

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Receptor for advanced glycation end products

ลักษณะทั่วไปของ Receptor for advanced glycation end products

Receptor for advanced glycation end products (RAGE) เป็นตัวรับที่อยู่ในกลุ่มของ immunoglobulin superfamily ของโมเลกุลบนผิวเซลล์ ส่วนภายนอกเซลล์ประกอบด้วย บริเวณที่เหมือนอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin-like regions) 3 ส่วน ได้แก่ ส่วน N-terminal V-type 1 ส่วน ตามด้วยส่วน C-type 2 ส่วน (เรียกว่า C และ C') ซึ่งส่วน V เป็นส่วนสำคัญสำหรับจับกับลิแกนด์ (ligand) สำหรับส่วน C และ C' อาจไม่ได้จับกับลิแกนด์โดยตรงแต่ก็มีบทบาทสำคัญในรักษาความเสถียรให้แก่ส่วน V ในปฏิกริยาระหว่างส่วน V กับลิแกนด์ นอกจากนี้ RAGE ยังมีส่วนที่ฝังตัวอยู่ในผนังเซลล์ (transmembrane) 1 ส่วน และส่วนปลายที่อยู่ภายในเซลล์ (cytosolic tail) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 43 ตัว ส่วนปลายที่อยู่ภายในเซลล์นี้ไม่มีตำแหน่งฟอสฟอริเลชัน (phosphorylation sites), ตำแหน่งจับของ G-protein หรือตำแหน่งจับของ kinase แต่มีความสำคัญสำหรับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง RAGE (RAGE-mediated intracellular signalling) (Ding and Keller, 2005; Schmidt et al., 2000, 2001)

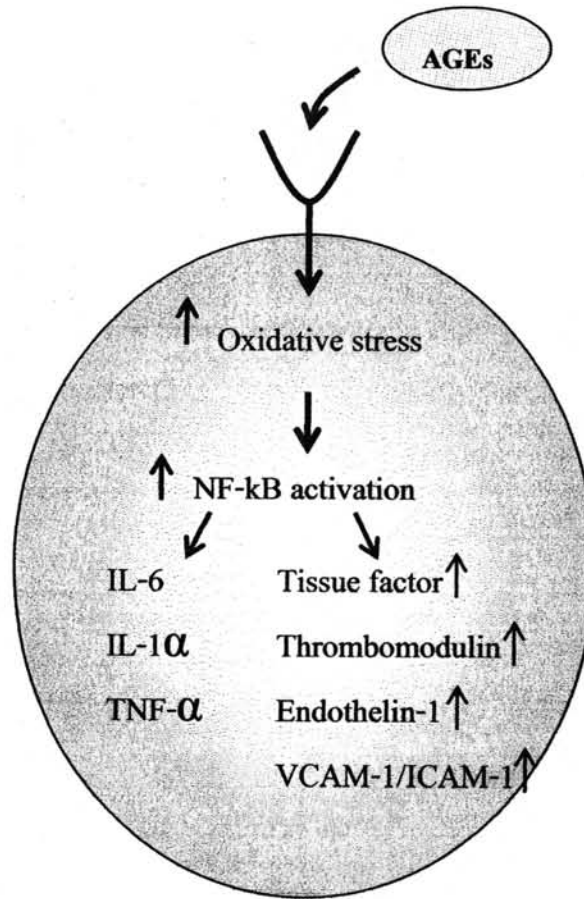
RAGE ligands

RAGE เป็นตัวรับที่สามารถจับกับลิแกนด์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด (multiligand receptor) นอกจาก AGEs แล้ว RAGE ยังสามารถทำปฏิกริยากับลิแกนด์อื่นๆ ได้อีก จากการวิเคราะห์ทางโครงสร้างของปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับลิแกนด์ เผยให้เห็นว่า RAGE จะจับกับโครงสร้างสามมิติ เช่น β -sheet และ fibrils มากกว่าจับกับลำดับกรดอะมิโน (เช่น โปริตินแบบโครงสร้างลำดับที่ 1) (Bucciarelli et al., 2002; Schmidt et al., 2001) ดังนั้น ลิแกนด์อื่นๆ ของ RAGE ได้แก่ amyloid- β peptide (Du Yan et al., 1997) และ amyloid A (Yan et al., 2000) S100/calgranulin (Hofmann et al., 1999) และ amphoterin (Hori et al., 1995) นอกจากนี้ RAGE ยังทำปฏิกริยากับโมเลกุลบนผิวของแบคทีเรีย (Chapman et al., 2002) prions (Sasaki et al., 2002) และเม็ดเลือดขาว (Chavakis et

al., 2003) เมื่อลิแกนด์เหล่านี้เข้าจับกับ RAGE จะเป็นการเริ่มกระตุ้นเซลล์โดยการส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับ ได้แก่ การกระตุ้นของ p21^{ras}, mitogen-activated protein (MAP) kinase และวิถี NF-kB (Basta et al., 2002; Bucciarelli et al., 2002; Lander et al., 1997)

Advanced glycation endproducts (AGEs) เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาไกลเคชันแบบไม่เอนไซม์ (nonenzymatic glycation) และปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของโปรตีนและไขมัน และสามารถพบ AGEs สะสมอยู่มากในสภาวะทางชีวภาพต่างๆ เช่น ในโรคเบาหวาน การอักเสบ ภาวะไตวาย โรคความผิดปกติทางระบบประสาทเช่น โรคอัลไซเมอร์ หรือการมีอายุมากขึ้น เป็นต้น แม้จะมีรายงานระบุว่า RAGE เป็นตัวรับตัวแรกของ AGEs แต่ก็ยังมีตัวรับตัวอื่นที่สามารถจับกับ AGEs ได้ เช่น lactoferrin, scavenger receptors types I and II, oligosaccharyl transferase-48 (OST-48), 80K-H phosphoprotein, galectin-3, และ CD36 เป็นต้น แต่ตัวรับเหล่านี้เมื่อทำปฏิกิริยากับ AGEs จะก่อให้เกิดการอักเสบหรือลดพิษ AGEs มากกว่าจะกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์อย่างในปฏิกิริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs (Abel et al., 1995; Anderson et al., 1999; Horie et al., 1997; Ramasamy et al., 2005; Smith et al., 1994)

ปฏิกิริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs บนแมกโครฟาจ แสดงดังภาพที่ 1 ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress และเกิดการกระตุ้น NF-kB ผ่านการกระตุ้น p21^{ras} และวิถี MAP kinase NF-kB จะเปลี่ยนแปลงการถอดรหัสของ endothelin-1, tissue factor และ thrombomodulin และการสร้างไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ได้แก่ interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) และยังเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุลสำหรับการเกาะติด ได้แก่ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) นอกจากนี้ยังส่งผลอื่นๆ เช่น ช่วยเพิ่มความสามารถในการการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (Neumann et al., 1999; Yan et al., 1994)



ภาพที่ 1 แสดงปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs เมื่อ AGEs เข้าจับกับตัวรับ RAGE บนแมกโครฟาจ ก่อให้เกิดสภาวะ oxidative stress และเกิดการกระตุ้น NF-kB ส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ ได้แก่ IL-1 α , IL-6 และ TNF- α และเพิ่มการแสดงออกของ tissue factor, thrombomodulin, endothelin-1, VCAM-1/ICAM-1 นอกจากนี้ ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (Ahmed, 2005)

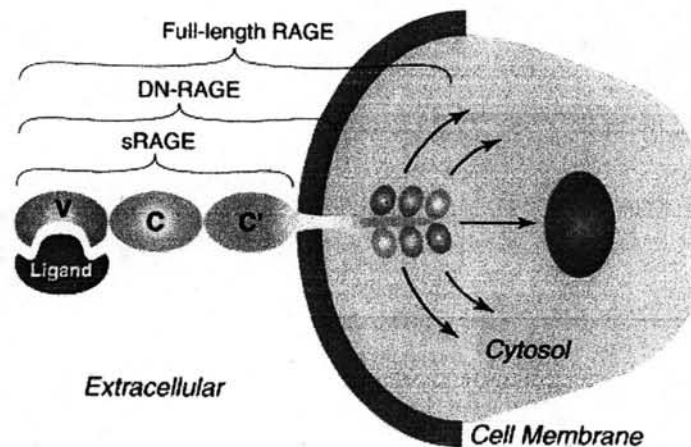
S100/calgranulin โปรตีน S100/calgranulin หรือชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไมอีลอยด์ (myeloid-related protein) เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดไมอีลอยด์มีการแสดงออกที่เด่นชัดอย่างมาก (Hofmann et al., 1999) โปรตีน S100/calgranulin เป็นสมาชิกในกลุ่มกลุ่มโปรตีนที่จับแคลเซียม (calcium-binding protein) หน้าที่ของโปรตีนกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันไปในแต่ละตัว เราสามารถพบลิแกนด์นี้ภายนอกเซลล์โดยเฉพาะตำแหน่งที่มีการอักเสบเรื้อรัง/มีการอักเสบเกิดขึ้น เช่น การมีถุงพังผืดในปอด (cystic fibrosis) และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) เป็นต้น การจับกันระหว่าง RAGE กับ S100/calgranulin นั้น สามารถ

ก่อให้เกิดการอักเสบได้ ดังเช่น เมื่อ S100A12 และ S100-B เข้าทำปฏิกิริยากับ RAGE บนผิวเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ T-cell พบว่า ทำให้เกิดการสร้างไซโตไคน์และโมเลกุลเกาะติดที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Yan et al., 2003)

Amphoterin เป็นสมาชิกในกลุ่ม high-mobility group (HMGB) -1 ของโปรตีนที่จับกับดีเอ็นเอซึ่งไม่ใช่โปรตีนฮีสโตน นอกจากจะทำหน้าที่ภายในเซลล์แล้ว เรายังพบ amphoterin ภายนอกเซลล์และบนผิวเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ที่กำลังเคลื่อนที่ในการพัฒนาการทางระบบประสาทและเนื้อเยื่อมะเร็ง นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของ amphoterin บนผิวเซลล์ทรานส์ฟอร์ม พบว่า เมื่อเกิดการจับกันระหว่าง amphoterin กับ RAGE บนผิวเซลล์มะเร็ง ทำให้การเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น โดยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ การลุกลาม การเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างเอนไซม์ MMP (Hori et al., 1995; Müller et al., 2001; Taguchi et al., 2000)

