

Thesis Title	Effect of Bitter Melon (<i>Momordica charantia</i> Linn.) on Level and Function of Natural Killer (NK) Cells in Cervical Cancer Patients with Radiotherapy	
Author	Miss Duriya Fongmoon	
M.S.	Biochemistry	
Examining committee	Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Member
	Dr. Surathat Pongnikorn	Member
	Asst. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai	Member
	Assoc. Prof. Dr. Luksana Makornkawkeyoon	Member

ABSTRACT

Cervical cancer is the highest in incidence and cause of death in Thai women. Cervical cancer patients are defective on their immune system. There is a decrease of total white blood cell count including lymphocytes and natural killer (NK) cells. NK cells, one type of lymphocytes, play a role to eliminate cancer cells by antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) mechanism. Previous study shows that P-glycoprotein (170 kDa, transmembrane protein) may be a transporter for cytokine releasing in ADCC mechanism. This study proposes to explore the role of bitter melon intake in cervical cancer patients along with normal treatment (radiotherapy). Bitter melon is a Thai herb. Previous study shows that bitter melon can stimulate lymphocyte activity *in vivo* and *in vitro* (mouse). We hope that bitter melon can stimulate an increase of NK cells percentage and P-gp level on their membrane in blood sample from cervical cancer patients who ingest bitter melon.

Subjects were divided into three groups, normal control (n=35), patient control (n=30) and patient treatment (n=30) groups. Patient control and patient treatment groups are cervical

cancer patients treated with radiotherapy without or with bitter melon ingestion respectively. Blood samples obtained from all three groups were analyzed for percentage of NK cells, B cells, T cells, NKT cells percentage and P-gp level on their membrane. The percentage of each cell type was analyzed by flow cytometry using the antibodies specific to CD antigen on lymphocyte and monocyte membrane. P-gp level was detected by flow cytometry and confirmed by immunoprecipitation and western blot analysis using the antibodies specific to P-gp.

The results show the increasing of NK cells percentage in cervical cancer patient control and patient treatment groups but there are no significant differences ($P > 0.05$). When compared the percentage of NK cells from the second and the third blood sampling times with the first blood sampling time in the same group, the increasing of NK cells from each group is significant ($P < 0.05$). The increasing of NK cells percentage whereas decreasing of the total white blood cell count after treatment with radiation may be a defense immune response of cervical cancer patients. Because their immune function would like to eliminate cancer cells, it is the reason for increasing of NK cells level. The results also show the decreasing of B cell percentage after radiation treatment in both groups of patients. This is a sign of impaired immunity in cervical cancer patients, however bitter melon intake did not affect B cell level. We found that bitter melon ingestion may help to maintain the T cell level. It is an effective thing for patients because T cells can eliminate cancer cell by the same mechanism as NK cells. There are no differences in NKT cell level in blood samples obtained from both groups of patients before and after treatment. The results also show the significant decrease of P-gp level ($P < 0.05$) on NK cell, B cell and lymphocyte membrane in the second and the third blood sampling times when compared with the first blood sampling time of patient treatment group. These results indicate bitter melon ingestion effect on the decrease the P-gp level. There is no significant difference of P-gp level on NK cell, B cell and lymphocyte membrane from the first, second and the third blood sampling times obtained from patient control group.

In conclusion, bitter melon ingestion in cervical cancer patients with radiotherapy did not affect NK cell, B lymphocytes and NKT cell level, however it was effective on the maintenance of T lymphocytes level. Bitter melon affects the decrease of P-gp level on NK cell, B cell and lymphocyte membrane. Taken together, bitter melon intake may not benefit to cervical cancer patients who were treated with radiation. It may be good for coordinating with chemotherapy and should be investigated before used.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของมะเร็งขึ้นกที่มีต่อจำนวนและหน้าที่ของ Natural Killer (NK) Cells ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก ร่วมกับ การรักษาด้วยการฉายรังสี	
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศุริษา ฟองมูล	
วิทยาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. พรงาม ลีมตระกูล	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. วัชระ กติณฤกษ์	กรรมการ
	นพ. สุรทัสน์ พงษ์นิกร	กรรมการ
	ผศ.ดร.พญ. รัตนา บรรเจิดพงษ์ชัย	กรรมการ
	รศ.ดร. ถักษณา มกรแก้วเกยูร	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งชนิดที่พบมากที่สุดเป็นอันดับ 1 ในประชากรเพศหญิงของประเทศไทย รวมทั้งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของประชากรเพศหญิงในประเทศไทยอีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก จะพบความผิดปกติด้านภูมิคุ้มกัน คือ มีจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมน้อยกว่าในคนปกติ เป็นผลให้เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซท์ชนิดต่างๆ ของผู้ป่วยมีจำนวนน้อยลงตามไปด้วย รวมทั้งเซลล์เนเชอรอล คิลเลอร์ หรือ เซลล์เอ็นเค ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์มะเร็งในร่างกายโดยอาศัยขบวนการ antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าพีไกลโคโปรตีน (โปรตีน transmembrane ซึ่งมีขนาด 170 kDa) อาจจะเป็นโปรตีนซึ่งทำหน้าที่เป็นทางผ่านสำหรับการหลั่ง cytokines ต่างๆ ในขบวนการ ADCC การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำสมุนไพรมะเร็งขึ้นกที่มีอยู่ในประเทศไทย และพบว่ามีคุณสมบัติสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน รวมทั้งกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวในสัตว์ทดลองและในหลอดทดลอง มาให้แก่ผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกรับประทาน เพื่อต้องการผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์เอ็นเคและระดับพีไกลโค

