

**ผลของเคอร์คูมินต่อการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์
อินดิวิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส และเอนไซม์ในกลุ่ม
ต่อต้านอนุมูลอิสระ ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ**
**Effect of Curcumin on the Expression of Inducible Nitric
Oxide Synthase and Antioxidant Enzymes Genes in
Hamsters Infected with *Opisthorchis viverrini***

บุศรา แก้วสมุทร (Butsara Kaewsamut)* ดร. สมชาย ปิ่นละอ (Dr. Somchai Pinlaor) **
ดร. ธิดาร์ต บูนมาศ (Dr. Thidarut Boonmars) ** ดร. เตือนใจ ศรีสว่างวงศ์ (Dr. Tuanchai Srisawangwong) ***
ดร. พวงรัตน์ ยงวนิชย์ (Dr. Puangrat Yongvanit)****

บทคัดย่อ

โรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจากการติดพยาธิ *Opisthorchis viverrini* เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ความไม่สมดุลระหว่างกระบวนการออกซิเดทีฟและไนเตรทีฟสเตส และกระบวนการต่อต้านของเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระในระหว่างการอักเสบแบบเรื้อรังทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรค ดังนั้นการใช้สารเคมีป้องกันโรคมายังช่วยกระบวนการอักเสบน่าจะช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ การศึกษาครั้งนี้จึงใช้ curcumin ซึ่งเป็นสารเคมีป้องกันโรค มาศึกษาดูผลต่อการแสดงออกของยีนอินดิวิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) และยีนที่สร้างเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn superoxide dismutase (SOD2), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ในตับหนูที่ติดพยาธิใบไม้ตับโดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการตรวจแบบกึ่งปริมาณ RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะเริ่มสูงขึ้นจากวันที่ 7 และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 30 และมีแนวโน้มที่จะลดลงจนกระทั่งในวันที่ 90 ในหนูที่ติดพยาธิ *O. viverrini* ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับ curcumin พบว่าระดับการแสดงออกของยีน SOD1, CAT และ GPx เพิ่มขึ้น แต่ระดับการแสดงออกของ iNOS และ SOD2 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร curcumin สรุป curcumin อาจยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่ต่อต้านอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งไนเตรทีฟสเตส ดังนั้น curcumin อาจนำมาใช้เป็นสารเคมีบำบัดเพื่อลดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับรวมทั้งป้องกันปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งในท่อน้ำดี

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ABSTRACT

Opisthorchiasis caused by infection with *Opisthorchis viverrini* is the major risk factor of cholangiocarcinoma (CCA). The imbalance of oxidative and nitrative stress and antioxidant enzyme defense mechanism during chronic inflammation leads to the pathophysiological disorder. Thus, using chemopreventive agent to inhibit inflammation might reduce the severity of the disease. In this experiment, curcumin (a chemopreventive agent) was used to study the effect on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and antioxidant enzymes, such as Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in the *O. viverrini*-infected hamsters by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Semiquantitative RT-PCR analysis showed that the profiles expression of iNOS, SOD1, SOD2, CAT and GPx mRNA in the liver of *O. viverrini*-infected hamsters gradually increased starting from day 7, reached the peak on day 30 and tended to decrease until day 90. The profiles of transcriptional expression levels of these genes were positively associated with the accumulation of inflammatory cells around the bile ducts. In curcumin-treated groups, these profile expression levels were similar to those in *O. viverrini*-infected groups but expression levels of these genes were different. Increased expression level of antioxidant enzymes (SOD1, CAT and GPx) but decreased expression level of iNOS and SOD2 was observed in curcumin-treated hamsters compared with non-treated group. Conclusively, curcumin might inhibit the expression of iNOS and induce antioxidant enzymes which, consequently, inhibit nitrative stress. Therefore, curcumin might be used as a chemopreventive agent to reduce the severity of opisthorchiasis as well as to prevent the risk of CCA development..