RAGE Isoforms

RAGE มีโครงสร้างที่คล้ายกัน (isoform) อยู่ 3 โครงสร้างหลัก แสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งความแตกต่างของแต่ละโครงสร้างนั้นเป็นผลมาจากกระบวนการ alternative splicing โครงสร้างของ RAGE แต่ละโครงสร้างประกอบด้วยส่วน V และส่วน C และสามารถจับกับลิแกนด์ด้วยแรงดึงดูด (affinity) ที่ใกล้เคียงกัน (Ding and Keller, 2005) ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้ได้แก่



ภาพที่ 2 แสดง RAGE Isoforms ซึ่งได้แก่ Full-length RAGE, DN-RAGE และ sRAGE (Schmidt et al., 2001)

1 Full-length RAGE เป็นรูปแบบของ RAGE ที่มีการศึกษามากที่สุด โดย RAGE โครงสร้างนี้ประกอบด้วยส่วนที่ฝังตัวอยู่ในผนังเซลล์ตามด้วยส่วนภายในเซลล์ ส่วนภายในเซลล์ของ RAGE นี้มีความจำเป็นสำหรับการส่งสัญญาณของ RAGE เช่น การกระตุ้น NF- κ B, MAP kinase และ Jun-N-terminal kinase (JUNK) (Dukic-Stefanovic et al., 2003; Haslbeck et al., 2004; Li et al., 2004; Okamoto et al., 2002; Sousa et al., 2000; Yen et al., 2001) การส่งสัญญาณผ่าน full-length RAGE นี้ถือว่ามีผลสำคัญสำหรับกระบวนการทางชีวภาพและทางพยาธิสภาพ กระบวนการเหล่านี้ ได้แก่ การเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี (chemotaxis) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การอักเสบ การเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยอัตโนมัติ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Bucciarelli et al., 2002; Schmidt et al., 2000, 2001; Thornall, 1998) เป็นที่น่าสนใจว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างลิแกนด์กับตัวรับเดียวกันสามารถส่งผลที่หลากหลายและจำเพาะกับประเภทของเซลล์ เช่น การกระตุ้น NF- κ B นั้นจำเป็นสำหรับการมีชีวิตในเซลล์บางชนิดและเหนี่ยวนำวิถีที่ให้เซลล์ตายในเซลล์อื่นๆ (Schmitz et al., 2004)

2 Dominant negative RAGE (DN-RAGE) เป็นโครงสร้างของ RAGE ที่มีการศึกษาน้อยที่สุด โครงสร้างนี้เหมือนกับ full-length RAGE แต่ขาดส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular domain) ของ full-length RAGE เชื่อว่า DN-RAGE มีหน้าที่แข่งจับลิแกนด์ของ RAGE และป้องกันการกระตุ้น full-length RAGE เนื่องจากตัวมันขาดส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ จากการศึกษาการถ่ายยีน (transfection) พบว่า เมื่อจำนวนของ DN-RAGE เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การกระตุ้น full-length RAGE ลดลง (Yan et al., 1996, 1997) แต่เนื่องจากการศึกษาในระยะสั้น (น้อยกว่า 48 ชั่วโมง) และไม่อาจแสดงให้เห็นภาพที่ถูกต้องในสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้ ลิแกนด์ของ RAGE เป็นพิษอันตรายต่อเซลล์ส่วนใหญ่และเมื่อ DN-RAGE จับกับลิแกนด์เหล่านี้คาดว่าจะเป็นการยึด/หยุดลิแกนด์ไว้ที่ผิวเซลล์ ขณะที่การยึด/หยุดลิแกนด์นั้นๆ ไว้ที่ผิวเซลล์และป้องกันการเข้าจับกับ full-length RAGE ซึ่งอาจเป็นผลดีในช่วงแรกเท่านั้น แต่ในระยะยาวอาจเกิดผลเสีย เช่น อาจเป็นที่ตั้ง (localization) ของลิแกนด์เหล่านี้ที่ผิวเซลล์ อาจเกิดการรวมตัว (recruitment) ของลิแกนด์ เกิดการออกซิเดชัน และการจับกลุ่มกันของลิแกนด์ (aggregation)

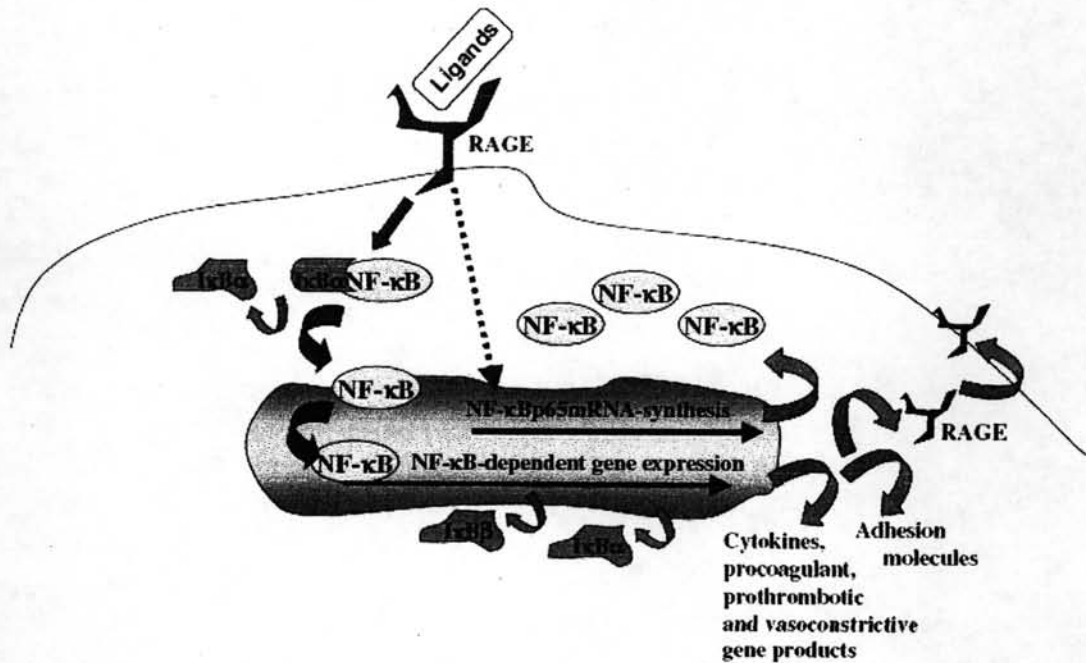
3 Soluble/secretory RAGE (sRAGE) ประกอบด้วยบริเวณ V-type และ C-type เหมือนอย่างพบใน full-length RAGE และ DN-RAGE แต่ขาดส่วนที่ฝังตัวอยู่ในผนังเซลล์ส่งผลให้ sRAGE ถูกปล่อยสู่ที่ว่างภายนอกเซลล์และสามารถเข้าทำปฏิสัมพันธ์กับลิแกนด์ของ RAGE ก่อนที่ลิแกนด์จะเข้าจับกับ full-length RAGE ทำให้ sRAGE น่าจะมีสามารถยับยั้งการกระตุ้นและการส่งสัญญาณของ full-length RAGE ผ่านทางการแยกลิแกนด์ของ RAGE ออกมาก่อนที่ลิแกนด์จะเข้าทำปฏิสัมพันธ์กับตัวรับ full-length RAGE (Ding and Keller, 2005)

ความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับ Transcription factor NF-kB

เมื่อเกิดการจับกันระหว่างลิแกนด์กับ RAGE ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้น NF-kB NF-kB เป็นกลุ่มของ homo- หรือ heterodimer transcription factor ของยีนที่เกี่ยวข้องกับความอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) การเกาะติดของเซลล์ (cell adhesion) ระบบภูมิคุ้มกัน การอักเสบ การเปลี่ยนจากเซลล์หนึ่งไปเป็นอีกเซลล์หนึ่ง (differentiation) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (Dorai and Aggarwal, 2004) NF-kB ประกอบด้วย p50, p52, p65, RelB, และ c-Rel (Karin et al., 2002; Schmitz and Baeuerle, 1995) ในภาวะปกติ NF-kB ถูกแยกออกมาอยู่ในไซโตพลาสซึมในรูปที่ไม่ทำงาน (inactive) โดยจับอยู่กับโปรตีน I κ B α (Barnes and Karin, 1997) ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการเข้าสู่นิวเคลียสของ NF-kB เมื่อ NF-kB ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าต่างๆ เช่น สารก่อมะเร็ง สารก่อการอักเสบ เป็นต้น (Dorai and Aggarwal, 2004) สิ่งเร้าเหล่านี้จะส่งเสริมการแยกตัวของ I κ B α จาก NF-kB I κ B α จะถูกฟอสฟอริเลชันที่ตำแหน่ง serine อย่างรวดเร็วโดย IKK (Singh and Agarwal, 2006) ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยา ubiquitination และการสลายตัวของ I κ B α ส่งผลให้ลำดับเบสสำหรับเข้าสู่นิวเคลียสของ NF-kB เป็นอิสระ NF-kB จึงเคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสแล้วจับกับส่วนที่จำเพาะกับ kB ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน (Barnes and Karin, 1997; Shimizu and Weinstein, 2005) เกิดการกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมายที่ถูกควบคุมด้วย NF-kB เช่น ยีนไซโตไคน์ ยีน โมเลกุลเกาะติด ยีนการแข็งตัวของเลือด (prothombotic) ยีนด้านการทำให้เซลล์ตายโดยอัตโนมัติ (Bcl-2, Bcl-X $_L$) ยีนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (COX-2, cyclin D1) หรือแม้แต่ยีน RAGE และยีน I κ B α เป็นต้น (Barnes and Karin, 1997; Bierhaus et al., 2000; Dorai and Aggarwal, 2004; Li and Schmidt, 1997)

ลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของการกระตุ้น NF-kB ผ่านทาง RAGE คือ มีช่วงเวลาที่ยาวนานที่เอาชนะวงจรยับยั้งแบบย้อนกลับอัตโนมัติได้ (autoregulatory feedback inhibition loops) (Bierhaus et al., 2001) การกระตุ้น NF-kB ที่เกิดจากการเข้าจับกันระหว่าง RAGE จับกับลิแกนด์นั้นเริ่มต้นโดยการสลายตัวของ I κ B α และ I κ B β ส่งผลให้ NF-kB เคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสและกระตุ้นการถอดรหัสยีนที่ถูกควบคุมด้วย NF-kB รวมถึงการสร้าง I κ B α และ I κ B β ในขณะเดียวกันก็เหนี่ยวนำการสังเคราะห์ NF-kBp65 ด้วย (Bierhaus et al., 2001) p65 mRNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่นี้ทำให้มีการสะสมของ NF-kBp65 ในรูปที่ทำงาน (active) มากเกินพอ ตรงกันข้ามกับจำนวน I κ B α ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ไม่เพียงพอสำหรับจับกับ NF-kBp65 ในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ I κ B β ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่พร้อมกันนั้นก็มีฤทธิ์เป็น hyperphosphorylate จึงช่วยแยก NF-kB จาก I κ B α (Johnson et al., 1996; Thompson et al., 1995) ดังนั้น I κ B β อาจทำหน้าที่ช่วยเสริมการ

กระตุ้น NF- κ B ผ่านทาง RAGE (Bierhaus et al., 2001) ในอีกทางหนึ่ง การแสดงออกของ RAGE ถูกเหนี่ยวนำโดย NF- κ B (Li and Schmidt, 1997) การรักษาการกระตุ้น NF- κ B ส่งผลให้ตัวรับมีจำนวนเพิ่มขึ้นและทำให้มั่นใจถึงการรักษาและเพิ่ม/ขยายสัญญาณต่อไป แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดง RAGE-dependent NF- κ B activation (Bierhaus et al., 2005)

เมื่อเกิดการจับกันระหว่าง RAGE กับลิแกนด์ ก่อให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณที่เป็นลำดับขั้น การกระตุ้นของ ERK1/2 (p44/p42) MAP kinase พบได้ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Lander et al., 1997), tubular epithelial myofibroblasts (Li et al., 2004), myoblasts (Sorci et al., 2004), osteoblasts (Cortizo et al., 2003) และ monocytic cells (Shanmugam et al., 2003) ส่วนการกระตุ้นของ p38 และ SAPK/JNK MAP kinase สามารถพบได้ในเซลล์โมโนไซต์/แมกโครฟาจและเซลล์มะเร็ง (Sorci et al., 2004; Taguchi et al., 2000; Yeh et al., 2001) นอกจากนี้ rho-GTPases, phosphoinositol-3-kinase, และวิถี Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ RAGE (Huang et al., 2001; Huttunen et al., 1999; Taguchi et al., 2000) ปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับลิแกนด์อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species) ผ่านทาง NADPH oxidases และ/หรือ

กลไกอื่น (Lander et al., 1997; Wautier et al., 2001) การส่งสัญญาณเหล่านี้ก่อให้เกิดการกระตุ้น NF-kB และความหลากหลายที่พบในการส่งสัญญาณผ่านทาง RAGE นั้น บ่งว่า ลิแกนด์ของ RAGE ที่ต่างกันอาจเหนี่ยวนำวิถีที่ต่างกัน โดยเฉพาะในเซลล์ต่างชนิดกัน ด้วยเหตุนี้ ยังเป็นการเพิ่มความซับซ้อนให้กับวงจร RAGE ขึ้นไปอีก

การถอดรหัส RAGE ถูกควบคุมโดย transcription factor หลายชนิด ได้แก่ SP-1, Activating protein-1 (Ap-1), NF-kB และ NF-IL6 (Li and Schmidt, 1997) การแสดงออกของ RAGE มีทั้งแบบแสดงออกตลอดเวลา (constitutive) และถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออก ขึ้นกับชนิดของเซลล์และระยะของการพัฒนาการ (Brett et al., 1993; Hori et al., 1995) โดยที่ RAGE จะมีแสดงออกตลอดเวลาช่วงพัฒนาการของตัวอ่อน และการแสดงออกของ RAGE จะลดลงในช่วงวัยผู้ใหญ่ ยกเว้นในปอดและผิวหนังที่มีการแสดงออกของ RAGE คงตลอดช่วงชีวิต ในระดับเซลล์ พบว่ามีการแสดงออกของ RAGE บนผิวของเซลล์เกือบทุกชนิด ได้แก่ เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial) เซลล์เยื่อโกลเมอรูลาร์ (glomerular epithelial cell) เซลล์โมโนไซท์/เซลล์แมโครฟาจ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์ประสาท เป็นต้น (Brett et al., 1993) แต่ในสภาวะปกติ จะการแสดงออกของ RAGE อย่างไม่มีนัยสำคัญ การแสดงออกของ RAGE สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีการสะสมของลิแกนด์และ/หรือ transcription factor ที่ควบคุม RAGE ถูกกระตุ้น (Bierhaus et al., 2005)

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ RAGE กับมะเร็ง

RAGE เป็นตัวรับตัวหนึ่งที่มีเกี่ยวข้องกับการลุกลาม/การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาของ Kuniyasu และคณะ (2001) ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของ RAGE ด้วย RAGE anti-sense S-oligodeoxynucleotide (ODN) ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (MKN28) ที่มีระดับการแสดงออกของ RAGE สูง พบว่าความสามารถในการลุกลามลดลงเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ RAGE sense S-ODN ตรงข้ามกับ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (MKN45) ที่ไม่มีการแสดงออกของ RAGE ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับ RAGE anti-sense/sense S-ODN นอกจากนี้ การเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองที่ได้รับการทดสอบด้วย RAGE anti-sense/sense S-ODN ก็ไม่พบความแตกต่างเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ RAGE กับความสามารถในการลุกลาม/การแพร่กระจาย แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ มีการศึกษาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Hirata et al., 2003) เซลล์มะเร็งตับอ่อน (Takada et al., 2001) และเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด oral squamous

cell carcinoma (Bhawal et al., 2005) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ RAGE กับความสามารถในการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง Takada และคณะ (2004) ได้รายงานถึงการแสดงออกของ MMP-9 ที่เป็นไปในทางเดียวกันกับการแสดงออกของ RAGE ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งระดับอ่อน และการแสดงออกของ RAGE ยังมีความเกี่ยวข้องกับ การสร้างหลอดเลือดในเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด oral squamous cell carcinoma โดยพบว่า ความเข้มข้นของ RAGE มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ microvessel density (MVD) (Sasahira et al., 2007) และเมื่อเกิดการกระตุ้น RAGE จะส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ VEGF ผ่านการกระตุ้น NF-kB และ AP-1 (Okamoto et al., 2002)

ปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับลิแกนด์ก็ส่งผลต่อเซลล์มะเร็งเช่นกัน จากการรายงานของ Ishiguro และคณะ (2005) พบว่ามีการแสดงออกร่วมกันระหว่าง RAGE mRNA กับ amphoterin mRNA ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและมีการแสดงออกที่สูงกว่าในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากปกติ ส่วน Kuniyasu และคณะ (2002) ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าการแสดงออกของ RAGE กับ amphoterin ในเซลล์มะเร็งมีผลต่อการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่และการลุกลาม เมื่อทดสอบเซลล์ด้วย RAGE และ amphoterin anti-sense/sense S ODN และในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ที่มีการแสดงออกร่วมกันระหว่าง RAGE และ amphoterin พบว่ามีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกร่วมกันระหว่าง RAGE และ amphoterin ยิ่งเป็นการเน้นย้ำว่าการแสดงออกร่วมกันระหว่าง RAGE กับ amphoterin มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการลุกลามและการแพร่กระจายในมะเร็งลำไส้ (Kuniyasu et al., 2003) Taguchi และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็ง C6 glioma ของหนูซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ RAGE และ amphoterin แต่ไม่มีการแสดงออกของลิแกนด์อื่นๆ ของ RAGE เมื่อทดลองให้ sRAGE, anti-RAGE หรือ anti-amphoterin แก่หนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง C6 glioma พบว่าปริมาณของเนื้องอกลดลง และเมื่อทำการทดลองถ่ายยีน full length RAGE ยีน RAGE ที่พร่องส่วนไซโตพลาสซึม (tail-deletion RAGE) หรือยีน sRAGE ลงในเซลล์มะเร็งแล้วนำโคลน (clone) ไปปลูกถ่ายในหนูทดลอง พบว่า เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE มากเกินพอ (overexpression) จะมีปริมาณของเนื้องอกเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock-transfectants) แต่ปริมาณของเนื้องอกจะลดลงในประมาณ 3 และ 6.5 เท่า ในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ RAGE ที่พร่องส่วนไซโตพลาสซึมและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ sRAGE ตามลำดับ นอกจากนี้ เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE และเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุมเจริญเติบโตและลุกลามเข้าสู่กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบข้างตั้งแต่วันที่ 1 ในขณะที่

เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ RAGE ที่พ่องส่วนไซโตพลาสซึมและเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ sRAGE จะจำกัดอยู่เฉพาะในบริเวณที่ฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไปจนถึงวันที่ 14 เซลล์มะเร็งเหล่านั้นจึงเริ่มลุกลามเนื้อเยื่อข้างเคียง ในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE จะมีการทำงานของ MMP-9 และ MMP-2 สูงขึ้นแต่ในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ RAGE ที่พ่องส่วนไซโตพลาสซึมและในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ sRAGE จะมีการทำงานของ MMP-9 และ MMP-2 ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาในหลอดทดลอง เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE มากเกินพอจะมีความสามารถในการลุกลามดีขึ้น ตรงกันข้ามกับเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ RAGE ที่พ่องส่วนไซโตพลาสซึมหรือเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ sRAGE พบว่า ความสามารถในการลุกลามลดลง เมื่อให้ sRAGE, anti-RAGE หรือ anti-amphoterin แก่เซลล์มะเร็ง พบว่าสามารถยับยั้งการลุกลามได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การกีดกัน (blockade) ปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ amphoterin ส่งผลให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ การลุกลาม และการทำงานของ MMP ของเซลล์มะเร็งลดลง

จากการศึกษาปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตและการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (Ishiguro et al., 2005) หรือในเซลล์มะเร็งไต ปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs นอกจากจะเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ยังส่งเสริมการสร้าง IL-6 อีกด้วย (Miki et al., 1993) จากการศึกษาของ Abe และคณะในปี 2004 พบว่า ปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs ชนิด glyceraldehyde และ glycolaldehyde ในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma กระตุ้นการเจริญเติบโต/การเพิ่มจำนวนเซลล์ การเคลื่อนที่ และการลุกลามของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญในหลอดทดลอง เมื่อปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งผิวหนังแก่หนูทดลอง และฉีด anti-RAGE antibody ผ่านทางหน้าท้องหนูทดลอง พบว่า ขนาดของเนื้องอกลดลง อัตราการมีชีวิตรอดของหนูทดลองยาวนานขึ้น และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปที่ปอดด้วย ส่วนปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ S100P ในเซลล์มะเร็งตับอ่อน พบว่ามีความสัมพันธ์กับอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ การมีชีวิตรอด การเคลื่อนที่ และการลุกลามของเซลล์มะเร็งจากผลการทดสอบทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต โดยระดับของ S100P ที่สูงขึ้นจะส่งผลให้การเจริญเติบโต/ขนาดของเนื้องอกเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า ในทางกลับกัน เมื่อระดับของ S100P ลดลงจะส่งผลให้การเจริญเติบโต/ขนาดของเนื้องอกลดลงถึง 80% ในหนูทดลอง (Arumugam et al., 2005) นอกจากนี้ ปฏิกริยาระหว่าง RAGE กับ S100P ในเซลล์ NIH3T3 ช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และช่วยให้เซลล์รอดชีวิตมากขึ้นหลังจากได้รับยาต้านมะเร็ง 5-fluorouracil (5-FU) (Arumugam et al., 2004)

แต่อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ RAGE ในเซลล์มะเร็งปอดนั้น พบว่า มีการแสดงออกของ RAGE ลดลงหรือไม่พบการแสดงออกเลยทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ซึ่งตรงกันข้ามกับ

ในเนื้อเยื่อปอดปกติที่พบว่ามี การแสดงออกของ RAGE ในระดับสูง (Schraml et al., 1997) และเมื่อทำการถ่ายยีนให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด non-small cell lung carcinoma พบว่า เซลล์มะเร็งปอดที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE มากเกินพอมีการเจริญ/การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเนื้องอกลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งปอดที่มีการแสดงออกของ RAGE ที่พร่องส่วนไซโตพลาสซึมและเซลล์ในกลุ่มควบคุม (mock-transfected cell) จากการทดสอบทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต (Bartling et al., 2005) นอกจากนี้ ในเซลล์ myoblast ซึ่งเป็นเซลล์ตัวอ่อนที่อยู่ในกล้ามเนื้อ พบว่า ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ RAGE ที่พร่องส่วนไซโตพลาสซึมนั้น เซลล์จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเคลื่อนที่ และการลุกลามเพิ่มมากขึ้น แต่การเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายลดลง ตรงกันข้ามกับในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE จะเกิดผลในทางตรงกันข้าม (Riuzzi et al., 2006)

Takada และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร โพลีฟีนอลในชา epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HLP) ที่ไม่มีการแสดงออกของ RAGE ในภาวะปกติ พบว่าสาร EGCG มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย และยังพบว่าเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ RAGE เกิดขึ้นด้วย โดยเซลล์มะเร็งที่พบการแสดงออก RAGE บนผิวเซลล์ดูเหมือนว่าจะมีชีวิตรอดอยู่ได้ นอกจากนี้ มีรายงานสนับสนุนว่า RAGE ช่วยส่งเสริมการมีชีวิตรอดของเซลล์ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนด้านการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย Bcl-2 (Huttunen et al., 2000)

ดังที่กล่าวมาข้างต้น การถอดรหัส RAGE ถูกควบคุมโดย transcription factor หลายชนิด (Li and Schmidt, 1997) แต่ส่วนใหญ่อยู่ภายใต้การควบคุมของ NF- κ B ซึ่งถูกเหนี่ยวนำการกระตุ้นตลอดเวลาในโรคมะเร็ง (Demell, 2002) มีบางการศึกษาเสนอว่าการลดลงของ transcription factor ไม่น่าเป็นสาเหตุทำให้การแสดงออกของ RAGE mRNA ลดลงในเซลล์มะเร็ง การแสดงออกของโปรตีน RAGE ที่ลดลงชัดเจนกว่าการลดลงของ RAGE mRNA ในเซลล์มะเร็งปอด บ่งว่าน่าจะเป็นผลจากการควบคุมภายหลังการถอดรหัส (post-transcriptional regulation) (Bartling et al., 2005) ดังนั้น การแสดงออกของ RAGE ที่ลดลงเนื่องจากการลดระดับ NF- κ B และ Sp-1 จึงไม่น่าเป็นไปได้ในเซลล์มะเร็ง (Li and Schmidt, 1997) กลไกที่เกิดขึ้นภายหลังการถอดรหัสน่ามีความเกี่ยวข้องมากกว่า (Bartling et al., 2005) แต่การรายงานของ Marx และคณะ (2002) พบว่า ยาในกลุ่ม thiazolidinediones (TZDs) ได้แก่ rosiglitazone และ pioglitazone ซึ่งเป็นยาใช้รักษาโรคเบาหวาน มีฤทธิ์ลดการแสดงออกของโปรตีน RAGE 73 \pm 9% และ 70 \pm 9% ตามลำดับ และลดการแสดงออกของ RAGE mRNA ที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วย TNF- α อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการแสดงออกที่ลดลงนี้เป็นผลมาจากการยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B ที่ด้าน proximal NF- κ B ของโปรโมเตอร์ของ

RAGE จากการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าการลดการแสดงออกของ RAGE เป็นผลมาจากการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB

2.2 ขมิ้นชัน

ลักษณะทั่วไปของขมิ้นชัน

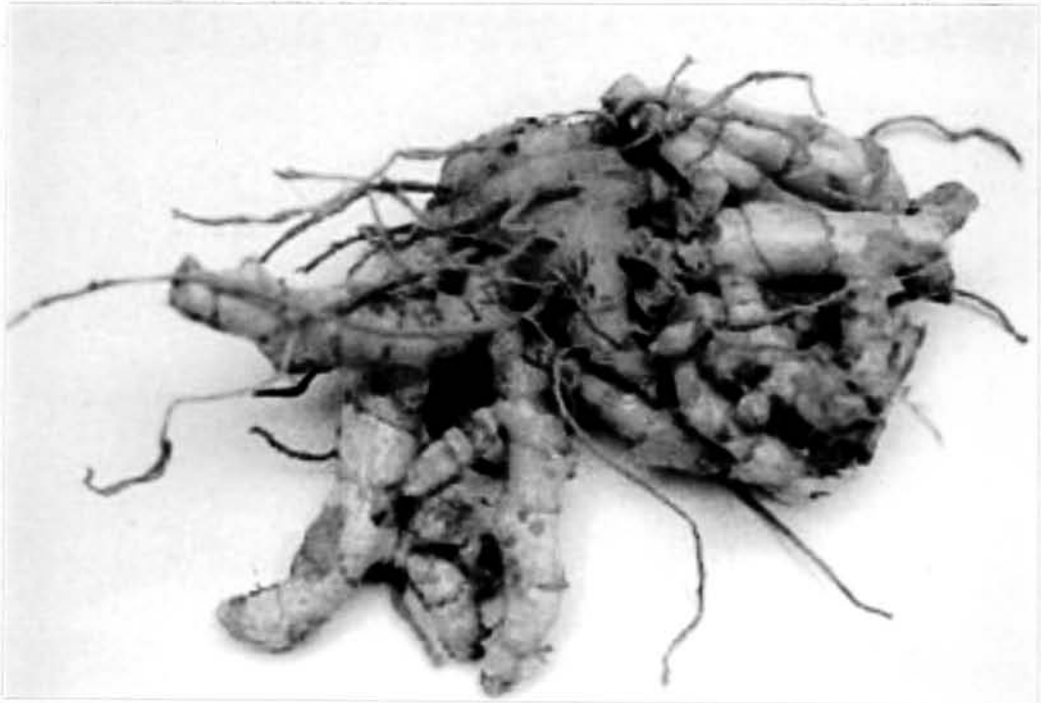
การจัดหมวดหมู่ขมิ้นชันตามหลักอนุกรมวิธาน (Chattopadhyay et al., 2004)

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Liliopsida
Subclass	: Commelinids
Order	: Zingiberales
Family	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Curcuma</i>
Species	: <i>Curcuma longa</i>

ขมิ้นชัน หรือชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า Turmeric มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. ชื่อพ้องว่า *Curcuma domestica* Valetton. และมีชื่อพื้นเมืองว่า ขมิ้น ขมิ้นแกง ขมิ้นแดง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขี้มัน หมิ้น (ใต้) ตายอ สะยอ (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2548; สมพร ภูติยานันต์, 2541) ขมิ้นชันเป็นพืชในตระกูลเดียวกับขิง ข่า และมีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขมิ้นชันถือว่าเป็นสมุนไพรหนึ่งที่มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานจนถึงปัจจุบัน มีสรรพคุณเป็นที่ยอมรับจนเป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรายาของหลายประเทศในทวีปเอเชีย ทั้งเอเชียใต้ เช่น อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี รวมทั้งในยุโรป เช่น เยอรมัน อีกทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งเป็นอาหารในลักษณะของเครื่องเทศแต่งสี กลิ่น รส เครื่องสำอาง และสีย้อม (ปราณี ชาลิตธารัง และคณะ, 2544)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้นชันเป็นพืชล้มลุกมีอายุหลายปี ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า มีทั้งเหง้าหลักที่เจริญชูตั้ง รูปไข่หรือรูปไข่แกมรี บางครั้งเรียกว่าเหง้าหลักว่า หัว ด้านข้างของเหง้าหลักแตกแขนงในแนวระนาบ แต่ละแขนงมักแตกย่อยต่อไปได้อีก 1-2 ครั้ง เหง้าแขนงรูปคล้ายทรงกระบอกหรือคล้ายนิ้วมือ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งเรียกเหง้าแขนงว่า แง่ง เนื้อเหง้าสีส้ม และมีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่มีกาบใบเรียงซ้อนอัดแน่น สูงได้ถึง 1 เมตรหรือมากกว่า มีใบ 6-10 ใบต่อดัน ใบเดี่ยว ออกสลับถี่ กาบใบยาว 40-60 เซนติเมตร แผ่นใบรูปรีหรือรีแกมขอบขนาน กว้าง 10-20 เซนติเมตร ยาว 30-70 เซนติเมตร โคนใบสอบแคบหรือมน ปลายใบแหลมมาก ช่อดอกรูปทรงกระบอก กว้าง 5-9 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร มีใบประดับจำนวนมาก รูปรีแกมขอบขนาน เรียงเวียนถี่รอบแกนช่อดอก ใบประดับที่อยู่บริเวณโคนช่อดอกมีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวแกมเขียว ยาว 5-6 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร ขอบโคนใบประดับประกบติดกับใบประดับที่อยู่ใกล้เคียงและติดกับแกนช่อดอกเกิดเป็นซอกคล้ายกระเปาะ ใบประดับที่อยู่บริเวณปลายช่อดอกมีสีเขียวแกมเขียวอ่อน ปลายใบประดับมีแถบสีเขียวอ่อนหรือแถบสีชมพูอ่อน โคนใบประดับไม่ประกบติดกันเป็นกระเปาะ ดอกออกในซอกกระเปาะใบประดับ 3-5 ดอกต่อซอก และทยอยบานดอกยาวประมาณ 5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีขาวใส ติดกันเป็นหลอดสั้น ปลายหยักไม่เท่ากัน กลีบดอกสีขาว โคนติดกันเป็นหลอดยาว ปลายผายและแยกเป็น 3 กลีบ เกสรตัวผู้ที่เป็นหมันแผ่เป็นกลีบขนาดใหญ่ 3 กลีบ กลีบกลางรูปไข่กลับ สีเหลืองอ่อนและมีแถบสีเหลืองเข้มบริเวณกลางกลีบสองกลีบข้างรูปรีแกมขอบขนานสีเหลืองอ่อน เกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์ มีก้านสั้น อับเรณูเล็กเรียวยาวและมีจงอย โอบรอบก้านชูออดเกสรตัวเมีย รังไข่ 3 ห้อง ผลกลมหรือรี แต่มักไม่ติดผล (ปราณี ชาวลิตขำรังและคณะ, 2544)



ภาพที่ 4 แสดงเหง้าของขมิ้นชัน (นันทพร นิลวิเศษ และคณะ, 2535)

สรรพคุณในตำรายาไทย (สมพร ภูติยานันต์, 2541)

ใบ บำรุงโลหิต เจริญอาหาร แก่ริดสีดวงทวาร รักษาเมะเร็ง แก้ไข้ชาง แก้อุจจาระเป็นมูก เลือด แก้ท้องเดิน ปวดมวนท้อง ธาตุพิการ แก้ไข้ถอนพิษ แก้บิดมูกเลือด แก้เลือดเสีย แก้อาเจียน เป็นเลือด ผสมยาแก้โรคกระเพาะลำไส้และริดสีดวงลำไส้ รักษาอาการผมร่วง ผมหงอก รังแค เหา บำรุงผิว รักษาแผลผิวหนังคัน

เหง้า ช่วยเจริญอาหาร แก้อาการวิงเวียน แก่หัวคี่ แก้อาการชัก ลดไข้ ขับปัสสาวะ รักษาอาการท้องมาน แก้ไข้ผอมแห้ง แก้เสมหะและโลหิตเป็นพิษ แก้โลหิตออกทางทวารหนักและเบา แก้ตกเลือด แก้อาการตาบวม แก้ปวดฟันเหงือกบวม มีฤทธิ์ระงับเชื้อ ด้านวัณโรค ป้องกันโรคหนองใน ช่วยลดอาการบวมซ้ำ สมานแผลสดและแผลถลอก แก่น้ำกัดเท้า แก่ชันนะตุ แก่กลากเกลื้อน

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ

ในเหง้าขมิ้นชันมีสารประกอบที่สำคัญ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil) และ สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ โดยน้ำมันหอมระเหยนั้นมีสีเหลืองอ่อนไปจนถึงสีเหลืองอมส้ม มีสารสำคัญหลักคือ เทอร์เมอโรน (turmerone) มีประมาณ 60% และ ซิงจีเบอรีน (zingiberene) มีประมาณ 25% และพบ essential oil ต่างๆ อีกมากมาย คือ borneol, iso-borneol, camphor, caryophyllene, cineol, curcumene, curcumenol, curdione, curzerenone, eugenol, limonene, linalool, α -phellandrene, α -pinene, β -pinene, (+) – sabinene, terpinene, terpineol, turmerone ส่วนรายละเอียดของสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ จะขอกกล่าวในตอนถัดไป

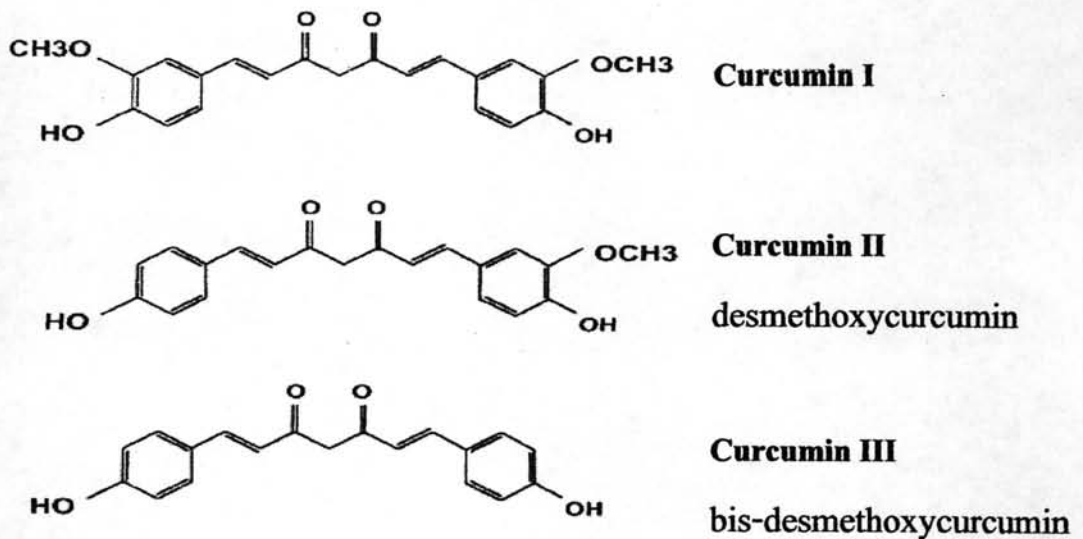
สารองค์ประกอบต่างๆ ที่พบในรากและเหง้าทั้งหมด มีดังต่อไปนี้ bisabolone, α -altantone, γ -atlantone, borneol, campesterol, cholesterol, 1,8-cineole, curcumin, bis-demethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curline, p-cymene, saturated and unsaturated fatty acid, guaiacol, bis-p-hydroxy-cinnamonyl methane, di-p-coumaroyl methane, diferuloyl methane, feraloyl-p-coumaroyl methane, hydroxyl-cinnamoyl-feruloyl methane, α -phellandrene, (+) – sabinene, β -sesquiphellandrene, β -siotosterol, stigmasterol, tolyl methyl carbinol, p-tolylmethyl carbinol, turmerone, α -turmerone, ar-turmerol, β -turmerone, zingiberene, dihydrocurcumin, 1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl-1,6-heptadiene-3,5-dione), D-arabinose, D-fructose, D-glucose, oleoresin, camphene, camphor, 1,4-cineole, curcumone, zingerene, sesquiterpene, essential oil และ pigment (สมพร ภูติยานันต์, 2541)

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoid)

สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์เป็นสาร โพลีฟีนอลที่ทำให้ขมิ้นชันมีสีเหลืองส้ม สามารถแยกเคอร์คิวมินอยด์ออกมาจากขมิ้นชันโดยการสกัดด้วยเอทานอล สารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ ประกอบด้วยเคอร์คิวมิน (curcumin I) ประมาณ 94%, เดสมเมธอกซีเคอร์คิวมิน (desmethoxycurcumin หรือ curcumin II) ประมาณ 6% และ บิสเดสมเมธอกซีเคอร์คิวมิน (bis-desmethoxycurcumin หรือ curcumin III) ซึ่งมีประมาณ 0.3% แสดงคังภาพที่ 5 (Aggarwal et al., 2005)

เคอร์คิวมินหรือ diferuloylmethane เป็นสารหลักในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ซึ่งแยกได้จากเหง้า/รากของขมิ้นชัน มีชื่อทางเคมีตามระบบ IUPAC คือ (1,7-bis (hydroxyl-3-methoxy-phenyl) hepta-1,6 diene-3,5-diene) เคอร์คิวมินถูกแยกออกมามีครั้งแรกในปี ค.ศ. 1815 และมีการรายงาน

โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมิน ($C_{21}H_{20}O_6$) ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1910 โดย Lampe และคณะ เคอร์คิวมินไม่ละลายในน้ำและอีเทอร์แต่สามารถละลายได้ในเอทานอล อัลคาไล ทีโตน คลอโรฟอร์ม และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เคอร์คิวมินมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 183 องศาเซลเซียส และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.37 (Aggarwal et al., 2003; Chattopadhyay et al., 2004; Jagetia and Aggarwal, 2007)



ภาพที่ 5 แสดงสูตร โครงสร้างของสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ ประกอบด้วย curcumin I, curcumin II และ curcumin III (Aggarwal et al., 2003)

Wang และคณะ (1997) ได้รายงานการสลายตัวและความคงตัวของเคอร์คิวมิน พบว่า เมื่อ บ่มเคอร์คิวมินใน 0.1M phosphate buffer และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) เคอร์คิวมินประมาณ 90% จะสลายตัวภายใน 30 นาที และเมื่อทดสอบเคอร์คิวมินภายใต้ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ pH 3-10 พบว่าการสลายตัวของเคอร์คิวมินขึ้นกับ pH และจะสลายตัวเร็วขึ้นที่สภาวะที่เป็นกลางถึงเบส เคอร์คิวมินจะคงตัวมากขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% ซีรัมลูกวัวและในเลือดของมนุษย์ เคอร์คิวมินน้อยกว่า 20% จะสลายตัวภายใน 1 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ยังคงมีเคอร์คิวมินเหลืออยู่ประมาณ 50% ผลผลิตหลักจากการสลายตัวของเคอร์คิวมินคือ *trans*-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal และ

ผลผลิตอื่นๆ ที่เกิดจากสลายตัวของเคอร์คิวมิน ได้แก่ vanillin, ferulic acid และ feruloyl methane จำนวนของ vanillin จะเพิ่มตามเวลาที่บ่ม

เคอร์คิวมิน:ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

เคอร์คิวมินเป็นสารหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งที่ดี มีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเคอร์คิวมินเป็นจำนวนมากและมีการศึกษาต่อเนื่องกันมาเป็นระยะเวลายาวนานจนถึงปัจจุบันก็ยังคงมีผลงานวิจัยเกี่ยวกับเคอร์คิวมินตีพิมพ์ออกมาอย่างต่อเนื่อง ฤทธิ์ต้านมะเร็งของเคอร์คิวมิน อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ลดการกระตุ้น NF- κ B ฤทธิ์ลดการกระตุ้นวิถี STAT3 ฤทธิ์ยับยั้งการเหนี่ยวนำโมเลกุลสำหรับการเกาะติด ฤทธิ์ลดการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ MMP-9 และ inducible nitric oxide synthase (INOS) ฤทธิ์ลดการแสดงออกของ cyclin D1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ฯลฯ (Aggarwal et al., 2005) จะเห็นว่าเคอร์คิวมินออกฤทธิ์หลากหลายเพื่อต้าน/ยับยั้งมะเร็ง ซึ่งผู้วิจัยขอนำเสนอฤทธิ์เพียงบางส่วนเท่านั้น

จากฤทธิ์ต้านมะเร็งของเคอร์คิวมินผ่านการยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B Aggarwal และคณะ (2006) รายงานว่าเคอร์คิวมินยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B โดยเคอร์คิวมินยับยั้งการทำงานของ IKK ยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันและการสลายตัวของ I κ B α และยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ส่งผลให้การแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ NF- κ B ลดลง ยีนเหล่านั้นได้แก่ ยีนเพิ่มจำนวนเซลล์ (COX-2, cyclin D1 และ c-myc) ยีนต้านตายของเซลล์โดยอัตรโนมิตี (inhibitor of apoptosis protein1 (IAP1), IAP2, X-chromosome-linked IAP, Bcl-2, Bcl-x(L), Bfl-1/A1 ฯลฯ) และยีนการแพร่กระจายของเซลล์ (VEGF, MMP-9, ICAM-1) เป็นต้น นอกจากนี้ เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ยับยั้ง transcription factor ตัวอื่นอีกด้วย เช่น AP-1 โดยลดการจับกับดีเอ็นเอในตำแหน่งโปรโมเตอร์ แต่เคอร์คิวมินไม่ส่งผลต่อ transcription factor Sp1 (Singh and Aggarwal, 1995)

ในมะเร็งสมองชนิด glioma เคอร์คิวมินยับยั้งการดูกลามของเซลล์มะเร็งสมองผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP ซึ่งการยับยั้ง MMP เป็นผลมาจากเคอร์คิวมินออกฤทธิ์ยับยั้งการเข้าจับกับดีเอ็นเอและการถอดรหัสของ AP-1 และยับยั้งการทำงานของ MAP kinase (Kim et al., 2005) นอกจากนี้ เคอร์คิวมินยังออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ส่งผลทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงและเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยอัตรโนมิตี (Nagai et al., 2005)

ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มี NF- κ B และ IKK ในรูปที่ทำงานตลอดเวลา เมื่อทำการทดสอบกับเคอร์คิวมิน พบว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B ผ่านทางการหยุดการทำงานของ IKK ทำให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการมีชีวิตรอดและการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ NF- κ B ได้แก่ Bcl-2, cyclin D1, IL-6, COX-2 และ MMP-9 ถูกยับยั้ง ส่งผลให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง การเจริญของเซลล์หยุดที่ระยะ G1/M และเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยอ้อมโนมิติ (Aggarwal et al., 2004a, 2004b) นอกจากนี้ LoTempio และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอเช่นกัน พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่เป็นไปตามความเข้มข้นและลดระดับการแสดงออกของ NF- κ B และการแสดงออกของ NF- κ B ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- β เมื่อทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอให้แก่หนูทดลองและฉีดเคอร์คิวมินตรงตำแหน่งที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง กลับพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็ง คณะผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์ให้เคอร์คิวมินในรูปของแผ่นและแปะในตำแหน่งที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ส่งผลให้เนื้องอกมีขนาดลดลง

จากการศึกษาในมะเร็งเต้านม พบว่า เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์และการลุกลามผ่านการยับยั้งลด MMP-2 และเพิ่ม tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP- 1) (Di et al., 2003; Shao et al., 2002) นอกจากนี้ เคอร์คิวมินยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ ornithine decarboxylase ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Mehta et al., 1997) จากรายงานของ Kim และคณะ (2001) เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย H-ras และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านทางกลไก Bcl-2 และเพิ่ม Bax ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่คือต่อยารักษามะเร็ง paclitaxal ซึ่งพบว่ายามีฤทธิ์กระตุ้น NF- κ B เมื่อทำการทดสอบกับเคอร์คิวมิน พบว่า สามารถยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B โดยยับยั้งการทำงานของ IKK ป้องกันการฟอสฟอริเลชัน และการสลายตัวของ I κ B α นอกจากนี้ เคอร์คิวมินยังลดการแสดงออกของโปรตีนด้านการทำให้เซลล์ตาย (XIAP, IAP-1, IAP-2, Bcl-2 & Bcl-xL) โปรตีนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (COX- 2, c-Myc & cyclin D1) และโปรตีนการแพร่กระจายเซลล์ (VEGF, MMP-9 & ICAM-1) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยา paclitaxel ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบในหนูทดลอง พบว่าเคอร์คิวมินช่วยลดอุบัติการณ์การแพร่กระจายไปที่ปอดของเซลล์มะเร็งเต้านมและยังยับยั้งการแสดงออกของ NF- κ B, COX-2 และ MMP-9 (Aggarwal et al., 2005) นอกจากนี้ เคอร์คิวมินยับยั้งการทำงานของ AP-1 ทำให้การแสดงออกและการทำงานของ MMP ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ AP-1 ลดลง ส่งผลยับยั้งการลุกลามและลดจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมแพร่กระจายไปที่ปอดของหนูทดลอง (Bachmeier et al., 2007)

มีการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดหลายชนิด จากการรายงานของ Wu และคณะ ในปี 2002 พบว่า เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ หยุดเซลล์ที่ระยะ G0/G1 หรือ G2/M และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านการลดการแสดงออกของ c-myc, Bcl-2 และ mutant-type p53 นอกจากนี้ ยังเพิ่มการแสดงออกของ Fas ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด Burkitt's lymphoma (CA46) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sun และคณะ ในปี 2004 ที่ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็ง human Burkitt's lymphoma (Raji) แต่เคอร์คิวมินไม่ส่งผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนหรือเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายในเม็ดเลือดขาวปกติชนิด peripheral blood mononuclear cell นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เป็นไปตามเวลาและความเข้มข้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด human chronic myelogenous leukemia K562 (Wu et al., 2003) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด NB4 (Li et al., 2005) Kwon และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด human leukemic monocyte lymphoma cell line U937 พบว่า เคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของ cyclin D1 ทั้งในระดับโปรตีนและระดับ mRNA และเพิ่มการแสดงออกของ BTG2 mRNA ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ BTG2 ที่แสดงออกมากเกินไปส่งผลให้การแสดงออกของ mRNA ของ cyclin D1 ลดลงด้วย นอกจากนี้ เคอร์คิวมินยังยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของ p65 NF- κ B ซึ่งส่งผลให้การแสดงออกของ cyclin D1 mRNA ลดลงด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด mantle cell lymphoma (Shishodia et al, 2005) ซึ่งพบว่า มีการแสดงออกของ NF- κ B และ IKK ในรูปที่ทำงานตลอดเวลารวมถึง I κ B α ในรูปที่ถูกฟอสฟอริเลต เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการทำงานของ NF- κ B การฟอสฟอริเลชันของ I κ B α การทำงานของ IKK การกระตุ้น Akt ซึ่งจำเป็นสำหรับการกระตุ้น IKK และการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของ p65 จึงส่งผลให้การแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ NF- κ B (I κ B α , Bcl-2, Bcl-xL, COX-2, cyclin D1) ลดลงด้วย นอกจากนี้ ยีนการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cIAP1, XIAP, TRAF1) และไซโตไคน์ (IL-6, RANK, RANKL) ก็ถูกลดการแสดงออกด้วยเคอร์คิวมิน นำไปสู่การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ การหยุดวงจรเซลล์ที่ระยะ G1/S และเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย

ในเซลล์มะเร็งลำไส้ เคอร์คิวมินออกฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เป็นไปตามความเข้มข้นและเวลา เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยอัตโนมัติ (Wei et al., 2004) และหยุดการเจริญของเซลล์ ทำให้มีเซลล์สะสมอยู่ในระยะ S (Chen et al., 1999) นอกจากนี้ Su และคณะ (2006) รายงานถึงฤทธิ์ด้านการถูกลดของเคอร์คิวมินในเซลล์มะเร็งลำไส้ผ่านทางกลไกระดับของ COX-2 และ MMP-2 และเมื่อใช้เคอร์คิวมินร่วมกับยาต้านมะเร็ง 5-FU พบว่า ช่วยเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Kim et al., 2005) และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ซึ่งลดลงเกือบ 6 เท่า (Du et al., 2006) เมื่อเทียบกับการใช้เคอร์คิวมินหรือยาต้านมะเร็ง 5-FU เพียงอย่างเดียว

ในเซลล์มะเร็งระดับ เคอร์คิวมินยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เป็นไปตามความเข้มข้นและเวลา (ค่า IC_{50} เท่ากับ $49.50 \mu\text{Mol/l}$ เมื่อป้อนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง) และยังหยุดการเจริญของเซลล์ที่ระยะ S และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยอัตรโนมิติ (Li et al., 2002) ในเซลล์มะเร็งระดับที่มีความสามารถในการลุกลามสูง พบว่า $10 \mu\text{M}$ เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ (17.4%) และการลุกลาม (70.6%) ของเซลล์มะเร็ง (Lin et al., 1998)

เมื่อทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากแก่หนูทดลองที่ปราศจากขน (nude mice) และให้ 2% เคอร์คิวมินแก่หนูทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า การเจริญ/การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Dorai et al., 2001) และจากการศึกษาของ Hong และคณะ (2006) พบว่า เคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 และยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากในหลอดทดลองซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบในสิ่งมีชีวิต เคอร์คิวมินลดปริมาณของเนื้องอก ลดการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 และลดการแพร่กระจายของเนื้องอกอย่างมีนัยสำคัญ

Menon และคณะ (1995) ได้ทดลองให้เคอร์คิวมินแก่หนูทดลอง (200 นาโนโมล/น้ำหนักตัว กิโลกรัม) พบว่า สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma cells มาที่ปอด โดยจำนวนกลุ่มก้อนมะเร็งในปอดลดลง (ประมาณ 80%) ส่งผลให้ช่วงชีวิตของหนูทดลองเพิ่มขึ้นถึง 143.85% และจากการศึกษาของคณะวิจัยเดียวกันนี้ในปี 1999 พบว่า $10 \mu\text{g/ml}$ เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการทำงานของ MMP ส่งผลให้การลุกลามของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma cells ลดลง นำไปสู่การลดอุบัติการณ์ที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปที่ปอดด้วย นอกจากนี้ Siwak และคณะ (2005) ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma cell ซึ่งพบว่าเป็นเซลล์ที่มี NF-kB และ IKK ในรูปทำงานตลอดเวลา เมื่อทำการทดสอบเซลล์กับเคอร์คิวมิน พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของ NF-kB และ IKK และออกฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เป็นไปตามความเข้มข้น ($IC_{50} = 6.1-7.7 \mu\text{M}$) และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย

เซลล์มะเร็งระดับอ่อนเป็นเซลล์มะเร็งอีกชนิดหนึ่งที่มี NF-kB และ IKK ในรูปทำงานตลอดเวลา เมื่อทำการทดสอบเซลล์กับเคอร์คิวมิน พบว่า การทำงานของ NF-kB และ IKK ลดลง นอกจากนี้ การแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ NF-kB (COX-2, prostaglandin E_2 และ IL-8) ลดลงด้วย การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้สัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนและการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยเคอร์คิวมิน (Li et al., 2004) นอกจากนี้ Aggarwal และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินในเซลล์มะเร็งหลายชนิด พบว่า เคอร์คิวมินด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่เป็นไปตามเวลาและความเข้มข้น และยังยับยั้งการแสดงออกของ cyclin E ในเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก

มะเร็งศีรษะและลำคอ มะเร็งปอด และมะเร็งเม็ดเลือดชนิด lymphoma, myeloma และ leukemic cell lines เคอร์คิวมินหยุดการเจริญของเซลล์ที่ระยะ G1 (54-76%) และเพิ่มการแสดงออกของ cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21, p27 และ tumor suppressor protein p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมวงจรเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านม จากผลการศึกษาแสดงว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ยับยั้ง cyclin E โดยไม่ขึ้นกับชนิดของเซลล์ การแสดงออกของ cyclin E ที่ลดลงและการแสดงออกของ CDK inhibitor ที่เพิ่มขึ้น นำไปสู่ฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเคอร์คิวมิน

ในเซลล์มะเร็งรังไข่ เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านทางกลไกการแสดงออกของ Bcl-2, Bcl-X(L) และ pro-caspase-3 และเพิ่มการแสดงออกของ p53 and Bax (Shi et al., 2006) สำหรับเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไว/คือต่อยารักษามะเร็ง cisplatin พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ทั้งสองชนิดเกือบเท่ากันผ่านทางกลไกการเหนี่ยวนำให้สร้าง superoxide นอกจากนี้ เคอร์คิวมินหยุดการเจริญของเซลล์ที่ระยะ G2/M ผ่านทางการกระตุ้นฟอสโฟรีเลชัน p53 และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านทางกลไกการกระตุ้น caspase-3 (Weir et al., 2007)

Koo และคณะ (2004) ทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่า เคอร์คิวมินยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่เป็นความเข้มข้นและเวลาอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อใช้เคอร์คิวมินร่วมกับยารักษามะเร็ง 5-FU พบว่า การเจริญของเซลล์ถูกยับยั้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเคอร์คิวมินหรือยารักษามะเร็ง 5-FU เพียงอย่างเดียว แสดงถึงการเสริมฤทธิ์กันของสารทั้งสอง นอกจากนี้ เคอร์คิวมินยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ/การเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งในช่องปาก (Elattar and Virji, 2000) เซลล์มะเร็งปอด (Zhang et al., 2004) และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Sun et al., 2004)

ความเป็นพิษ

การบริโภคขมิ้นชันของคนเอเชีย โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 0.5-1.5 กรัม/วัน/คน ซึ่งไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ (Eigner and Scholz, 1999) เมื่อเลี้ยงหนูวิสตาร์ หนูตะเภา และลิงด้วยขมิ้นชันในขนาดที่สูงกว่าคนบริโภคโดยปกติ (2.5 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลักษณะและน้ำหนักของไต ตับ และหัวใจ นอกจากนี้ ไม่พบความผิดปกติทางพยาธิสภาพและทางพฤติกรรมและไม่มีการเสียชีวิตเกิดขึ้น (Holder et al., 1978)

การศึกษาพิษเฉียบพลันของเหง้าขมิ้นชันในหนูถีบจักรนั้น พบว่า หนูที่ได้รับผงขมิ้นชันทางปากในขนาด 10 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่แสดงอาการพิษใดๆ และเมื่อให้สารสกัดของ

เหง้าขมิ้นชันด้วย 50% แอลกอฮอล์ โดยวิธีป้อนทางปาก ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และทางช่องท้อง ในขนาด 15 กรัม/ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่า ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและหนูถีบจักรไม่ตาย ดังนั้น ขนาดของสารสกัดที่ทำให้หนูตายครั้งหนึ่ง (LD_{50}) เมื่อให้โดยวิธีดังกล่าวจึงมีค่ามากกว่า 15 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Sittisomwong et al., 1990)

การศึกษาพิษเรื้อรังของขมิ้นชันในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมได้รับน้ำ และกลุ่มทดลองได้รับผงขมิ้นชันทางปากในขนาด 0.03, 2.5 และ 5.0 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ซึ่งเทียบกับ 1, 83 และ 166 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนคือ 1.5 กรัม/น้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม/วัน เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่า หนูเพศผู้ที่ได้ขมิ้นชันขนาด 2.5 และ 5.0 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในเพศเมียที่ได้รับขนาดเท่ากัน ขมิ้นชันในขนาดต่างๆ ที่ให้แก่หนูขาวไม่ทำให้เกิดอาการพิษใดๆ รวมทั้งไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาหรือค่าเคมีคลินิก และไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะภายในของหนูขาวทั้งสองเพศ (Sittisomwong et al., 1990)

เมื่อให้เคอร์คิวมินขนาด 300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แก่หนูวิสตาร์ หนูตะเภา และลิงปรากฏว่า ไม่พบความผิดปกติในทางพยาธิสภาพและทางพฤติกรรมและไม่มีการเสียชีวิตเกิดขึ้น (Bhavani Shankar et al., 1980) ไม่พบผลเสียต่อการเจริญเติบโตและระดับเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว องค์ประกอบในเลือดเช่น ฮีโมโกลบิน โปรตีนในซีรัม เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ฯลฯ (Sambaiah et al., 1982) การทดสอบทางคลินิกในคนพบว่า เคอร์คิวมินไม่มีความเป็นพิษเมื่อให้ในขนาด 1-8 กรัม/วัน (Chainani-Wu, 2003) และ 10 กรัม/วัน (Aggarwal et al., 2003)

2.3 ทฤษฎีและหลักการที่ใช้ในการวิจัย

หลักการของเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary evaporator)

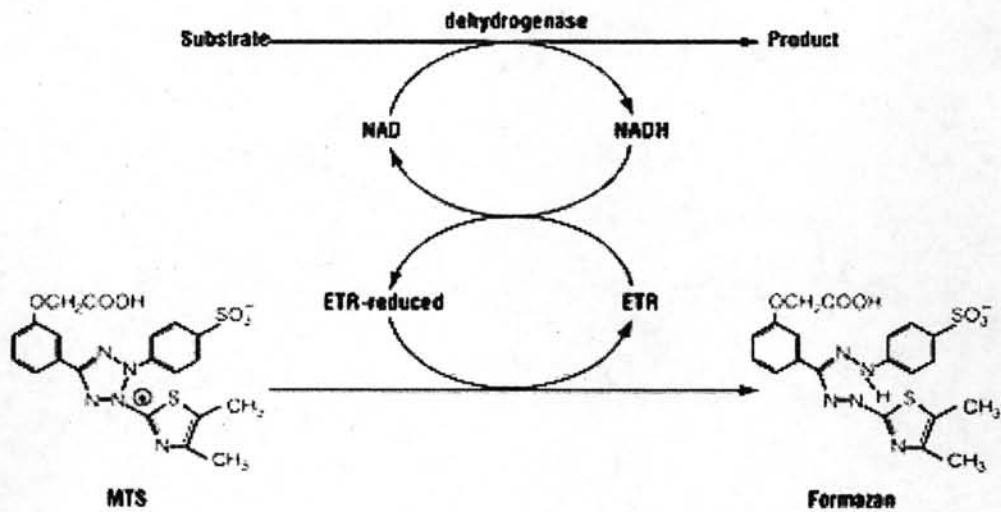
เครื่องระเหยแห้งแบบหมุนเป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางเคมีและทางชีวเคมีสำหรับระเหยสารผสมที่เป็นของเหลวโดยการกลั่นเพื่อแยกสารตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกไป องค์ประกอบหลักของเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนได้แก่ ระบบสุญญากาศซึ่งประกอบด้วยตัวปั๊มสุญญากาศและตัวควบคุม ขวดสำหรับใส่สารผสมที่ต้องการระเหยแห้ง และส่วนคอนเดนเซอร์ (condenser) ซึ่งต่อกับขวดสำหรับรองรับสารตัวทำละลายที่ควบแน่นออกมา ภายในส่วนคอนเดนเซอร์มีหลอดแก้วขวดเป็นเกลียวและมีน้ำเย็นหล่ออยู่ภายใน ระบบการทำงานคือ เมื่อลดความดันลง จะส่งผลให้จุดเดือดของเหลว (ตัวทำละลาย) ลดต่ำลงด้วย ทำให้ตัวทำละลายระเหยออกมาโดยไม่ต้องใช้

ความร้อนมากเกินไป ในการระเหยแห้ง ขวดแก้วที่บรรจุสารผสมจะแช่เพียงบางส่วนของขวดลงไปในอ่างน้ำร้อนและหมูนอยู่ตลอดเวลา การหมูนจะช่วยให้การถ่ายเทความร้อนไปสู่สารผสมได้ดีขึ้น ส่งผลให้ตัวทำละลายระเหยได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ การหมูนยังช่วยลดการฟุ้งของสารผสมที่ได้รับความร้อนมากเกินไป ตัวทำละลายจะระเหยออกจากขวดแก้วเข้าสู่ส่วนคอนเดนเซอร์ ซึ่งจะพบกับขวดหลอดแก้วที่มีน้ำหล่อเย็นอยู่ ทำให้ตัวทำละลายเกิดการควบแน่นและไหลลงสู่ขวดรองรับตัวทำละลาย เครื่องระเหยแห้งแบบหมูนี่จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับระเหยตัวทำละลายปริมาณมากออกจากสารผสม แต่ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ระเหยตัวทำละลายที่เป็นน้ำ เนื่องจากมีจุดเดือดสูงเกินไป

หลักการของ MTS assay

ในการศึกษานี้ ใช้ MTS assay สำหรับศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง โดย MTS assay เป็นเทคนิคสำหรับหาจำนวนเซลล์มีชีวิตในการศึกษา proliferation assay หรือ cytotoxicity assay โดยอาศัยหลักการทำให้เกิดสี (colorimetric method) มี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS หรือ inner salt) เป็นสารตั้งต้นและ phenazine ethosulfate (PES) ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน สารประกอบ MTS tetrazolium หรือ Owen's reagent จะถูกรีดิวซ์กลายเป็นผลผลิต formazan สารมีสีซึ่งสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณผลผลิต formazan ที่เกิดขึ้นนี้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 โนมาเมตร ค่าที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต

การเปลี่ยน MTS tetrazolium ให้กลายเป็นผลผลิต formazan นั้น อาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ทำให้เกิด Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) หรือ Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) NADPH/NADH ที่เกิดขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ตัวขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport rate ; ETR) ซึ่งในที่นี้คือ PES PES ที่ถูกรีดิวซ์จะเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงและรีดิวซ์ MTS tetrazolium อีกทอดหนึ่ง ส่งผลให้ MTS tetrazolium กลายเป็นผลผลิต formazan ในที่สุด (Riss, and Moravec, 1996)



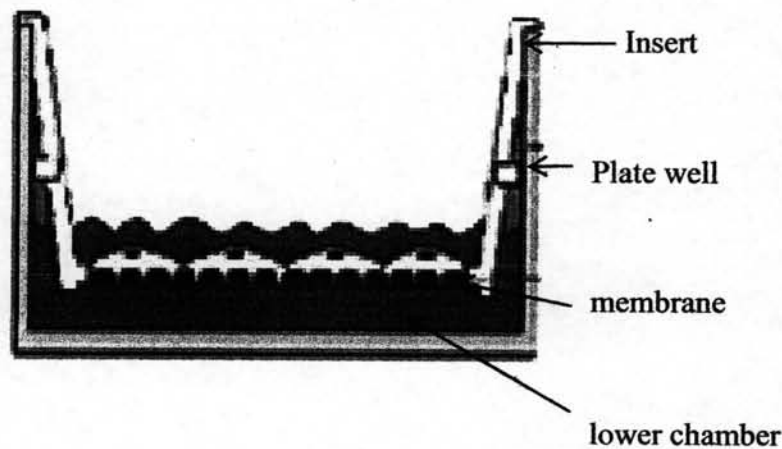
ภาพที่ 6 แสดงกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก MTS ไปเป็น ผลิตภัณฑ์ formazan อาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของ เอนไซม์ dehydrogenase ทำให้เกิด NADPH หรือ NADH ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายอิเล็กตรอนให้แก่ตัวขนส่งอิเล็กตรอน (ETR) ETR ที่ถูกรีดิวส์จะเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงและรีดิวส์ MTS tetrazolium อีกทอดหนึ่ง ส่งผลให้ MTS tetrazolium กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ในที่สุด (Riss, and Moravec, 1996)

หลักการของ Matrigel invasion assay

ในการศึกษานี้ ใช้ Matrigel invasion assay สำหรับศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยใช้ matrigel basement membrane matrix ทำหน้าที่เป็นตัวแทนของ basement membranes ซึ่งเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrices) ในสิ่งมีชีวิต matrigel basement membrane matrix เป็น basement membrane ที่ละลายได้ ซึ่งสกัดได้จาก Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma ซึ่งเป็นเนื้องอกที่อุดมไปด้วยโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ องค์ประกอบหลักของเนื้องอกนี้ได้แก่ laminin, collagen IV, heparin sulfate proteoglycans, entactin และ nidogen นอกจากนี้ ยังประกอบด้วย TGF-beta, fibroblast, growth factor, tissue plasminogen activator และ growth factor อื่นๆ ที่สามารถพบได้ทั่วไปในเนื้องอก EHS (Becton Dickinson Biosciences, product specification sheet lot number: 56966) ที่อุณหภูมิห้อง matrigel จะเกิดการโพลิเมอไรซ์ กลายเป็นเมทริกซ์ทางชีวภาพที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ basement membrane

ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บน matrigel matrix เซลล์จะประพฤติตัวอย่างที่มีชีวิตในสิ่งมีชีวิต matrigel จะจำลองสภาพแวดล้อมทางสรีรศาสตร์สำหรับศึกษารูปร่างของเซลล์ (cell morphology) การทำหน้าที่ทางชีวเคมี การเคลื่อนที่หรือการลุกลาม และการแสดงออกของยีน (Becton Dickson Labware, Cells Behave Better on BD Matrigel™ Matrix)

การทดสอบการลุกลามของเซลล์ในการศึกษาวิจัยนี้ จะเคลือบสารละลาย matrigel ที่พื้นผิวด้านบนของเมมเบรนใน insert เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวแทนของ basement membrane และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในส่วนของ insert นี้ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม และในส่วนล่าง (lower chamber) นี้จะใส่สารที่เป็นตัวดึงดูด (chemoattractant) เช่น อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 10% FBS เพื่อดึงดูดให้เซลล์เคลื่อนที่ลงไปในส่วนล่างนี้ ในสถานะที่ไม่เหมาะสมกับการมีชีวิตของเซลล์ (ในสถานะที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัม) เซลล์จึงจำเป็นต้องเคลื่อนลงสู่ส่วนล่างซึ่งเป็นสถานะที่เหมาะสมในการมีชีวิตรอดมากกว่า แต่ว่ามี matrigel เป็นตัวกีดขวาง (barrier) อยู่ ถ้าเซลล์ต้องการเคลื่อนที่ผ่านลงไป เซลล์ต้องหลั่งเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม MMP เพื่อย่อยสลาย matrigel และเคลื่อนที่ผ่านรูของพื้นผิว insert ลงสู่ส่วนล่าง ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับกระบวนการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปที่ตำแหน่งอื่นในร่างกาย ระบบของ invasion assay แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงระบบของ invasion assay (Becton Dickson Labware, Guidelines for using BD Folcon™ cell culture inserts)