, WT1 protein levels were decreased by 48 and 90% in K562 and Molt4, respectively. The WT1 mRNA levels in K562 after treated with non-cytotoxic levels pure curcumin (5, 10, and 15 μ M) for 2 days were decreased by 15, 28, and 50%, in U937 were 10, 17, and 19%, in HL-60 were 5, 11, and 18%, and in Molt 4 cells were 6, 19 and 21%, compared with the vehicle control. WT1 protein levels in K562 cells were decreased by 17, 37 and 81% and in Molt4 cell line were 56, 79, and 94% in response to treatment with 5, 10, and 15 μ M pure curcumin, respectively. In addition, treatment with pure curcumin at 10 μ M for day 1, 2, and 3 significantly decreased the levels of WT1 mRNA in K562 cells by 37, 48, and 54%, in U937 were 13, 33, and 63%, in HL-60 were 4, 8, and 30%, and in Molt4 cells was 7, 11, and 16%, respectively, compared with the vehicle control. Moreover, WT1 protein levels in K562 cells were decreased by 50, 92, and 99% and in Molt4 cell line were 53, 84, and 92% in response to treatment with 10 μ M pure curcumin for 1, 2, and 3 days, respectively. In summary, pure curcumin, an excellent curcuminoid derivative, decreased *WT1* gene expression in both transcriptional and translational levels in both dose and time-dependent manner. Thus, pure curcumin can be used as a promising chemotherapeutic agent in human leukemic cancer.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ผู้เขียน นายสิงห์คำ ชีมา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.ดร. ทรงยศ	อนุชปรีดา	ประธานกรรมการ
อ. ประสิทธิ์	ชนะรัตน์	กรรมการ
รศ.ดร. พรงาม	ลี้มตระกูล	กรรมการ
ผศ.ดร. ชฎารัตน์	ดวงรัตน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมียเป็นกลุ่มของมะเร็งทางโลหิตวิทยาที่พบได้บ่อยและมีอัตราการตายสูงในผู้ป่วยทั่วโลก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (*WT1*) ระดับสูงในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนของผู้ป่วยลิวคีเมีย การแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน และโปรตีนในระดับสูงยังมีความสัมพันธ์กับการทำนายอาการที่รุนแรงขึ้นของมะเร็งเม็ดเลือดขาว เคอร์คิวมินอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ประกอบด้วย เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ซึ่งมีคุณสมบัติในทางชีวภาพที่หลากหลาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของเคอร์คิวมินอยด์ ว่าชนิดใดให้ผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันที่ดีที่สุด ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด human erythroid leukemia (K562), human promyeloid leukemia (HL-60), human monocytic leukemia (U937) และ human lymphoblastic leukemia (Molt4) การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น การตรวจวัดระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทดสอบโดยวิธี RT-PCR และ Western blot ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบ

เซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ แต่การแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันพบได้ในเซลล์ K562 และ Molt4 เท่านั้น การศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดรวมทั้งเคอร์คิวมินอยด์รวมจากบริษัทซิกมา-อัลดริชและเคอร์คิวมินอยด์รวมที่สกัดเองในห้องปฏิบัติการ ลดระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ และยังพบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินบรียูทรี มีฤทธิ์ในการยับยั้งระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ได้ดีที่สุด ในเซลล์ K562, U937, HL-60 และ Molt4 คือ 59, 43, 37, และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้เคอร์คิวมินบรียูทรียังสามารถลดระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 และ Molt4 ได้ 48 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับอีกด้วย การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดเคอร์คิวมินบรียูทรีต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้ความเข้มข้น 5, 10, และ 15 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นเวลา 2 วัน ผลการทดลองพบว่าระดับของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ในเซลล์ K562 มีค่าลดลง 15, 28, และ 50 เปอร์เซ็นต์, U937 มีค่าลดลง 10, 17, และ 19 เปอร์เซ็นต์, HL-60 มีค่าลดลง 5, 11, และ 18 เปอร์เซ็นต์ และ Molt4 มีค่าลดลง 6, 19, และ 21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ลดลง 17, 37, และ 81 เปอร์เซ็นต์ และ Molt4 ลดลง 56, 79, และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินบรียูทรีที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 1, 2, และ 3 วัน ผลการทดลองพบว่า เคอร์คิวมินบรียูทรีสามารถลดการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ตามระยะเวลาโดยในเซลล์ K562 ลดลง 37, 48, และ 54 เปอร์เซ็นต์, เซลล์ U937 ลดลง 13, 33, และ 63 เปอร์เซ็นต์, เซลล์ HL-60 ลดลง 4, 8, และ 30 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ Molt4 ลดลง 7, 11, และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในทำนองเดียวกันยังพบว่าระดับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ลดลง 50, 92, และ 99 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ Molt4 ลดลง 53, 84, และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดเคอร์คิวมินบรียูทรีสามารถลดระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันได้ทั้งในระดับของการถอดรหัส (Transcription) และระดับของการแปลรหัส (Translation) ได้ดีที่สุด และสามารถลดตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ที่จะนำการศึกษานี้มาทำการศึกษาต่อในทางคลินิก เพื่อพัฒนาสารสกัดเคอร์คิวมินมาใช้เป็นยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยได้ต่อไป