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ตับ ขมิ้นชัน อินดิวิชเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส แอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์

Key Words : *Opisthorchis viverrini*, Curcumin, Inducible nitric oxide synthase, Antioxidant enzyme

บทนำ

พยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) มีแหล่งระบาดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบระบาดมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราความชุกของโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่พบมากที่สุดในภูมิภาคนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมา มีหลักฐานพอที่จะเชื่อได้ว่า การติด *O. viverrini* เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคมะเร็งท่อน้ำดี (Haswell-Elkins et al., 1994) ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จึงเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของประชากรในภูมิภาคนี้ทั้งด้านโรคพยาธิและโรคมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อมีการติดพยาธิจะมีการหลั่งแอนติเจนออกมา กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยมีเซลล์อักเสบ

(inflammatory cells) ชนิด eosinophils, neutrophils, macrophages, lymphocytes และ plasma cells เป็นต้น ในบริเวณที่มีการอักเสบทั้งในคน (Riganti et al., 1989) และในสัตว์ทดลอง (Bhamarapravati et al., 1978; Pinlaor et al., 2004b; Sripa and Kaewkes, 2000) เซลล์อักเสบเหล่านี้จะสร้างอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) เพิ่มขึ้น ณ บริเวณที่มีการอักเสบและทำให้เกิดภาวะ oxidative และ nitrative DNA damage (Pinlaor et al., 2004a) แต่เมื่อให้ยาฆ่าพยาธิใบไม้ตับแล้วระดับของดีเอ็นเอที่ผิดปกติเหล่านี้จะกลับเป็นปกติ (Pinlaor et al., 2006)

อย่างไรก็ตามร่างกายก็จะมีระบบป้องกันการบาดเจ็บจากอนุมูลอิสระ (antioxidant system) หลายระบบ เช่น สารโมเลกุลขนาดเล็ก เอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ สารอาหารที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น เพื่อใช้ในการป้องกันการทำลายโดยอนุมูลอิสระต่อตัวเอง เอนไซม์ที่ใช้ในการต่อต้านอนุมูลอิสระและป้องกันในภาวะ oxidative และ nitrative stress มีหลายชนิด ที่สำคัญมี 3 ชนิดคือ superoxide dismutase (SOD) พบทั้งในไซโตพลาสซึม เป็นชนิด Cu/Zn SOD (SOD1) และที่พบในไมโทคอนเดรีย เป็นชนิด Mn SOD (SOD2), glutathione peroxidase (GPx) และ catalase (CAT) ทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้จะกระตุ้นอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษหรือมีพิษน้อยลงแล้วขับออกทางไต ระดับของสารต่อต้านอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการติดเชื้อ และสัมพันธ์กับพยาธิสภาพและการดำเนินของโรค เช่น ในโรคมาลาเรีย (Biot et al., 2003) และโรคพยาธิใบไม้เลือด (El-Sokkary et al., 2002) เป็นต้น การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระอาจนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดความรุนแรงของโรคได้

ขมิ้นมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn., *Curcuma domestica* Valet. Zingiberaceae และมีอยู่หลายชนิดในประเทศไทย โดยส่วนมากใช้ในการประกอบอาหารเพื่อให้ได้กลิ่น สารที่ออกฤทธิ์คือ curcumin และอนุพันธ์ เช่น curcumin glucuronide และ curcumin sulfate ซึ่งเป็นสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีฤทธิ์มากมายหลายชนิด เช่น ลดการอักเสบ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในตริกออกไซด์ รวมทั้งป้องกันโรคมะเร็ง เป็นต้น (Duvoix et al., 2005; Garcea et al., 2005) curcumin ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายใน acetone, dimethylsulphoxide (DMSO) และ ethanol สามารถให้โดยการกินหรือทาผิวหนังเพื่อใช้ในการประกอบอาหารและรักษาโรคในหนูเมื่อได้รับทางอาหารความเข้มข้น 1 กรัม/กก. ผสมในอาหาร ร้อยละ 60 มีการดูดซึมในลำไส้

เข้ากระแสเลือด และเมทาบอไลต์ในน้ำดีได้เป็น curcumin glucuronide และ curcumin sulfate แล้วขับออกทางปัสสาวะ (Sharma et al., 2005) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจในการนำสารสกัดจากขมิ้นคือ curcumin เพื่อนำมาทดสอบในการลดพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากโรคพยาธิใบไม้ตับซึ่งอาศัยอยู่ในท่อน้ำดี และการลดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับอาจเป็นวิธีการหนึ่งในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งในท่อน้ำดีต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การออกแบบการทดลอง (Experimental design)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้หนูแฮมสเตอร์ (Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*) เพศผู้ อายุ 6 ถึง 8 สัปดาห์ จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการป้องกันตัวอ่อนระยะติดต่อ metacercariae ของพยาธิใบไม้ตับและให้ curcumin ($\text{HOC}_6\text{H}_7(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{CH}_3$ MW 368.38 Sigma, USA) โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว มีกลุ่มทดลองดังนี้ กลุ่มที่ 1 หนูปกติ + อาหารอัดเม็ดปกติ กลุ่มที่ 2 หนูปกติ + 0.25% curcumin ผสมในอาหารอัดเม็ดปกติ กลุ่มที่ 3 หนูที่ได้รับพยาธิ + อาหารอัดเม็ดปกติ กลุ่มที่ 4 หนูที่ได้รับพยาธิ + 0.25% curcumin ผสมในอาหารอัดเม็ดปกติ แล้วทำการฆ่าหนูทุกกลุ่มในวันที่ 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 ตามลำดับ

2. ขั้นตอนการทดลอง (Protocol of the study)

2.1 ซึ่ปลาขาวมาจากแหล่งระบาดของพยาธิใบไม้ตับ ย่อยปลาด้วยสารละลายเปปซิน แล้วเก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในตับเพื่อนำมาป้องกันสัตว์ทดลอง

2.2 เลี้ยงทดลองในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส ด้วยอาหารอัดเม็ดสำเร็จรูป โดยให้กินปริมาณมากพอและมีน้ำบรรจุอยู่ในกรงเลี้ยงหนู

2.3 ทำการเหนี่ยวนำให้หนูมีการติดพยาธิ โดยการป้อนตัวอ่อนระยะ metacercariae จำนวน 50 ซีตส์ต่อหนู 1 ตัว ป้อนเข้าทางปากของหนู โดยใช้สายยาง

2.4 ฆ่าหนูด้วยสารอีเทอร์ในวันที่ 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 ตามลำดับ แล้วผ่าตัดเปิดหน้าท้อง หนู เจาะเลือดจากตา และเก็บเอาบริเวณหัวของตับซึ่งเป็นบริเวณที่มีพยาธิอาศัยอยู่มาศึกษาโดยแบ่งตับออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกนำไปดองในสารละลาย 10% ฟอรัมาลิน ส่วนที่สองนำไปสกัด Total RNA

2.5 นำตับบริเวณหัวตับ (hilar region) ปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาสกัด Total RNA แล้วนำไปวัดความเข้มข้นโดยตรวจวัดการดูดกลืนแสง และเปลี่ยนเป็น cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT)

2.6 ทำ RT-PCR เพื่อการแสดงออกของ ยีน iNOS และยีนในกลุ่มเอนไซม์ที่ต่อต้านอนุมูลอิสระคือ SOD1, SOD2, CAT และ GPx ของหนู แต่ละกลุ่มทดลองในระยะเวลาต่างกัน เปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อย (house keeping gene) คือ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)

2.7 นำ PCR product มาแยกใน agarose gel อ่านผลภายใต้แสง UV ถ่ายภาพ agarose gel ที่ได้มาวัดความเข้มของแถบผลผลิตจาก PCR โดยใช้โปรแกรม Scion Image (Scion Co., Frederick, MD, USA.)

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ศึกษา

Primer Name	Sequence (5' → 3')	Product length (bp)
SOD1F	CGGATGAAGAGAGGCATGTT	165
SOD1R	CACCTTTGCCCAAGTCATCT	
SOD2F	CCGAGGAGAAGTACCACGAG	174
SOD2R	GCTTGATAGCCTCCAGCAAC	
Gpx1F	GGTTCGAGCCCAACTTTACA	152
GPxR	CGGGGACCAAATGATGTACT	
CATF	TTGACAGAGAGCGGATTCTCT	179
CATR	AGCTGAGCCTGACTCTCCAG	
iNOSF	CAGCTTGGAGTTCACCCAGT	169
iNOSR	CCACTCGTATTTGGGATGCT	
G3PDHF	CCCGTAGACAAATGGTGAAGG	218
G3PDHR	GACACATTGGGGGTAGGAACAC	

3. วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอ่อนระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* ระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ในตับ จะเก็บจากปลาวงศ์ตะเพียนจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดขอนแก่น โดยนำปลาที่ได้ไปปั่นในสารละลายเปปซิน (0.1% pepsin, 0.85% NaCl, 0.1% HCl) เป็นเวลา 3-5 นาที ในอัตราส่วน 4:6 โดยปริมาตร แล้วนำไปย่อยใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองผ่านตะแกรงขนาดต่างๆคือ 1,000, 425, 106 และ 50 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยใช้น้ำเกลือ (0.85 % NaCl) เป็นตัวเจือจาง แล้วนำตะกอนที่ได้ไปหา metacercaria ภายใต้กล้อง dissecting microscope

2. การป้อนตัวอ่อนระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* ให้สัตว์ทดลอง นับ metacercaria เฉพาะที่มีชีวิตจำนวน 50 ซีตส์ ที่เตรียมไว้นำมาป้อนหนูแฮมสเตอร์ โดยดูพยาธิที่นับจำนวนไว้ใน 0.85 % NaCl ปริมาณไม่เกิน 1 มิลลิลิตร ป้อนพยาธิทางปากโดยสอดท่อ polyethylene tube เข้าหลอดอาหารของหนู แล้วจึงปล่อยพยาธิ

เข้าไปในขณะที่แอสเตอร์สลับจากการดด้วยอีเทอร์ หลังจากนั้นประมาณ 1-3 นาที แอสเตอร์ก็จะฟื้นกลับมาเป็นปกติ

3. การสกัด Total RNA จากตับและการทำ RT-PCR โดยใช้ Trizol® reagent (Invitrogen, USA) หนูจะถูกดมสลบด้วย ethyl ether แล้วทำการผ่าแยกตับออก โดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกิน 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่ทำ และตัดเนื้อตับบริเวณข้อพับประมาณ 100 มิลลิกรัม หลังจากนั้นนำตับมาบดให้ละเอียดด้วย glass homogenizer และเติมน้ำยา Trizol® และใส่ 5 units DNase (Promega, USA), 119 units ของ Ribonuclease Inhibitor (Promega, USA) ในบัฟเฟอร์ (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂ and 20 mM dithiothreitol, pH 7.5) และสกัด RNA ด้วย phenol/chloroform ตกตะกอนด้วย ethanol หลังจากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย RNase-free water (100 µl) ส่วน RNA จะถูกนำมาทำการเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ Oligo(dT)15 primers (Promega, USA) และ M-MLV kit (Promega, USA) หลังจากนั้น cDNA จะถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อทำ PCR

4. การตรวจวิเคราะห์ทางชิ้นเนื้อ นำชิ้นเนื้อมาทำ paraffin embedded แล้วตัดเนื้อเยื่อมาย้อมสี hematoxylin and eosin และตรวจการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การศึกษาผลการแสดงออกของยีนในกลุ่มเอนไซม์ที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ SOD1, SOD2, CA และ GPx และการแสดงออกของยีน iNOS พบว่ามีแถบแบนของ PCR products แถบแบนเดียวในแต่ละยีน และขนาดของ PCR products ของแต่ละยีนมีขนาดตรงกับที่ต้องการเมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน พบการแสดงออกของยีนทุกตัวที่ศึกษาในหนูที่ติดพยาธิเป็นเวลา 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน ระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้เมื่อเปรียบเทียบกับยีนควบคุม G3PDH ในหนูกลุ่มที่ 1

(หนูปกติ + อาหารปกติ) และในหนูกลุ่มที่ 2 (หนูปกติ + curcumin) ในวันที่ 30 และวันที่ 90 จะแสดงออกคงที่และระดับของการแสดงออกของยีนที่ศึกษา ในหนูทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน (ไม่ได้แสดงผล) ส่วนในหนูกลุ่มที่ 3 (หนูที่ติดพยาธิ + อาหารปกติ) แบบแผนของระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในหนูกลุ่มที่ติดพยาธิไปไม่ดับจะแตกต่างกันในแต่ละเวลาหลังการติดเชื้อ โดยจะเริ่มแสดงออกสูงขึ้นในวันที่ 7 และสูงสุดในวันที่ 30 หลังจากนั้น มีแนวโน้มลดลงจนถึงในวันที่ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 และแบบแผนของการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจะสัมพันธ์กับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวรอบๆ ท่อน้ำดี

ส่วนการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในหนูกลุ่มที่ 4 (หนูที่ติดพยาธิ + curcumin) แบบแผนจะคล้ายกับในหนูกลุ่มที่ติดพยาธิไปไม่ดับและได้รับอาหารปกติ แต่ระดับการแสดงออกของยีนจะแตกต่างกัน แล้ว แต่ชนิดดังนี้ (ภาพที่ 1, A)

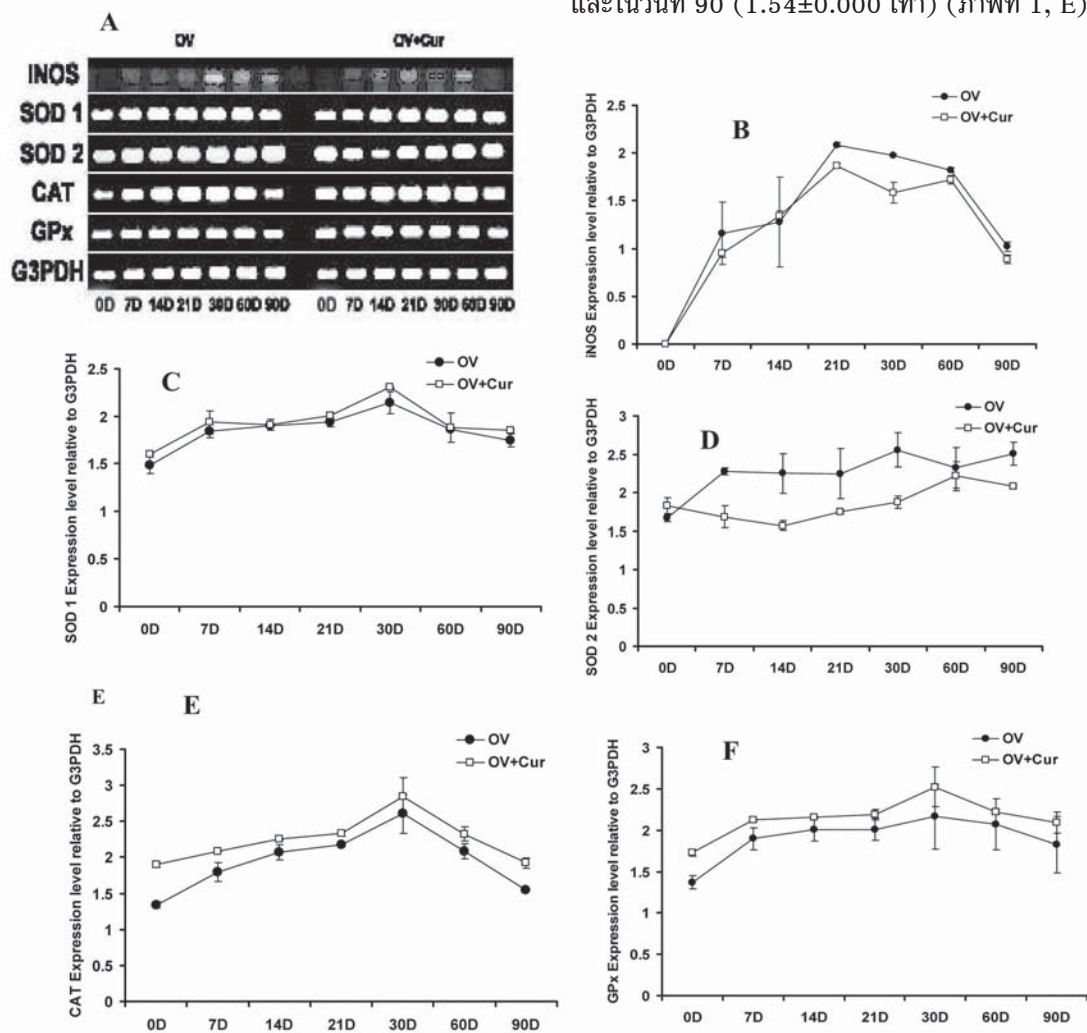
ระดับการแสดงออกของยีน iNOS พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน iNOS มีแนวโน้มลดลงในหนูที่มีการติดพยาธิและได้รับ curcumin เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ติดพยาธิแต่ไม่ได้รับ curcumin ในวันที่ 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 ระดับการแสดงออกในวันที่ 30 (1.58 ± 0.10 เท่า) ต่ำกว่าอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ติดพยาธิไปไม่ดับ แต่ไม่ได้รับ curcumin (1.97 ± 0.009 เท่า) (ภาพที่ 1, B)

ระดับการแสดงออกของยีน Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) ในไฮโดรพลาสมิ พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน SOD1 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในหนูกลุ่มที่มีการติดเชื้อพยาธิ ที่ได้รับ curcumin ที่เวลา 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน โดยมีการแสดงออกสูงขึ้นเป็นลำดับและสูงที่สุดในวันที่ 30 (2.30 ± 0.004 เท่า) หลังจากนั้น มีแนวโน้มลดลงจนถึงในวันที่ 90 (1.84 ± 0.015 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิไปไม่ดับแต่ไม่ได้รับ curcumin ในวันที่ 30 (2.13 ± 0.116 เท่า) และในวันที่