โปรตีนบนผิวเซลล์ ตัวอย่างทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มคนปกติ ($n=35$), กลุ่มผู้ป่วยควบคุม ($n=30$) และกลุ่มผู้ป่วยทดลอง ($n=30$) ซึ่งไม่ได้รับประทาน และรับประทานมะระขี้นก ร่วมกับการรักษาด้วยการฉายรังสีตามลำดับ นำตัวอย่างเลือดจากกลุ่มทดลอง ทั้ง 3 กลุ่มมาตรวจนับจำนวนเซลล์เอ็นเค บิลิมโฟไซท์ ทีลิมโฟไซท์ และเซลล์เอ็นเคที รวมทั้งตรวจวัดระดับพีไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ โดยข้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจน (CD) บนผิวเซลล์ลิมโฟไซท์ชนิดต่างๆ และเซลล์โมโนไซท์ แล้วทำการตรวจหาด้วยวิธีโพลไซโตเมทรี จากนั้นทำการตรวจยืนยันระดับพีไกลโคโปรตีนด้วยวิธี Immunoprecipitation และ western blotting

จากผลการทดลองพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับเซลล์เอ็นเคต่ำกว่าในกลุ่มคนปกติ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อนำตัวอย่างเลือดครั้งที่ 1, 2 และ 3 มาตรวจวัดจำนวนเซลล์เอ็นเค พบว่าหลังจากผู้ป่วยได้รับการรักษา มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์เอ็นเคในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม โดยในแต่ละกลุ่มมีการเพิ่มขึ้นในตัวอย่างเลือดครั้งที่ 2 และ 3 เมื่อเทียบกับในตัวอย่างเลือดครั้งที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) การที่ผู้ป่วยมีจำนวนเซลล์เอ็นเคเพิ่มขึ้นในขณะที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลงหลังจากการรักษานั้นน่าจะเป็นผลจากกลไกการป้องกันร่างกายตนเองของผู้ป่วยเนื่องจากผู้ป่วยมีพยาธิสภาพและต้องการกำจัดเซลล์มะเร็งออกจากร่างกาย จึงจำเป็นต้องสร้างเซลล์เอ็นเคเพิ่มขึ้น จากการตรวจวัดปริมาณบีเซลล์ลิมโฟไซท์ พบว่ามีจำนวนลดลงในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มหลังจากได้รับการรักษา แสดงให้เห็นถึงความบกพร่องในระบบภูมิคุ้มกันชนิด humoral immunity ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก แต่การลดลงนี้ไม่ได้เป็นผลจากการรับประทานมะระขี้นก และพบว่าการรับประทานมะระขี้นกมีผลช่วยให้ผู้ป่วยสามารถรักษาระดับบีเซลล์ลิมโฟไซท์ไม่ให้ลดลงได้ ซึ่งเซลล์ทีลิมโฟไซท์นั้นมีความสำคัญกับผู้ป่วยคือเป็นเซลล์ที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ โดยอาศัยกลไกเดียวกับเซลล์เอ็นเค ผลการตรวจวัดระดับเซลล์เอ็นเคทีลิมโฟไซท์พบวก่อนและหลังการรักษานั้นมีระดับไม่เปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม และเมื่อทำการตรวจวัดระดับพีไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่รับประทานมะระขี้นก มีการลดลงของระดับพีไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ของเซลล์เอ็นเค, เซลล์บิลิมโฟไซท์ และเซลล์ลิมโฟไซท์รวมในตัวอย่างเลือดครั้งที่ 2 และ 3 เปรียบเทียบกับในตัวอย่างเลือดครั้งที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ผู้ป่วยซึ่งไม่ได้รับประทานมะระขี้นก มีระดับพีไกลโคโปรตีนไม่แตกต่างกันเมื่อทำการตรวจวัดในตัวอย่างเลือดครั้งที่ 1, 2 และ 3

จากผลการทดลองที่ได้ สามารถสรุปได้ว่า การให้ผู้ป่วยรับประทานมะระขี้นกควบคู่ไปกับการรักษาด้วยการฉายรังสี ไม่มีผลต่อระดับเซลล์เอ็นเคและเซลล์บีลิมโฟไซต์ รวมทั้งเซลล์เอ็นเคทีลิมโฟไซต์ของผู้ป่วย แต่มีผลช่วยให้ผู้ป่วยสามารถรักษาระดับเซลล์ทีลิมโฟไซต์ที่ไม่ให้ลดลงได้ ในขณะที่การรับประทานมะระขี้นกมีผลทำให้ระดับพีไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวรวมทั้งเซลล์เอ็นเคและเซลล์บีลิมโฟไซต์มีระดับลดลง ดังนั้นการนำมะระขี้นกมาให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกซึ่งได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีรับประทานควบคู่ไปด้วยนั้น ไม่เป็นผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย แต่หากนำไปใช้กับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด อาจเป็นผลดีได้ เนื่องจากมะระขี้นกอาจช่วยลดการเกิดการคีโตนหลายขนานได้ และต้องมีการศึกษาทดลองก่อนนำไปใช้ต่อไป