Thesis Title Effect of *Garcinia mangostana* Linn. Fraction Extracts on *Wilms' tumor1* Gene and Wilms' tumor1 Protein Expression in Leukemic Cell Lines

Author Mr. Mongkon Srikamchoom

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Member
Dr. Nutjeera Intasai	Member
Dr. Tanyarat Jomgeow	Member

ABSTRACT

Leukemia is a disease that affects blood forming cells in the body, and is characterized by an abundance of abnormal white blood cells. Leukemia originates in the blast cells of bone marrow and spreads to other parts of the body. Leukemia can be found in both children and adults. An effective cure for leukemia has not yet been found. Currently, chemotherapy is the most common treatment for leukemia. However, since chemotherapy causes many side effects, researchers are seeking active medicinal agents from alternative sources of natural products. This study aims to investigate the cytotoxic effects of mangosteen peel fraction extracts on four leukemic cell lines (K562, U937, Molt4, and HL-60) using the MTT assay as well as the effects of the extracts on *Wilm's tumor 1* gene and WT1 protein expression using RT-PCR techniques and Western blot analysis. The ethyl acetate fraction of mangosteen peel extract is shown to have the greatest cytotoxic effect on 3 leukmic cell lines (Molt4,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

U937, and HL-60). However the hexane fraction had the highest cytotoxic effect on the K562 cell line as compared to the vehicle control. To determined the effects of 4 mangosteen peel fraction extracts (ethanol, ethyl acetate, butanol, and hexane) on *WT1* gene expression, all leukemic cell lines were treated with non-cytotoxic concentrations (IC_{20}) for 2 days. The ethyl acetate fraction lowered WT1 mRNA levels in K562 by 39% while the butanol fraction had the strongest inhibitory effect on HL-60 (43%). However, the ethanol fraction had the strongest inhibitory effect on U937 and Molt4 (35 and 44%, respectively). When dose and time dependent responses were studied, the WT1 mRNA levels in K562 after being treated with non-cytotoxic doses of the ethyl acetate fraction (5, 10, and 15 µg/ml) for 2 days were decreased by 48, 60, and 66%, respectively. In HL-60 with non- cytotoxic doses of the butanol extract (15, 20, and 25 µg/ml), WT1 mRNA levels were decreased by 7, 51, and 62%, respectively. In U937 with non-cytotoxic doses of the ethanol fraction (3, 5, and 10 µg/ml), the WT1 mRNA levels were decreased by 18, 26, and 34%, respectively. In Molt4 with ethanol fraction (3, 7, and 10 µg/ml) the corresponding decreases were by 15, 20, and 56%, respectively as compared to the vehicle control. In addition, the WT1 mRNA levels in K562 cells after being treated with 10 µg/ml of the ethyl acetate extract for 1, 2, and 3 days significantly decreased the levels of WT1 mRNA by 5, 8, and 17%, respectively. In HL-60 cells treated with 20 µg/ml of the butanol, the corresponding decreases were by 15, 24, and 32%, respectively. In U937 cells treated with 5 µg/ml of the ethanol fraction, the same levels were decreased by 4, 13, and 21%, respectively. In Molt4 cells treated with 7 µg/ml of the ethanol fraction, the same levels were decreased by 8, 14 and 28%, respectively as compared to the vehicle control. Moreover, WT1 protein levels in K562 cells after being treated with the ethyl acetate fraction using doses of 5, 10, and 15 µg/ml were decreased by 16, 42, and 67%, respectively. In Molt4 cells after being treated with the ethanol fraction using doeses of 3, 7, and 10 µg/ml, the corresponding levels were decreased by 16, 35, and 44%, respectively. WT1 protein levels in K562 cells after being treated with ethyl acetate fraction for 1, 2, and 3 days were decreased by 12, 26, and 43%, and in Molt4 treated with the ethanol fraction the corresponding levels were 24, 34, and 52%. Thus, mangosteen peel extracts are promising anti–leukemic agents and should be further analyzed for their active compounds

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ผู้เขียน นายมงคล ศรีคำชุม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเศวต	กรรมการ
อ. ดร. ณัฐจีรา อินต๊ะใส	กรรมการ
อ. ดร. ธัญญารัตน์ จอมแก้ว	กรรมการ

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการสร้างเซลล์เม็ดเลือดในร่างกายซึ่งจะทำให้มีปริมาณของเม็ดเลือดขาวที่มากกว่าปกติ โดยมีต้นกำเนิดมาจากไขกระดูกและสามารถแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกายได้ สามารถเกิดขึ้นได้ในทั้งเด็กและผู้ใหญ่ และยังไม่มีการรักษาที่ได้ผลแน่นอน ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวส่วนใหญ่จะใช้วิธีเคมีบำบัด แต่อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยวิธีนี้ ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะใช้สารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งพบว่ามีผลข้างเคียงที่น้อยกว่า ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่ทำการสกัดแยกส่วน ต่อความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว 4 ชนิด คือ K562, Molt4, U937 และ HL-60 ด้วยวิธี MTT และฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ทำการสกัดแยกส่วนต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันด้วยวิธี RT-PCR และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Western blot ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดแยกด้วยเอทธิลอะซิเตต สามารถทำลายเซลล์ได้ดีที่สุดในเซลล์ Molt4, U937 และ HL-60 ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดแยกด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ได้ดีที่สุดในเซลล์ K562 ในการหาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน จากสารสกัดหยาบที่แยกด้วย เอทธานอล เอทธิลอะซิเตต บิวทานอล และ เฮกเซน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่ค่า IC_{20} เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562ได้ดีที่สุดคือ 39% ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่ถูกแยกด้วยบิวทานอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ HL-60 ได้ดีที่สุดคือ 43% อย่างไรก็ตามในเซลล์ U937 และ Molt4 นั้นสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่ถูกแยกด้วยเอทธานอลจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนส์วิล์มทูเมอร์วันได้ดีที่สุดคือ 35 และ 44% ตามลำดับ ในการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดและระยะเวลา ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน พบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 ได้ 48, 60, และ 66% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยบิวธานอล ที่ความเข้มข้น 15, 20 และ 25 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ HL-60 ได้เท่ากับ 7, 51 และ 62% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่ถูกแยกด้วยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ U937 ได้เท่ากับ 18, 26 และ 34% ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 3, 7 และ 10 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ Molt4 ได้เท่ากับ 15, 20 และ 56% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ในทำนองเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากเปลือกมังคุด ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่าสามารถมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน เพิ่มขึ้นในเซลล์ โดยในเซลล์ K562 เมื่อทดสอบด้วยเอทธิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 10 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ เท่ากับ 5, 8, และ 17% ตามลำดับ ในเซลล์ HL-60 ที่ทดสอบด้วยบิวธานอล ที่ความเข้มข้น 20 μg/ml คือ 15, 24 และ 32% ตามลำดับ ในเซลล์ U937 ด้วยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 5 μg/ml คือ 4, 13 และ 21% และเซลล์ Molt4 ด้วยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 7 μg/ml คือ 8, 14 และ 28% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นเมื่อทดสอบฤทธิ์ต่อการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และ Molt4 พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตและเอทธานอลสามารถยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16, 42 และ 67% และ 16, 35 และ 44% ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน พบว่าสามารถยับยั้งได้ 12, 26 และ 43% และ 24, 34 และ 52% ตามลำดับ ตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความหวังที่จะนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวจึงมีความเป็นไปได้สูงในอนาคต และควรต้องมีการศึกษาหาสารสำคัญในเปลือกมังคุดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved