

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากใบมะกรูด (<i>Citrus hystrix</i> DC.) ต่อวัฏจักรของเซลล์ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562 และ Molt4	
ผู้เขียน	นางสาว วิภาวี อุทรวัง	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. ศิริพร โอโกโนกิ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นความผิดปกติของการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือด สาเหตุเกิดจากการมีความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูก ทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดอย่างควบคุมไม่ได้ ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยยาเคมีบำบัด เป็นวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการใช้ยาเคมีบำบัด การนำพืชที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งจึงถูกนำมาใช้เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว การศึกษานี้ ใบมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) เป็นตัวเลือกหนึ่งของพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากใบมะกรูดต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและการพักตัวในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) รวมถึงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ดังกล่าวในเซลล์ K562 (human chronic myelogenous leukemia) และ Molt4 (human acute lymphoblastic leukemia) โดยใช้สารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากใบมะกรูด หมายเลข 9, 10 และ 11 (F9, F10 และ F11) ที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน (hexane fractional extract) มาศึกษา เนื่องจากให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ดีจากการศึกษาเบื้องต้นที่ผ่านมา ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วน หมายเลข 9, 10 และ 11 มาศึกษาผลต่อวัฏจักรเซลล์ในเซลล์ K562 และ Molt4 โดยวิธีโฟลโวลูมิเมตรี และศึกษาผลของสารต่อโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ โดยวิธีเวสเทิร์น บลอต การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนทั้ง 3 หมายเลขโดยวิธีเอ็มทีที จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ K562 และ Molt4 โดยในเซลล์ K562 มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 32.0 ถึง 80.0 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนในเซลล์ Molt4 20.8 ถึง 24.5 $\mu\text{g/mL}$ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดแยกบริสุทธิ์

บางส่วนหมายเลข 9 ถูกเลือกมาเพื่อการศึกษาต่อ เนื่องจากให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดีในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิด ค่า IC_{20} (ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์) ของสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วน หมายเลข 9 ถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารต่อการพักตัวในวัฏจักรเซลล์โดยวิธีโฟลไซโตเมทรีและโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์โดยวิธีเวสเทิร์น บลอต สารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วน หมายเลข 9 ที่ความเข้มข้น 10.0 และ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ มีผลทำให้เซลล์ K562 และ Molt4 สะสมอยู่ในระยะ G2/M โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วน หมายเลข 9 ต่อโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ในระยะ G2/M ผลการทดลองพบว่าสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วน หมายเลข 9 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน p53 ได้ในทั้งเซลล์ K562 และ Molt4 ซึ่งผลที่เกิดขึ้นทำให้สามารถยับยั้งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2/M โดยวิธีเวสเทิร์น บลอต นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วน หมายเลข 9 ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ไซคลินเอ (cyclin A) ไซคลินบี (cyclin B) และซีดีซีทู (cdc2) และ ซึ่งเป็นไปตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษานี้ได้อีกความรู้ใหม่ที่สามารถบอกกลุ่มของสารออกฤทธิ์ที่พบในสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากใบมะกรูดต่อวัฏจักรเซลล์ โดยองค์ความรู้ใหม่นี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อการพัฒนาสำหรับการรักษาแบบผสมผสานหรือแพทย์ทางเลือก สำหรับการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไปในอนาคต หรืออาจจะนำไปใช้ในการรักษาร่วมกับยาเคมีบำบัดเพื่อลดผลข้างเคียงจากยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว

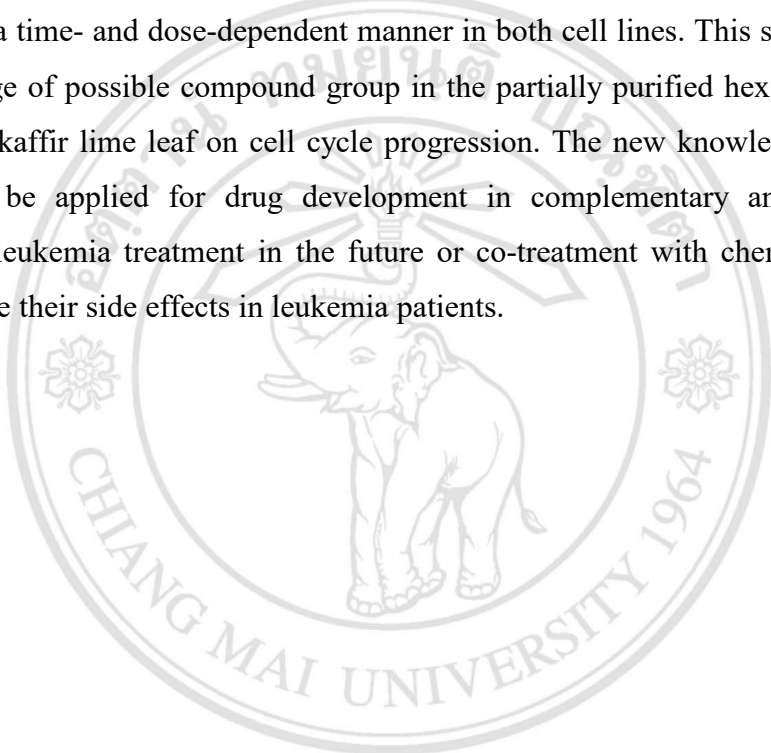
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Effects of Partially Purified Fractions of Kaffir Lime (<i>Citrus hystrix</i> DC.) Leaf on Cell Cycle in K562 and Molt4 Leukemic Cell Lines	
Author	Miss Wipavee Utthawang	
Degree	Master of Science (Medical Technology)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Co-advisor

ABSTRACT

Leukemia is a hematopoietic disorder of hematopoietic stem cells in bone marrow and results in uncontrolled leukemic blood cell proliferation. Nowadays, chemotherapy is an effective method and is widely used for leukemia treatment. To avoid severe side effects of chemotherapeutic drugs, plants having anticancer activity are an alternative choice for leukemia patients. In this study, kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) leaf is a choice of Thai traditional medicine plant. This study aims to investigate anti-proliferative effects of partially purified fractions of kaffir lime leaf and to examine their activity on cell cycle arrest as well as cell cycle regulatory proteins at related phase after treatments in K562 (human chronic myelogenous leukemia) and Molt4 (human acute lymphoblastic leukemia) leukemic cell lines. The partially purified fraction No. 9, 10, and 11 (F9, F10, and F11) from hexane fractional extract were examined due to their anti-leukemic activity observed in a previous study. Therefore, the partial purified fraction No. 9, 10, and 11 were further examined their effects on cell cycle progression in K562 and Molt4 leukemic cell models by flow cytometry. The effects on regulatory proteins were determined by Western blot analysis. The cytotoxic effects of three purified fraction No. 9, 10, and 11 were studied by MTT assay. The result showed that three purified fractions showed cytotoxic effects on K562 and Molt4 cell lines with IC₅₀ values ranging from 32.0 to 80.0 µg/mL in K562 cells and 20.8 to 24.5 µg/mL in Molt4 cells. The purified fraction No. 9 was selected for further experiment due to the good

effective in both leukemic cells. IC₂₀ values (non-cytotoxic doses) of purified fraction No. 9 were used for cell cycle arrest study by flow cytometer and cell cycle protein control by Western blot analysis. The purified fraction No. 9 with the concentrations of 10.0 and 2.5 µg/mL could increase K562 and Molt4 cell populations and arrest both cells at G2/M phases by flow cytometer at 48 h, respectively. It also induced p53 level in K562 and Molt4 cells. This phenomenon indicated that cell cycle progression was inhibited at G2/M phases. Moreover, it inhibited cyclin A, cyclin B, and cdc2 protein expression in a time- and dose-dependent manner in both cell lines. This study provides new knowledge of possible compound group in the partially purified hexane fractional extracts from kaffir lime leaf on cell cycle progression. The new knowledge from this study should be applied for drug development in complementary and alternative medicine for leukemia treatment in the future or co-treatment with chemotherapeutic drugs to reduce their side effects in leukemia patients.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved