

# การพยากรณ์พื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกเพื่อการวางแผนเฝ้าระวัง และป้องกันโรคในจังหวัดอุบลราชธานี

## Forecasting Risk Area for Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) Surveillance Protection and Planning in Ubon Ratchathani Province

สุรศักดิ์ สุขสาي (Surasak Suksai) \* ดร.วนิดา แก่นอากาศ (Dr. Wanida Kanarkard) \*\*

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพยากรณ์พื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดในจังหวัดอุบลราชธานีซึ่งนำไปใช้ในการแผนเฝ้าระวังและป้องกันโรคทั้งเชิงรุกและเชิงรับในพื้นที่ที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ดัชนีความชุกชุมของยุงลาย (HI, CI และ BI) ซึ่งวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก 1. การสร้างแบบจำลองทางภูมิศาสตร์เพื่อการวิเคราะห์และการทำนายพื้นที่เสี่ยง 2. การพัฒนาระบบฐานข้อมูลผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ตเพื่อการเข้าถึงข้อมูลได้ตลอดเวลา การดำเนินงานตามขั้นตอนหลักที่ 1 ดังนี้ รวบรวมข้อมูลปัจจัยนำเข้า (ค่า HI CI และ BI ปี 2545-2547) นำมารวบรวมที่พบร่วมกับพื้นที่ที่พบร่วงปีตั้งแต่ปัจจุบัน แล้วทำนายผ่านแบบจำลองทางระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้สามารถแบ่งระดับพื้นที่เสี่ยงเป็น 3 ระดับ คือ พื้นที่เสี่ยงสูง เสี่ยงปานกลาง และเสี่ยงน้อย จากนั้นพัฒนาระบบข้อมูลการรายงานผลแบ่งตามพื้นที่เสี่ยงที่ได้จากขั้นตอนหลักที่ 1 ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ตเพื่อนำไปใช้ในการตัดสินใจ และดำเนินงานต่อไป

### ABSTRACT

The objective of this research was to develop the GIS model forecasting risk area for dengue hemorrhagic fever surveillance protection and planning in Ubon Ratchani province. By use Larval Surveys (HI, CI and BI). The study were divided into 2 procedures included: 1. to develop the GIS model of analysis and prediction. 2. to develop web database of surveillance system will become a model of DHF able to access to real-time. The research procedure included 1. Major factors considered for analysis of the occurrence of DHF were HI CI and BI in 2002 to 2004. Results of the research revealed that 3 level of area (high risk area, moderate risk area and low risk area). Next to report risk area by internet GIS for decision support system.

คำสำคัญ : โรคไข้เลือดออก สารสนเทศภูมิศาสตร์ แบบจำลองระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

Key Words : Dengue haemorrhagic fever, Internet mapping, Geographic information system, Modeling GIS.

\* มหาบัณฑิต หลักสูตรวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทนำ

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคติดต่อเกิดจากเชื้อ Dengue Virus มีอยุ่ลายเป็นพาหะนำโรค นับว่าเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข และการแพทย์ เพราะมีผู้ป่วย ปีละเป็นจำนวนมากในรอบ 16 ปีที่ผ่านมา (2532-2547) ประเทศไทยมีการระบาดปีเว้นปี หรือปีเว้นสองปี โดยพบว่ามีการระบาดสูงสุดในปี พ.ศ.2544 มีผู้ป่วยสูงผิดปกติถึง 138,970 ราย อัตราป่วย 224.58 ต่อแสนประชากร ตาย 238 ราย อัตราป่วยตายร้อยละ 0.38 (วารสารโรคติดต่อปี 2547) พบรการระบาดกระจายทุกพื้นที่จังหวัด

จังหวัดอุบลราชธานี มีการระบาดสูงสุดใน พ.ศ. 2541 ผู้ป่วย 4,905 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 276 ต่อแสนประชากร ตาย 25 ราย อัตราป่วยตายร้อยละ 0.51 กลุ่มอายุ 5 - 9 ปี พบรมากที่สุดในแต่ละปีจำนวนผู้ป่วยสูงสุดในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม จำนวนผู้ป่วยจะลดลงในเดือนกันยายนถึงธันวาคมของทุกปี ยกเว้นในปี พ.ศ. 2540 ที่พบว่าจำนวนผู้ป่วยสูงขึ้น ตั้งแต่เดือนอันดับต้นปี พ.ศ. 2541 และมีการระบาดของโรคไข้เลือดออกตลอดทั้งปี ปัจจุบันปี พ.ศ. 2548 (2 ม.ค. 2548 ถึง 23 พ.ค. 2548) ผู้ป่วย 238 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 13.05 ยังไม่มีผู้เสียชีวิต (รายงานระบาด สสจ.อุบลฯ: 2548)

ดังนั้น ผู้วิจัยมีความสนใจเพื่อศึกษาระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ หรือ Geographic Information System (GIS) ที่จะนำมาใช้ในกระบวนการทำงานเกี่ยวกับข้อมูลในเชิงพื้นที่ในการเฝ้าระวังและป้องกันโรคด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่ใช้กำหนดข้อมูลและสารสนเทศที่มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งในเชิงพื้นที่ (จิตติ, อุรุญากร และ อุมาวดี, 2543) เช่น หมู่บ้านความชุกชุมของยุงลาย ข้อมูลผู้ป่วย สัมพันธ์กับตำแหน่งในแผนที่ ตำแหน่ง เส้นรุ้ง เส้นทาง ข้อมูลและแผนที่ใน GIS เชิงพื้นที่ ทั้งหลาย จะสามารถ

นำมามีเคราะห์ด้วย GIS และทำให้สื่อความหมายในเรื่องการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับเวลาได้ (เกณฑ์, 2540) เช่น การแพร่ขยายของโรคระบาดไข้เลือดออก การกระจายแหล่งเพาะพันธุ์พาหะนำโรคฯลฯ ข้อมูลเหล่านี้ เมื่อประยุกต์บนแผนที่ทำให้สามารถแปลง และสื่อความหมาย ใช้งานได้จ่ายซึ่งจะเป็นประโยชน์ในกระบวนการเฝ้าระวังและป้องกันโรคระบาดต่อไป (พินิจ และคณะ, 2541)

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### รูปแบบที่ใช้ในการวิจัย

เป็นการศึกษาค่าตัดชนิดความชุกชุมยุงลายตลอดจนพื้นที่อุบัติการณ์ของโรคไข้เลือดออกในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีในระหว่างปี พ.ศ. 2545 - 2547 โดยยึดตามรายงาน DHF 2-3 แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยดังนี้ความชุกชุมของยุงลายและจำนวนผู้ป่วยปี พ.ศ. 2545 - 2547 และค่า BI ซึ่งเป็นข้อมูลนำเข้า (Attribute Data) เพื่อใช้เคราะห์และพยากรณ์พื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดออก (DHF) ระดับพื้นที่ โดยนำเสนอด้วยเครือข่าย Internet

### ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร (Population) ประชากรที่ใช้ในการสำรวจครั้งนี้ คือ บ้านหรือหลังค่าเรือนที่สำรวจข้อมูลในแต่ละอำเภอและกิ่งอำเภอในจังหวัดอุบลราชธานี (20 อำเภอ 5 กิ่งอำเภอ 220 ตำบล 2,598 หมู่บ้าน)

กลุ่มตัวอย่าง ขนาดตัวอย่าง ซึ่งจะใช้เป็นตัวแทนของแต่ละหมู่บ้าน ที่แสดงถึงความชุกชุมของยุงลายคัดเลือกโดยการสุ่มแบบเจาะจง (Purposive Sampling) ค่า BI HI CI และข้อมูลผู้ป่วยในพื้นที่หมู่บ้านทุกหมู่บ้าน ทุกอำเภอ และทุก กิ่งอำเภอในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี

### เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

แบบสำรวจค่า (DHF 2-3) HI และ CI ที่รายงานในระดับจังหวัดและรายงานผู้ป่วยที่เกิดใน

หมู่บ้านยึด รายงาน 506 (รายงานโรคที่ต้องเฝ้าระวัง) ค่าดัชนีทางกีฏวิทยา ที่ใช้ในการคำนวณหาความชุกชุมของยุงลาย (1) Breteau Index (BI) คือ จำนวนภายนะที่พบลูกน้ำยุงลายในบ้าน 100 หลังคา (2) Container Index (CI) คือ ร้อยละของภายนะที่พบลูกน้ำยุงลาย (3) House Index (HI) คือ ร้อยละของบ้านที่พบลูกน้ำยุงลาย

และการพัฒนาระบบผ่านเครือข่าย Internet ใช้ MapServer ของ University of Minnesota ที่พัฒนา Minnesota MapServer (ดังภาพที่ 1) เป็น Software เปิดเผยแพร่ (Open Source)

### การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลจากการสำรวจลูกน้ำยุงลาย ตามรายงาน DHF2-3

$$\text{ค่า HI} = \frac{\text{จำนวนบ้านที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลาย}}{\text{จำนวนบ้านที่สำรวจทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ค่า CI} = \frac{\text{จำนวนภายนะที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลาย}}{\text{จำนวนภายนะที่สำรวจทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ค่า BI} = \frac{\text{จำนวนภายนะที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลาย}}{\text{จำนวนบ้านที่สำรวจทั้งหมด}} \times 100$$

จากข้อมูลการสำรวจและค่าที่คำนวณได้จากแต่ละหมู่บ้าน นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยใช้สูตร

$$\text{ค่าเฉลี่ย} (\bar{X}) = \frac{\sum X_i}{n}$$

$X_i$  = ค่าข้อมูลความชุกชุมของแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่  $i$   
 $n$  = จำนวนตัวอย่าง

สำหรับข้อมูลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของหมู่บ้าน ในช่วงเวลาที่ทำการสำรวจข้อมูลจากการเฝ้าระวังรายสัปดาห์นำค่าจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก กับค่าเฉลี่ยของแต่ละหมู่บ้านที่สำรวจมาศึกษา คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient,  $r^2$ ) (ไฟจิตร์ และคณะ, 2532; อุทุมพร และคณะ 2543)

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{(\sum (X_i - \bar{X}^2))(\sum (Y_i - \bar{Y}^2))}}$$

$X_i$  = ค่าของตัวแปรชุดที่ 1

$Y_i$  = ค่าของตัวแปรชุดที่ 2

จัดระดับพื้นที่เสี่ยงต่อการแพร่ระบาดของเชื้อโรคไข้เลือดออก ของแต่ละหมู่บ้าน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิคการชั้นทับ (Overlay techniques) (กุษดา, 2541) กลุ่มปัจจัยที่ใช้เทคนิคการชั้นทับข้อมูล ประกอบด้วย ชุดข้อมูล 4 ชั้นข้อมูล ได้แก่ (1) ค่าเฉลี่ย HI (2) ค่าเฉลี่ย CI (3) ค่าเฉลี่ย BI และ (4) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient,  $r^2$ ) ของแต่ละหมู่บ้าน คำนวณโดยการคำนวณค่าคงแหนறรวมการถ่วงน้ำหนัก (Weighting linear total) ดังสมการ

$$S = W_1 R_1 + W_2 R_2 + \dots + W_n R_n$$

เมื่อ  $S$  = พื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค

$W_{1 \dots n}$  = ค่าคงแหนறความสำคัญของปัจจัยเสี่ยงที่ 1 ถึง  $n$

$R_{1 \dots n}$  = ค่าคงแหนறระดับความสัมพันธ์ปัจจัยที่ 1 ถึง  $n$

ความสำคัญของปัจจัย (Weighting factor)

นำค่าคงแหนறรวมที่ได้มาจัดกลุ่ม เพื่อแบ่งพื้นที่ออกเป็น 3 ระดับ คือ พื้นที่ที่มีความเสี่ยงสูง ปานกลาง และ ต่ำ ดังนี้

พื้นที่มีความเสี่ยงสูงต่อการแพร่ระบาดมีค่าน้อยกว่า

$$\bar{X} - S.D.$$

พื้นที่มีความเสี่ยงปานกลางมีค่าอยู่ระหว่าง

$$\bar{X} - S.D. \leq S \leq \bar{X} + S.D.$$

พื้นที่มีความเสี่ยงน้อยต่อการแพร่ระบาดมีค่ามากกว่า

$$\bar{X} + S.D.$$

โดย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง

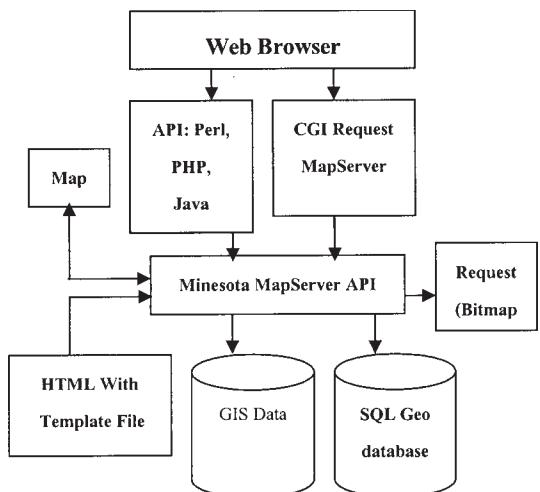
$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}}$$

## กระบวนการทางวิศวกรรมและระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เพื่อพัฒนาระบบ

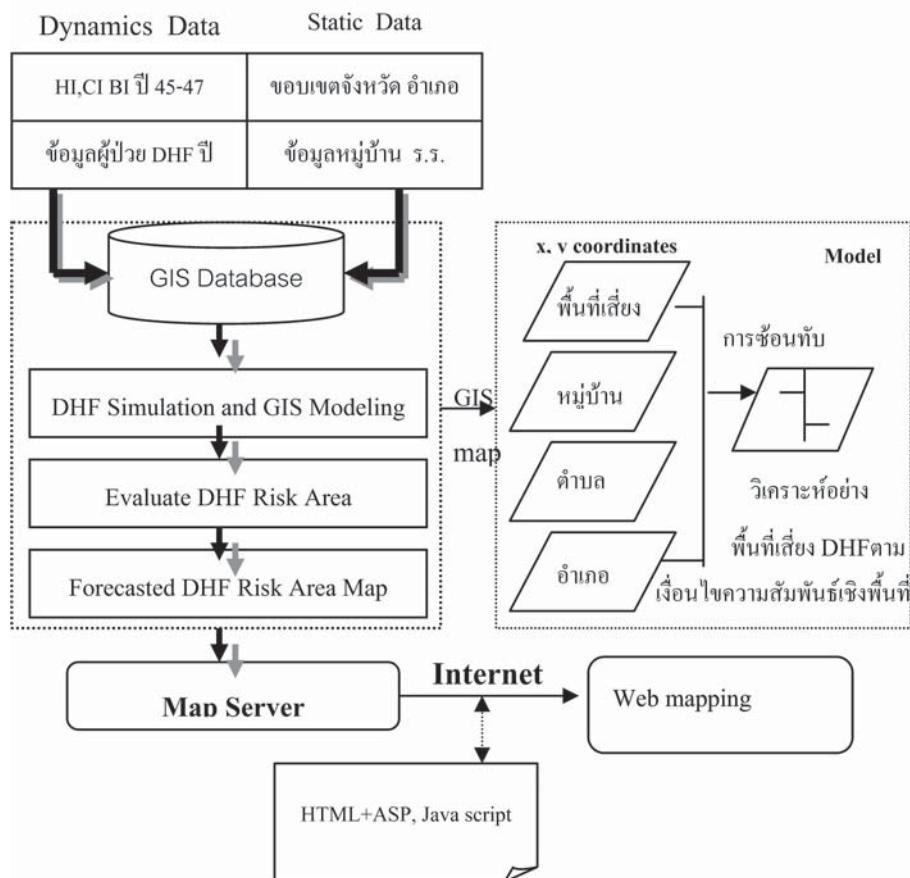
ขั้นตอนในการพัฒนาผู้วิจัยเลือกตามแบบของ Kendall (1992) ที่เรียกว่า System Development Life Cycle : SDLC มีขั้นตอนการพัฒนา 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. กำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ (Problem Definition)
2. วิเคราะห์ระบบ (Analysis)
3. การออกแบบระบบ (Design)
4. พัฒนาโปรแกรม (Development)
5. ทดสอบระบบ (Testing)
6. ติดตั้งระบบ (Implement On)
7. บำรุงรักษาระบบ (Maintenance)

ซึ่งการรวมการวิเคราะห์ของระบบที่ต้องการแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1 แสดงคุณสมบัติและโครงสร้างการทำงานของ Mapserver API



ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์พื้นที่เสี่ยงและนำเสนอผ่านเครือข่าย Internet

## ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลการหัวเรื่องที่พื้นที่เลี่ยงโดยการใช้ค่า สัมพันธ์ต่างน้ำหนักในแบบจำลองระบบสารสนเทศ ภูมิศาสตร์เพื่อการท่านายโดยใช้ค่า BI HI และ CI และ ความล้มพันธ์กับผู้ป่วยในพื้นที่พบร่วมกับ BI จะแสดง ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก มากที่สุด (ค่า  $r$  อุ่ร่วง 0.7-1) รองลงมา คือ ค่า HI (ค่า  $r$  อุ่ร่วง 0.43-0.92) และ ค่า CI (ค่า  $r$  อุ่ร่วง 0.15-1) ซึ่งสอดคล้องกับ จันทร์ แสง และ คณะ (2540), จิตติ และ คณะ (2534) ค่า BI จะแสดงความสัมพันธ์กับจำนวนยุงลายที่เกิดขึ้นจริงมากกว่าค่า HI แต่ค่า CI จะสัมพันธ์กับภายนอกที่ยุงชอบวางไข่มากกว่า

ระดับตำบลที่เป็นพื้นที่เลี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกสูงทั้งหมด 27 ตำบล (ทั้งหมด 220 ตำบล) ได้แก่ ตำบล ในเมือง กระโสน กุดลาด ขามใหญ่ แจระแม ปทุม ไร่น้อย หนองขอน หนองบ่อ หัวเรือ ปะขาว เขมราฐ ขามป้อม แก้งหนีอ หัวนา เชื่องใน บ้านกอก หนองเหล่า นาคำ เมืองเดช ชุมลุ แหล่งทุ่ง เทศบาลพิบูลฯ เทศบาลวารินชำราบ โพนเมือง หนองบก เหล่าเลือโก็ก คิดเป็นร้อยละ 12.27 และเป็นพื้นที่เลี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกในระดับปานกลางทั้งหมด 193 ตำบล คิดเป็นร้อยละ 87.73 ระดับอำเภอที่เป็นพื้นที่ต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกในระดับปานกลางทั้งหมด 23 อำเภอ คิดเป็นร้อยละ 8.00 และเป็นพื้นที่เลี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกในระดับปานกลางทั้งหมด 23 อำเภอ คิดเป็นร้อยละ 92.00

การใช้แบบจำลอง GIS ชนิดการให้ค่าน้ำหนัก (Index Model) เพื่อการพยากรณ์ มีจุดอ่อนเรื่อง การให้ค่าน้ำหนักของตัวแปร ซึ่งขึ้นอยู่กับผู้ตัดสินใจ หรือผู้เชี่ยวชาญจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเลือกใช้ปัจจัยที่สัมพันธ์กับตัวแปรหรือเรื่องที่ศึกษามากที่สุดเพื่อลดค่าความผิดพลาดในการท่านาย และจากการประเมินผลภาพรวมของระบบเฝ้าระวังผ่าน Internet

GIS โดยผู้ใช้ทั่วไป สรุปได้ว่าระบบที่พัฒนามีประสิทธิภาพระดับดี ( $\mu \geq 4.51$ )

## สรุปผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการศึกษาระบบนี้ เป็นการพยากรณ์พื้นที่เลี่ยงต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกเพื่อใช้ในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรคไข้เลือดออกในระดับพื้นที่ ระดับตำบลและระดับอำเภอในจังหวัดอุบลราชธานี โดยศึกษาปัจจัยด้านกีฏทางการแพทย์ (ค่า HI CI และ BI) ย้อนหลัง 3 ปี

จากการศึกษาพบว่าปัจจัยด้านกีฏทางการแพทย์ (ค่า HI CI และ BI) ในแต่ละพื้นที่มีความสัมพันธ์ต่อการป่วยในระดับพื้นที่ และบ่งบอกถึงความเสี่ยงที่จะเกิดการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งการนำเสนอข้อมูลในรูปแบบ Mapping สามารถมองภาพได้ง่าย ชัดเจน ในเรื่องของงานระบบจะมองภาพรวมในแต่ระดับและพื้นที่ใกล้เคียงที่ส่งผลด้วยลักษณะ Mapping ยังแสดงขอบรอยต่อระหว่างพื้นที่ได้เร้าสามารถนำไปวางแผนร่วมกันระหว่างตำบล อำเภอที่มีพื้นที่ติดกันได้ การนำเสนอ ข้อมูลผ่านเครือข่าย Internet จะทำให้แต่ละพื้นที่มองเห็นภาพรวมกัน และนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนป้องกันกิจกรรมต่างๆ ในการเฝ้าระวังได้อย่างต่อเนื่องมีประสิทธิภาพ

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการนำเสนอสารสนเทศภูมิศาสตร์ กับงานระบบวิทยา ในเชิงของการวิเคราะห์ หาสาเหตุ ปัจจัย อื่น เพิ่มเติม โดยใช้แผนที่ที่ความละเอียดมาก ที่สามารถแสดงให้เห็นถึง ชุมชน และ สิ่งแวดล้อม ต่างๆ ในชุมชนได้ เช่น แผนที่ชุมชน ที่แสดงรายละเอียดให้เห็นถึง หลังคาเรือน ที่สถานที่ต่างๆ ซึ่งสามารถที่จะนำมารวบรวมพื้นที่กันชน การวางแผนการใช้สารเคมี เช่น การพ่นหมอกควันในระยะ 100 เมตร จากบ้านผู้ป่วย เป็นต้น

2. ควรมีการนำไปประยุกต์ใช้กับโรคระบาด อื่นๆ หรือกิจกรรมสาธารณสุขที่สำคัญโดยเฉพาะโรคระบาดประจำท้องถิ่น

### กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของงานวิจัยนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้ถ้าไม่ได้รับคำแนะนำอย่างรอบด้านและการชี้แนะให้เห็นข้อกพร่องที่ต้องแก้ไข จากอาจารย์ที่ปรึกษาและผู้ทรงคุณวุฒิ เพื่อความสมบูรณ์ของระบบงานและการนำเสนอที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้พัฒนาระบบงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อองค์กรที่นำไปใช้งานและที่เกี่ยวข้องต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

กฤษดา เรืองอารีย์รัชต์. 2541. ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เพื่อการประยุกต์ใช้ในหน่วยงาน. วารสารภูมิศาสตร์: 67-74.

เกษม กุลประดิษฐ์. 2540. ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เชิงพื้นที่. วารสารภูมิศาสตร์ 14(2) : 67-74.

จตุรงค์ ธีระกนก และคณะ. 2543. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น. รายงานการวิจัยเบื้องต้น การวิจัยประเมินผลโครงการเร่งรัดป้องกันและควบคุมโรคไข้เลือดออกเฉลิมพระเกียรติ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว จังหวัดขอนแก่น ปี 2542.

จันทร์แสง จ, ถาวร օ, จันทร์แสง օ, และคณะ. การสำรวจความชุกชุมของยุงลายแบบตัวอย่างเชิงสุ่มเพื่อการเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออก. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2540; 6(1) 82-90:

จิตติ จันทร์แสง, ประคง พันธ์อุไร, อุษาวดี ถาวร, อรุณภรณ์ จันทร์แสง, อภิวัฒน์ ธรรมลิน และสุพล เป้าศรีวงศ์. รูปแบบสำหรับการพยากรณ์จำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารโรคติดต่อ 2540; 23: 123-135.

จิตติ จันทร์แสง, อรุณภรณ์ จันทร์แสง และอุษาวดี ถาวร. โปรแกรมช่วยงานการเฝ้าระวังและควบคุมยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก. วารสารโรคติดต่อ 2543; 42: 103-113.

จิตติ จันทร์แสง, อรุณภรณ์ จันทร์แสง, อุษาวดี ถาวร และ ประคง พันธ์อุไร. การแพร่กระจายยุงลายในชนบทช่วง พ.ศ. 2532-2534. ว.วิทย.พ. 35(2): 100-110.

อุทุมพร กำภู ณ อยุธยา และคณะ. 2543 : 8. ประเมินผลงานป้องกันควบคุมโรคไข้เลือดออก จังหวัดสุราษฎร์ธานี. 2542 : 80-84.

พินิจ ฟ้าอันวยผล และคณะ. การพัฒนารูปแบบการดำเนินงานป้องกันโรคและควบคุมโรค อำเภอวัดโนนส์ จังหวัดพิษณุโลก. 2541: 40-80.

ไฟจิตร์ วรacha, สุนัน วงศ์ชีรี, สุมาลี เนื่องพลี, สุนทรี ใจนันสุพจน์. การประยุกต์ระบบการเฝ้าระวังโรคเพื่อการพยากรณ์การระบาดโรคไข้เลือดออก. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2532; 192-198.

Kendall. 1992. Systems Analysis and Design. 2<sup>nd</sup> ed. Annals of the Computer Technology. 52-53.

# Molecular Mechanism of *Mallotus spodocarpus* Compound Induced Apoptosis on Cholangiocarcinoma Cell Lines

## กลไกระดับโมเลกุลของ *Mallotus spodocarpus* ในการซักนำให้เกิด Apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Tapanawan Nasomyon (สถาปนารัตน์ นาสมยนต์)\* Dr. Chariya Hahnvajanawong (ดร.จริยา หานวจันวงศ์)\*\*

Dr. Watcharin Loilome (ดร. วัชรินทร์ โลยลอม)\*\*\* Dr. Nissana Namwat (ดร.นิษณา นามวัฒ)\*\*\*\*

Dr. Wichittra Tussaneyakul (ดร.วิจิตรา ทัศนียกุล)\*\*\*\*\* Dr. Vichai Reutrakul (ดร. วิชัย ริเวตระกุล)\*\*\*\*\*

### ABSTRACT

The growth inhibitory activity of *Mallotus spodocarpus* compound on 2 human cholangiocarcinoma (CCA) cell lines, including KKU-M156 and KKU-100 cells, was performed *in vitro* by using sulforhodamine B (SRB) assay. The *M. spodocarpus* compound exhibited strong growth inhibitory activity against KKU-M156 and KKU-100 cells with  $IC_{50}$  values of  $0.07 \pm 0.009$  and  $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ , respectively. The anti-proliferative effects of this compound was due to apoptosis, as seen by the appearance of membrane blebbing, chromatin condensation, and DNA fragmentation. In addition, the apoptotic process involves a decrease of Bcl-2 as well as Birc 5 gene expression levels, and an increase of Bax-alpha gene expression levels.

### บทคัดย่อ

การศึกษาถูกนำไปใช้ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของสารบริสุทธิ์จากต้น *Mallotus spodocarpus* ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-M156 และ KKU-100 ในหลอดทดลอง โดยใช้ assay ของสารบริสุทธิ์ดังกล่าว มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ KKU-M156 และ KKU-100 โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้  $50\%$  ( $IC_{50}$ ) เป็น  $0.07 \pm 0.009$  และ  $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ฤทธิ์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ของสารบริสุทธินี้เกิดจากกระบวนการ apoptosis ซึ่งสังเกตจากการเกิด membrane blebbing, chromatin condensation และ DNA fragmentation นอกจากนี้พบว่ากลไกการเกิด apoptosis มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Birc 5 ในขณะที่มีการเพิ่มการแสดงของยีน Bax-alpha

**Key Words :** *M. spodocarpus* compound, Cholangiocarcinoma cell lines, Apoptosis process

**คำสำคัญ :** สารบริสุทธิ์จากต้น *M. spodocarpus* เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี กลไกการเกิด Apoptosis

\*Student, Master of Science, Program in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

\*\*Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

\*\*\*Doctor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

\*\*\*\*Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

\*\*\*\*\*Associate Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

\*\*\*\*\* Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University.

## Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA) is the highest incidence primary liver cancer in the north eastern Thailand (Vatanasapt *et al.*, 1995) and still a main health problem of people in this area. All treatment approaches, including surgical treatment, chemotherapy, combined surgical and chemotherapy, and radiotherapy are considered as palliation only. Because of the less effectiveness and toxicity of conventional chemotherapeutic agents, an alternative therapy is considered. One attractive strategy for CCA therapy is the use of medicinal plants. Medicinal plants are now approved for the treatment of many diseases, including cancer, therefore, the medicinal plants may be used as the anticancer drugs directly, as a combined drug for reduce the toxic side effect of conventional drugs or as a synergistic drug.

*Mallotus spodocarpus* (Euphorbiaceae) is a plant indigenous to the central, northern, northeastern, and southwestern part of Thailand. It has been described in the Thai Forest Bulletin in the year 2000. Prof. Vichai Reutrakul and colleague have successsed in purify novel potential medicinal compounds from *M. spodocarpus*. Among these compounds, VR-3848 (7-mer cyclic peptide) was shown to strongly inhibit cell proliferation against various human cancer cell lines such as lung (Pootrakornchai *et al.*, 2000), breast, colon, mouth epidermoid carcinoma, and mouse lymphoid neoplasm (Sujarit *et al.*, 1998). It was also shown to induce apoptosis in the leukemic Jurkat cell line (*Uthaisang et al.*, 2004).

In this study was aimed to examine the growth inhibitory effect of compound purified from *M.spodocarpus* (VR12684) on cholangiocarcinoma

(CCA) cell lines by using sulforhodamine B (SRB) assay. The molecular mechanisms of VR12684 induced cell death on CCA cell lines were also determined by using DAPI staining, DNA fragmentation, and real-time RT-PCR.

## Materials and Methods

### Human cancer cell lines

Two different types of CCA cell lines including KKU-M156 (moderately-differentiated adenocarcinoma) and KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma) were used in this study. These cell lines were established in the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. The CCA cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100 U penicillin, 100 µg streptomycin. Both cell lines were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator and were subcultured weekly. The culture medium was changed twice a week.

### Chemicals

VR12684 compound was kindly provided by Professor Vichai Reutrakul (Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand). Briefly, this compound was isolated from Eupobiaceae in Thailand using bioassay-directed fractionation. Sulforhodamine B (SRB) and 4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) were purchased from Sigma (MO, USA). DNA extraction kit was purchased from Qiagen (QIAGEN GmbH, Germany). TRIzol reagent was purchase from Invitrogen (Invitrogen life technologies, Brazil). Random hexamer, dNTPs, RNase inhibitor, M-MLV reverse transcriptase enzyme were purchased

from Promega (Union Carbide Chemicals & Plastics Technology Corporation, USA). SYBR Green was purchased from Applied Biosystem (USA) Other chemicals and reagents used were analytical grade.

#### ***In Vitro Cytotoxicity assay***

The sulforhodamine B (SRB) assay was used in this study to estimate cell number indirectly by staining total cellular protein with the SRB. The protocol is based on that originally described by Skehan et al. (Skehan, 1990) with slight modifications. Briefly, cells (9x10<sup>5</sup> cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates. After 24 hr incubation (Day 0), cells were treated with various concentrations of VR12684 compound in triplicate. The plates were incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 72 hr. Cell were fixed with trichloroacetic acid and stained with 0.4% SRB. The bound dye was solubilized with Tris-base buffer. The absorbance (OD) of each well was measured using ELISA plate reader (ELX-800 ; BIOTEK INSTRUMENTS, INC.) at 510 nm. Percentage of cell survival will be calculated using equation below. IC<sub>50</sub> value was expressed as concentration of compound in microgram per milliliter that caused a 50% growth inhibition comparing with controls. The data are means of three independent experiments.

$$\% \text{ Survival} = \frac{\text{OD (test sample)} - \text{OD (day 0)}}{\text{OD (DMSO control)} - \text{OD (day 0)}} \times 100$$

#### ***Apoptosis assay***

The mechanisms of cell death were determined by detection of nuclear morphology, DNA fragmentation, and apoptotic gene expression.

#### ***DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) staining***

Apoptosis activity was determined by the detection of nuclear morphology using DAPI staining as described by Hotz et al. (1992) with slight modification. Cells were seeded in 12-well plate at 1–5 x 10<sup>6</sup> cells/well. The cells are treated with plant compound using concentration that cause 100 % cell growth inhibition and incubated for 3–5 days. The treated cells are collected at 24 hr, washed, fixed with methanol and stained with DAPI for the observation of nuclear morphology. Nuclei are considered to be the normal phenotype when glowing bright and homogenously. Apoptotic nuclei can be identified by the condensed chromatin and fragmented apoptotic nuclei.

#### ***Detection of DNA fragmentation***

DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis as described by Sambrook and Russell (2001) with slight modification. Cells (2–3 x 10<sup>6</sup> cells) were treated with concentration that cause 100% cell growth inhibition and incubated for 48 hr. The treated cells were collected, washed, and used for DNA extraction by using DNA extraction kit following manufacturer instruction. Briefly, the cell pellet was lysed with lysis buffer at 56 °C or 10 min. The cell lysate was treated with RNase and protease K. The DNA was precipitated by absolute ethanol and purified by column. Following elution from column, the DNA samples were run on 2% agarose gel electrophoresis at 100 volts for 40 min, stained with ethidium bromide, visualized and photographed under UV light transilluminator (Fotodyne, USA).

### Detection of apoptotic gene expression by real-time RT-PCR

#### Primer design

Primers for PCR were designed using the GeneFisher Program reversion 1.3. (Chris Schleiermacher and Folker meyer, 1995–2001). Primers for the detection of Bcl-2, Bax-alpha, and Birc 5 were designed from Human Bcl-2 mRNA (Bcl-2), Human Bax alpha mRNA (Bax-alpha) and Homo sapiens inhibitor of Birc 5 apoptosis homolog mRNA (Birc 5). Then the primers are aligned to mRNA and genomic DNA of Bcl-2, Bax-alpha and Birc 5 since primers must locate in exon by using BioEdit.zip Program version 7.0.1. Additionally, primer sequence for the detection of GAPDH are kindly provided by miss Piyawan Amimanan, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kean University. Primer for real-time PCR are summarized in table 1.

**Table 1** Primers used for real-time RT-PCR.

Name	sequence (5'-3')
Bcl-2-F	5'TGG ATG ACT GAC TAC CTG A3'
Bcl-2-R	5'TGA GCA GAC TCT TCA GAG A3'
Birc 5-F	5'AAG GCT GAG AGC CAG A3'
Birc 5-R	5'TGC CTC TTT CTC TGT CCA3'
BAX alpha-F	5'AAC CAT GAT GGG CTG GA3'
BAX alpha-R	5'CGC CAC AAA GAT CGT CA3'
GAPDH-F	5'TCA TCA GCA ATG GCT CCT GCA3'
GAPDH-R	5'TGG GTG GCA CTG ATG GCA3'

#### RNA extraction

Total cellular RNA was isolated from both  $2 \times 10^6$  treated and non-treated CCA cells at 48 hr according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, the cells were lysed with

TRIZOL® Reagent at 15 °C for 5 min. Then chloroform was added and incubated at 15 °C for 3 min. RNA was precipitated with isopropanol. The RNA pellet was dissolved with RNase free water and stored at -70 °C until used.

#### Reverse Transcription (RT)

Reverse transcription reaction consisted of total RNA and random hexamer was mixed and heated at 70 °C for 10 min. After incubation, reaction buffer containing RT buffer, RNase inhibitors, dNTP mix, reverse transcriptase, and RNase free water was added. Reverse transcription was carried out using a DNA thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer Applied Biosystems). The thermal condition were 25 °C for 10 min, 37 °C for 1 hr, and 95 °C for 5 min.

#### SYBR Green real-time PCR assay

Real-time PCR of Bcl-2, Birc 5, Bax-alpha and GAPDH were performed using a SYBR Green assay. Each reaction contains of single stranded cDNA, 1X PCR buffer (Tris-HCl pH 8.3, KCl,  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ),  $\text{MgCl}_2$ , dNTP mix, forward and reverse primers, 1X SYBR Green and Hot start Taq polymerase. The PCR cycling conditions are 95 °C for 10 min, then 40 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, followed by 72 °C for 10 min. At each cycle, the accumulated PCR products were detected by monitoring an increase in fluorescence of the reporter dye from dsDNA-binding SYBR Green. After PCR, a dissociation curve (melting curve) is constructed in the range of 50 °C to 99 °C. All data were analyzed using the ABI PRISM 7500 Real time PCR system (Applied Biosystem). The mRNA expression level was presented as the ratio between absolute

quantification numbers of gene of interest and GAPDH.

#### Statistical Analyin

Mean expression levels of each target genes of treated and untreated control cells were tested for the statistical difference using Student's t-test. P-value less than 0.05 was considered for the statistical significant difference.

## Results

#### Effect of *M. spodocarpus* compound on cell growth

The *M. spodocarpus* compound (VR12684) showed marked inhibitory effect on KKU-M156 and KKU-100 cell proliferation (Table 1). The concentration required by this compound for 50% growth inhibition of KKU-M156 and KKU-100 cells was found to be 0.07 and 0.04  $\mu$ g/ml, respectively.

**Table 2.** The  $IC_{50}$  value of *M. spodocarpus* compound (VR12684) on KKU-M156 and KKU-100 cell lines. The results are expressed as mean  $\pm$  SE. (n=3)

Cell lines	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)
KKU-M156	0.07 $\pm$ 0.009
KKU-100	0.04 $\pm$ 0.01

#### Apoptotic assay

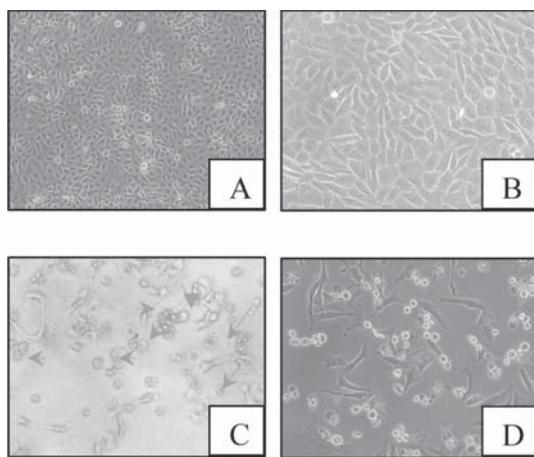
In order to determine whether the growth inhibitory effect of the *M. spodocarpus* compound was due to the induction of apoptotic cell death, the ability of the *M. spodocarpus* compound to induce apoptotic cell death was determined by analyzing its effect on cell morphology under bright field inverted microscope and nuclear morphology using

DAPI staining. The induction of apoptosis was confirmed by DNA fragmentation assay.

#### Effect of *M. spodocarpus* compound on cell morphology and nuclear morphology

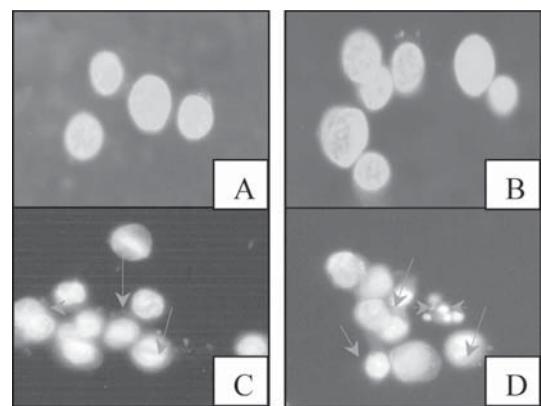
After incubation with the  $IC_{100}$  concentration of *M. spodocarpus* compound for 48 h. the morphological alterations in KKU-M156 and KKU-100 cell lines were observed under bright field inverted microscope. Untreated control KKU-M156 cells were cuboid and polygonal in normal shape (Figure1A). Exposure of KKU-M156 cells to the *M. spodocarpus* compound led to retraction, rounding and some sensitive cells were detached from the surface. Membrane blebbing (Figure1C, arrowhead) and apoptotic body (Figure1C, arrow) were observed.

Untreated control KKU-100 cells were polygonal in normal shape (Figure 1B). Treatment of KKU-100 cells to the *M. spodocarpus* compound also led to retraction, rounding and detaching from the surface. Membrane blebbing (Figure 1D, arrowhead) and apoptotic body (Figure 1D, arrow) were observed.



**Figure 1** Morphological changes of KKU-M156 cells treated with the *M. spodocarpus* compound observed under bright field microscopy. Untreated KKU-M156 control cells were cuboid and polygonal in normal shape (A). Untreated KKU-100 cells were polygonal in normal shape (B). While treated cells showed the retraction, rounding, detached from the surface, membrane blebbing (arrow) were observed in KKU-M156 (C) and KKU-100 cells (D)

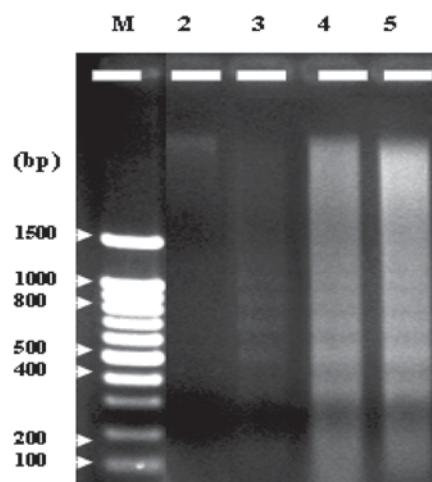
Following DAPI staining, it was found that after treatment of KKU-M156 and KKU-100 cells with *M. spodocarpus* compound, apoptotic cells could be clearly seen under fluorescent microscope as shown in figure 2. These apoptotic cells exhibited characteristic of nuclear morphological changes, including chromatin condensation, segmentation of nuclear chromatin of irregular size in treated cells (Figure 2C, D). This was clear contrast to the spherical and regular form of control nuclei (Figure 2A, B)



**Figure 2** Effect of *M. spodocarpus* compound on nuclear morphology of KKU-M156 and KKU-100 cells for 24 hr. Cells were stained with DAPI. Nuclear morphology was observed under fluorescent microscope. Nuclei of control cells were round with a normal contour of nuclei in KKU-M156 (A), in KKU-100 (B). *M. spodocarpus* compound treated KKU-M156 (C) and KKU-100 cells (D) showed chromatin condensation (arrow head) and nuclear fragmentation (arrow)

#### Effect of *M. spodocarpus* compound on DNA fragmentation

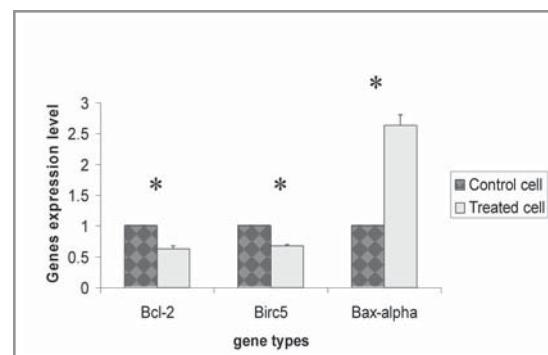
After treatment of KKU-M156 and KKU-100 cells with *M. spodocarpus* compound for 24 hr, the DNA fragmentation was detected on agarose gel electrophoresis. The fragmented DNA was clearly seen in treated KKU-M156 cells (Figure 3, lane 4) and KKU-100 cells (Figure 3, lane 5). Whereas DNA control of untreated KKU-M156 cells (Figure 3, lane 2) and KKU-100 cells (Figure 3, lane 3) did not provide ladders.



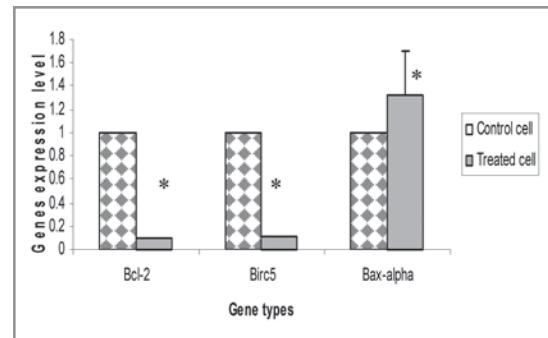
**Figure 3** DNA fragmentation KKU-M156 and KKU-100 cells after 24 hr exposure to *M. spodocarpus* compound. Lane 1: 100 base-pair DNA ladder marker, lane 2 : untreated KKU-M156 cell, lane 3 : untreated KKU-100 cell lane 4 : KKU-M156 cells treated with *M. spodocarpus* and 5: KKU-100 cells treated with *M. spodocarpus* compound

#### Effect of *M. spodocarpus* compound on apoptotic gene expressions

Using real-time PCR analyses, we found that *M. spodocarpus* compound significantly reduced the level of Bcl-2 and Birc 5 gene expressions in both KKU-M156 (Figure 5) and KKU-100 (Figure 6) ( $p$ -value  $< 0.05$ ). This compound increased the expression of Bax-alpha in both KKU-M156 (Figure 5) and KKU-100 cells (Figure 6) as compares with the controls.



**Figure 5** Expression levels of Bcl-2, Birc 5 and Bax-alpha genes in KKU-M156 cells treated with *M. spodocarpus* compound at IC100 concentration for 48 hr. The values are presented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Significant differences with control cells are designated as \* ( $p$  value  $< 0.05$ )



**Figure 6** Expression levels of Bcl-2, Birc 5 and Bax-alpha genes in KKU-100 cells treated with *M. spodocarpus* compound at IC100 concentration for 48 hr. The values are presented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Significant differences with control cells are designated as \* ( $p$  value  $< 0.05$ )

## Discussion and Conclusion

The search for anticancer agents from natural sources has been successful worldwide. Active constituents have been isolated and are nowadays used to treat human tumors. In the present study we analyzed the *in vitro* effect on two CCA cell lines of the *M. spodocarpus* compound. Our results demonstrate that the compound has marked growth inhibitory effects on the two CCA cell lines. These results are consistent with the previous studies, which reported the growth inhibitory activity of a 7-mer cyclic peptide isolated from *M. spodocarpus* to several human cancer cell lines such as lung (Pootrakornchai R et al., 2000), breast, colon, mouth epidermoid carcinoma, and mouse lymphoid neoplasm (Sujarit K et al., 1998).

Previously, a 7-mer cyclic peptide isolated from *M. spodocarpus* has been shown to induce apoptosis in the leukemia Jurkat cell line (Uthaisang et al., 2004). To further characterize whether the growth inhibitory activity of *M. spodocarpus* compound in KKU-M156 and KKU-100 cells was related to the induction of apoptosis. We analyzed the cell morphology, nuclear morphology and DNA fragmentation of treated and untreated control cells. After treatment of the compound, we observed the typical morphological characteristics of apoptosis, such as chromatin condensation, formation of apoptotic bodies, and DNA ladder formation. These results indicate that the cytotoxic effect of this compound on KKU-M156 and KKU-100 cells are associated with induction of apoptosis.

The Bcl-2 family protein plays a crucial role in apoptosis, an increase expression of

Bax-alpha can induce apoptosis by suppressing the activity of Bcl-2. The Bax-alpha : Bcl-2 ratio, rather than Bcl-2 alone is important for the survival of drug-induced apoptosis in leukemic cell lines. Using real-time PCR analyses, we found that *M. spodocarpus* compound significantly reduced the levels of Bcl-2 and Birc 5 gene expressions in both KKU-M156 and KKU-100 cells. However, this compound increased the expression of Bax-alpha in both KKU-M156 and KKU-100 cells.

Taken together, the decreased expression levels of Bcl-2 and Birc 5 genes but increased expression level of Bax-alpha gene might contribute to the induction of apoptosis in *M. spodocarpus* compound treated KKU-M156 and KKU-1000 cells. We are now in the process of studying the expressions of Bcl-2, Birc 5 and Bax-alpha proteins of *M. spodocarpus* compound treated KKU-M156 and KKU-100 cells. More research on the application of *M. spodocarpus* compound in cancer treatment is warranted.

## Acknowledgements

We wish to acknowledge the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center (LFCRC), Faculty of Medicine, Khon Kaen University for permission to use scientific instruments during this study. We gratefully acknowledge Professor Vichai Reutrakul and colleague, Department of Chemistry, Mahidol University, for providing the *M. spodocarpus* compound. This work was funded by a research grant from the Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH) (2005-2007) and the Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

## References

Bouillet, P and Strasser. 2002. BH3-only proteins-evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115: 1567-74.

Freshney, R.I. 1987. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. (2): 227-29.

Hotz MA, Traganos F and Darzynkiewicz Z. 1992. Changes in nuclear chromatin related to apoptosis or necrosis induced by the DNA topoisomerase II inhibitor fostriecin in MOLT-4 and HL-60 cells are revealed by altered DNA sensitivity to denaturation. *Exp Cell Res.* 201: 184-91.

Pootrakornchai R, S.K., Piyachaturawat P, Reutrakul V, and Petimir S. 2000. Apoptosis induction by VR-3848 isolated from EUPHOBIAEAE in human lung cancer cell line, in Phisiology Mahidol University: Bangkok, Thailand.p.112.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D. 1990. New colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-drug Screening. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1107-12.

Sujarit K, S.K., Pootrakornchai R, Sophasan S, Reutrakul V, and Upatham S, et al. 1998. Assay for cytotoxic and antimitotic potential of Gardenia Obtusifolia in vitro. The Thailand research fond. p.3.

Uthaisang, W., et al..2004. a novel peptide derived from Eupobiaceae, induces mitochondria-dependent apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Lett.* 171-8.

Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipong S, Parkin DM, et al. 1995. Cancer in Thailand. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4: 475-83.