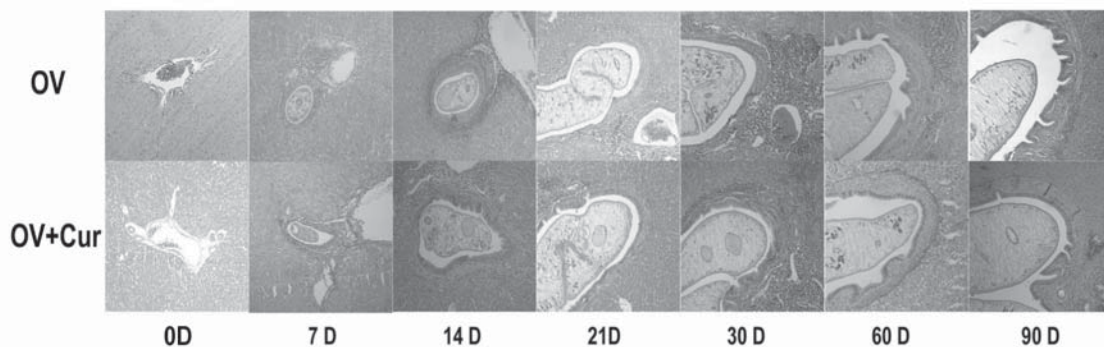
90 (1.74 ± 0.071) (ภาพที่ 1, C)

ระดับการแสดงออกของยีน Mn superoxide dismutase (SOD2) ในไมโทคอนเดรีย พบว่าระดับการแสดงออกของยีน SOD2 มีแนวโน้มลดลงในหนูกลุ่มที่มีการติดเชื้อพยาธิและได้รับ curcumin ที่เวลา 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน โดยจะลดต่ำลงอย่างชัดเจนในวันที่ 30 (1.87 ± 0.083 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิไปไม้ดัดแต่ไม่ได้รับ curcumin (2.55 ± 1.872 เท่า) (ภาพที่ 1, D)

ระดับการแสดงออกของยีน catalase (CAT) พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน CAT มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในหนูกลุ่มที่มีการติดเชื้อพยาธิและได้รับ curcumin ที่เวลา 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน โดยมีการแสดงออกสูงชันเป็นลำดับและสูงที่สุดที่เวลา 30 วัน (2.84 ± 0.26 เท่า) หลังจากนั้นจะลดต่ำลงจนถึงในวันที่ 90 (1.92 ± 0.007 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิไปไม้ดัดแต่ไม่ได้รับ curcumin ในวันที่ 30 (2.60 ± 0.265 เท่า) และในวันที่ 90 (1.54 ± 0.000 เท่า) (ภาพที่ 1, E)



ภาพที่ 1 แสดงระดับการแสดงออกของยีน iNOS, SOD1, SOD2, CAT และ GPx ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิไปไม้ดัด (●) ในวันที่ 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 เปรียบเทียบกับหนูที่ติดเชื้อพยาธิที่ได้รับ curcumin (□) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของหนู 3 ตัว



ภาพที่ 2 แสดงผลของ curcumin ต่อพยาธิสภาพของเนื้อ ตับในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ OV = *O. viverrini*, Cur = curcumin, D = day

ระดับการแสดงออกของยีน glutathione peroxidase (GPx) พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน GPx มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิ ที่ได้รับ curcumin ที่เวลา 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน โดยมีการแสดงออกสูงขึ้นเป็นลำดับ และสูงที่สุดในวันที่ 30 (2.52 ± 0.237 เท่า) และค่อยๆ ลดต่ำลงในวันที่ 90 (2.09 ± 0.132 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแต่ไม่ได้รับ curcumin ในวันที่ 30 (2.16 ± 0.387 เท่า) และในวันที่ 90 (1.82 ± 0.338) (ภาพที่ 1, F)

การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับพบว่า หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับมีเซลล์อักเสบ จำพวก eosinophils, neutrophils และ mononuclear cells รอบๆ ผนังท่อทางเดินน้ำดีที่มีพยาธิอาศัยอยู่ โดยจำนวนเซลล์อักเสบจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลาของการติดเชื้อโดยจะเริ่มสูงอย่างเด่นชัดในวันที่ 21 และสูงที่สุดที่ 30 วัน และค่อยๆ ลดต่ำลงที่ 60 วัน และ 90 วัน ตามลำดับ ส่วนในหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและได้รับ curcumin พบว่ามีจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆ ท่อทางเดินน้ำดีลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 2)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับมีการแสดงออกของยีนที่สร้างอนุมูลอิสระอินดิคัลไนตริกออกไซด์ซินเทส

เพิ่มขึ้น ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้มากขึ้นก็จะมีผลทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระชนิดไนตริกออกไซด์ออกมาปริมาณมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่สร้างเอนไซม์ต่อต้านกับอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงว่าการติดเชื้อพยาธิไม่เพียงแต่จะทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระชนิดไนตริกออกไซด์ แต่ยังพบว่าการสร้างอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจนเพิ่มขึ้น โดยระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการติดพยาธิ เมื่อมีการสร้างอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจนและไนโตรเจนเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative และ nitrative stress หลังจากที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พยาธิจะมีการปล่อยแอนติเจนมากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้มีการตอบสนองของเซลล์และกระตุ้นการทำงานของ inflammatory cytokines ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ โดยเซลล์อักเสบจะทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ เช่น NADPH oxidase, iNOS, myeloperoxidase และ eosinophil peroxidase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่ในการสร้างอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เพิ่มขึ้นทั้งชนิด ROS และ RNS ซึ่งอนุมูลอิสระทั้งสองกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิด DNA damage ตามมา (Ohshima and Bartsch, 1994; Pinlaor et al., 2004a) ดังนั้นจึงอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างหนึ่งในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีตามมาได้

จากการศึกษาทางพยาธิสภาพในครั้งนี้พบว่าเมื่อให้ curcumin ในหนูที่มีการติดพยาธิ เชลล์อีกเสบมีแนวโน้มลดลง การลดลงของเชลล์อีกเสบนี้อาจส่งผลต่อการหลั่งสารไซโตไคน์โดยการกระตุ้นให้มีการสร้าง iNOS ในเชลล์ macrophages ลดลง นอกจากนี้ curcumin ยังสามารถยับยั้งการ translocation ของ nuclear transcription factor NF- κ B จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส NF- κ B จะควบคุมการแสดงออกของ iNOS และ SOD2 ในระดับการถอดรหัสของยีน (transcription) ภายในนิวเคลียส ดังนั้นเมื่อ NF- κ B ถูกยับยั้งจึงส่งผลให้การแสดงออกของ iNOS และ SOD2 ยับยั้งด้วย (Surh et al., 2001) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การแสดงออกของ iNOS และ SOD2 มีแนวโน้มลดลง

เมื่อมีการสร้างอนุมูลอิสระออกมาจำนวนมาก ร่างกายจะมีระบบป้องกันการบาดเจ็บจากอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้น การแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นกลไกหนึ่งของโฮสต์เพื่อที่จะลดหรือกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Henkle-Duhrsen and Kampkotter, 2001) และเมื่อให้สาร curcumin ยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน SOD, CAT และ GPx ให้เพิ่มสูงขึ้นเพื่อทำหน้าที่ต่อต้านกับอนุมูลอิสระเหล่านี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gomez และคณะ ที่แสดงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม SOD1 , CAT และ GPx ที่สูงขึ้นในสมองของหนูในส่วน hippocampus (Gomez et al., 2005) การศึกษาทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการทดลองโดยให้ 10 μ M curcumin สามารถลดการสร้าง ROS ในเชลล์ macrophage ในหนู rat (Joe and Lokesh, 1994) รวมทั้งยับยั้งการสร้าง H_2O_2 (Sen et al., 2005) ต่อต้านอนุมูลอิสระชนิด $O_2^{\cdot-}$ (Mishra et al., 2004) และ $\cdot OH$ (Tonnesen et al., 2002) และยับยั้งอนุมูลอิสระ NO (Chan et al., 2005) จึง

ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของสารต่อต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิแต่ไม่ได้รับ curcumin นอกจากนี้ curcumin และอนุพันธ์ยังสามารถลดการอักเสบได้ (Mazumder et al., 1995) และมีฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบ โดย curcumin สามารถป้องกันการอักเสบเนื่องจากสารพิษ และมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง (Hanif et al., 1997) รวมทั้งมีการนำ curcumin มาใช้เพื่อลดพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อปรสิต ดังที่รายงานในหนูกลุ่มที่ได้รับ curcumin ผสมในอาหาร สามารถลดพยาธิสภาพของโรค เช่น การทดลองในหนูที่ติดเชื้อมาลาเรีย (Reddy et al., 2005) ในหนูที่ติดเชื้อ *Leishmania* (Arendse et al., 2005) และในหนูที่ติดเชื้อ *coccidia* (Allen et al., 1998) เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า curcumin มีแนวโน้มยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ SOD2 และเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ในกลุ่มต่อต้านอนุมูลอิสระ เพื่อลดภาวะการเกิดในเตรตีฟ สเตรส ดังนั้น curcumin น่าจะสามารถลดพยาธิสภาพของการเกิดโรคพยาธิใบไม้ในตับ และน่าจะนำมาพัฒนาใช้ในผู้ป่วยในอนาคตต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างน้อย (หนูสามตัวในแต่ละกลุ่ม) ดังนั้น เพื่อให้เห็นผลชัดเจนและแตกต่างทางสถิติ ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ศึกษา
2. การตรวจระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี semi-quantitative RT-PCR อาจบอกได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นการตรวจโดยวิธี quantitative RT-PCR (real-time RT-PCR technique) ควรศึกษาเพิ่มเติม
3. การบอกความรุนแรงของพยาธิสภาพของตับโดยตรวจเฉพาะฮีสโตพยาธิอาจไม่สามารถบอกได้ชัดเจน การตรวจทางชีวเคมีอย่างอื่น ๆ เช่น

เอนไซม์ตับ alanine aminotransferase (ALT) และระดับการทำลายไขมันโดยอนุมูลอิสระ คือ malondialdehyde (MDA) ระดับการสร้างไนโตรเจน/ไนไตร ควรศึกษาเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์ ประจำปี 2550 และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งในท่อน้ำดี ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Allen, P.C., Danforth, H.D., Augustine, P.C., 1998. Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol* 28: 1131–1140.
- Arendse, B., Van Snick, J., Brombacher, F., 2005. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania* major infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. *J Immunol* 174: 2205–2211.
- Bhamarapravati, N., Thamavavit, W., Vajrasthira, S., 1978. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am J Trop Med Hyg* 27: 787–794.
- Biot C, Dessolin J, Grellier P, Davioud-Charvet E. 2003. Double-drug development against antioxidant enzymes from *Plasmodium falciparum*. *Redox Rep* 8: 280–3.
- Chan, M.M., Adapala, N.S., Fong, D., 2005. Curcumin overcomes the inhibitory effect of nitric oxide on *Leishmania*. *Parasitol Res* 96: 49–56.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schneckeburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., Diederich, M., 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 223: 181–190.
- El-Sokkary GH, Omar HM, Hassanein AF, Cuzzocrea S, Reiter RJ. 2002. Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Free Radic Biol Med* 32: 319–32.
- Garcea, G., Berry, D.P., Jones, D.J., Singh, R., Dennison, A.R., Farmer, P.B., 2005. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 120–125.
- Gomez, M., Esparza, J.L., Nogues, M.R., Giral, M., Cabre, M., Domingo, J.L., 2005. Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med* 38: 104–111.
- Hanif, R., Qiao, L., Shiff, S.J., Rigas, B., 1997. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* 130: 576–584.

- Haswell-Elkins, M.R., Satarug, S., Tsuda, M., Mairiang, E., Esumi, H., Sithithaworn, 1994. Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mutat Res* 305: 241-252.
- Henkle-Duhrsen, K., Kampkotter, A., 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 114: 129-142.
- Joe, B., Lokesh, B.R., 1994. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1224: 255-263.
- Mazumder, A., Gazit, A., Levitzki, A., Nicklaus, M., Yung, J., Kohlhagen, G., 1995. Effects of tyrphostins, protein kinase inhibitors, on human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry* 34: 15111-15122.
- Mishra, B., Priyadarsini, K.I., Bhide, M.K., Kadam, R.M., Mohan, H., 2004. Reactions of superoxide radicals with curcumin: probable mechanisms by optical spectroscopy and EPR. *Free Radic Res* 38: 355-362.
- Ohshima, H., Bartsch, H., 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305: 253-264.
- Pinlaor, S., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Tada-Oikawa, S., Ma, N., Pinlaor, P., Sithithaworn, P., 2006. iNOS-dependent DNA damage via NF-kappaB expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *Int J Cancer* 119: 1067-1072.
- Pinlaor, S., Ma, N., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Semba, R., Oikawa, S., 2004a. Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis* 25: 1535-1542.
- Pinlaor, S., Sripa, B., Sithithaworn, P., Yongvanit, P., 2004b. Hepatobiliary changes, antibody response, and alteration of liver enzymes in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini*. *Exp Parasitol* 108: 32-39.
- Reddy, R.C., Vatsala, P.G., Keshamouni, V.G., Padmanaban, G., Rangarajan, P.N., 2005. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 472-474.
- Riganti, M., Pungpak, S., Punpoowong, B., Bunnag, D., Harinasuta, T., 1989. Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 20: 95-100.
- Sen, G., Mandal, S., Saha Roy, S., Mukhopadhyay, S., Biswas, T., 2005. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. *Free Radic Biol Med* 38:1257-1264.

- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 41: 1955–1968.
- Sripa, B., Kaewkes, S., 2000. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *Int J Parasitol* 30: 735–740.
- Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 480–481: 243–268.
- Tonnesen, H.H., Masson, M., Loftsson, T., 2002. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 244: 127–135.