Thesis Title Effects of Crude Kaffir Lime Leaf Fractional Extracts on *Wilms' Tumor1* Gene and Wilms' Tumor1 Protein Expression in Leukemic Cell Lines

Author Miss Fah Chueahongthong

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchpreeda Advisor

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate Co-advisor

Lect. Dr. Nutjeera Intasai Co-advisor

Lect. Dr. Tanyarat Jomkeow Co-advisor

ABSTRACT

Leukemia is a hematologic malignancy characterized by an abnormal increase of cancerous blood cells, especially white blood cells. Previous studies have shown that overexpression of both *Wilms' tumor 1* (*WT1*) gene and WT1 protein are associated with leukemogenesis. Currently, chemotherapy is effective and is widely used for leukemia treatment. The main target of most chemotherapeutic drugs is abnormal fast-dividing cells, with the results that cells dividing in normal circumstances are affected as well. To reduce the side effects from chemotherapy, natural substances from medicinal plants having anticancer activity and that are expected to have fewer side effects than chemotherapeutic drugs are of interest for developing a new anti-leukemic drugs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Cytotoxic effects of essential oil and extracts from kaffir lime leaf on cancer cells have been reported. Thus, this study aimed to investigate the cytotoxic effect and inhibitory effect of crude kaffir lime leaf fractional extracts on *WT1* gene and WT1 protein expression, and to search for the fraction with the highest inhibitory effect on *WT1* gene and WT1 protein expression in K562, Molt4, U937, and HL60 cell lines. Kaffir lime leaf fractions were extracted by ethanol, hexane, ethyl acetate, n-butanol, and methanol. The cytotoxic effect was determined via the MTT assay. The inhibitory effect of extracts on *WT1* gene and WT1 protein expression in leukemic cell lines were assessed by real-time PCR and Western blot analysis, respectively. Ethyl acetate and hexane fractions of crude kaffir lime leaf fractional extracts had the strongest cytotoxic effect on K562, Molt4, U937, and HL60 cells. The ethyl acetate fraction had the highest cytotoxicity, with the IC_{50} values of 19.0±0.6, 35.3±1.4, 21.8±0.4, and 19.8±1.0 µg/mL, respectively. Ethanol and n-butanol fractions had lesser cytotoxic effect, while the methanol fraction had no cytotoxic effect on the four leukemic cell lines. The study of *WT1* gene and WT1 protein expression showed that the hexane fractional extract had the greatest inhibitory effect on both *WT1* gene and WT1 protein expression in all leukemic cell lines. It reduced WT1 mRNA levels in K562, Molt4, U937, and HL60 with inhibitory values of 60, 51, 42, and 56%, respectively, as compared to the vehicle control. For WT1 protein expression, the hexane fractional extract decreased WT1 protein levels by 61% and 32% in K562 and Molt4 cell lines, respectively, as compared to the vehicle control. WT1 expression in U937 and HL60 cell lines couldn't be detected by this method. Dose- and time-dependent inhibitory effect of hexane fractional extract on *WT1* gene and WT1 protein expression

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were investigated in K562 cell line as a cell model. The hexane fraction at the concentrations of 5, 10, 15, and 20 µg/mL decreased WT1 mRNA levels by 25, 36 42, and 48%, and WT1 protein levels by 7, 21, 39, and 63% , respectively, as compared to the vehicle control. Moreover, the hexane fraction at the concentration of the IC_{20} decreased WT1 mRNA levels by 18, 38, and 43%, and WT1 protein levels by 7, 34, and 66% at 1, 2, and 3 days of incubation, respectively. Crude kaffir lime leaf hexane fractional extract may thus be a promising source of anti-leukemic drugs. The active compound responsible should be identified.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเพาะเลี้ยง

ผู้เขียน นางสาวฟ้า เชื้อหงษ์ทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. ศิริพร โอโกโนกิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเศวต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ. ดร. ณัฐจีรา อินต๊ะใส อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ. ดร. ธัญญารัตน์ จอมแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมียเป็นความผิดปกติในกลุ่มของมะเร็งทางโลหิตวิทยา ซึ่งพบลักษณะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดที่เป็นเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ในกลุ่มเม็ดเลือดขาว การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแสดงออกของทั้งยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในระดับสูงเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง ในปัจจุบันการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยการให้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่นิยม แม้ว่าเป้าหมายหลักของยาเคมีบำบัดคือเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วอย่างรวดเร็วผิดปกติ แต่ยังทำให้เซลล์ที่ยังมีการแบ่งตัวในภาวะปกติได้รับผลกระทบด้วยเช่นกัน เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด สารจากธรรมชาติที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง และคาดว่าก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยกว่ายาเคมีบำบัด จึงถูกนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากใบมะกรูดเคยมีการรายงานถึงฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษและผลต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันของสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดและหาสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดที่มีฤทธิ์ดีที่สุด ในการยับยั้งการแสดงออกยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด K562, Molt4, U937 และ HL60 ซึ่งสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดจะถูกสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ประกอบด้วยเอธานอล เฮกเซน เอธิลอะซิเตด บิวทานอล และเมธานอล จากนั้นทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี MTT และศึกษาผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี real-time PCR และ Western blot ตามลำดับ สารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดและเฮกเซน พบว่ามีฤทธิ์ดีในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562, Molt4, U937 และ HL60 โดยพบว่าสารสกัดหยาบแยกส่วนที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดมีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.0±0.6, 35.3±1.4, 21.8±0.4, และ 19.8±1.0 µg/mL ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบแยกส่วนที่สกัดด้วยเอธานอลและบิวทานอลมีฤทธิ์ต่ำ ส่วนสารสกัดหยาบแยกส่วนที่สกัดด้วยเมธานอลไม่แสดงฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันพบว่าสารสกัดหยาบแยกส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ดีที่สุด ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด โดยสารสกัดดังกล่าวลดระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ K562, Molt4, U937 และ HL60 ได้เท่ากับ 60 , 51, 42 และ 46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และลดระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 และ Molt4 ได้ 61 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันโปรตีนในเซลล์ U937 และ K562 ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นและเวล าของสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดที่สกัดด้วยเ ฮกเซนต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ซึ่งถูกเลือกเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบแยกส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนที่ความเข้มข้น 5 , 10, 15 และ 20 µg/mL ลดระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ 25 , 36, 42 และ 48 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน 7, 21, 39 และ 63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบแยกส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถลดระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์-เอ็นเอได้ 18 , 38 และ 43 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันได้ 7 , 34 และ 66 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1 , 2 และ 3 ของการทดสอบตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดที่สกัดด้วยเฮกเซนจึงอาจเป็นแหล่งของยารักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งสารออกฤทธิ์ดังกล่าวควรมีการนำไปศึกษาวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved