

ผลของไขมันชั้นต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง และเอนไซม์แสดงการทำงานของตับ ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อ พยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี

Effect of Turmeric on Tumor Relevant Gene Expression and Liver Enzyme In Hamster Opisthorchiasis – Associated Cholangiocarcinoma

ศรินทิพย์ บุญจรัสสิริบุญ (Sirintip Boonjaraspinyo)* ดร.ธิดารัตน์ บุญมาศ (Dr.Thidarut Boonmars)**

ดร.เตือนใจ ศรีสว่างวงศ์ (Dr.Tuanchai Srisawangwong)***

ดร.ฉันทนา อารมย์ดี (Dr.Chantana Aromdee)**** อนุชา พัวไพโรจน์ (Anucha Puapairoj)*****

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรไทยมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะขมิ้นซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของขมิ้นต่อพยาธิสภาพของตับหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้หนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini* : OV) และเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) ด้วยสารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine (NDMA) โดยศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มกระตุ้นการตายของเซลล์ (BAX, p53) ยับยั้งการตายของเซลล์ (Akt/PKB, c-ski) และ telomerase ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับอาหารขมิ้นเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารขมิ้น โดยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และตรวจเอนไซม์แสดงการทำงานของตับ Alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP) และ direct bilirubin พบว่าขมิ้นไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติในหนูสภาวะปกติ มีผลต่อการลดปริมาณเซลล์อักเสบ การสร้างท่อน้ำดีใหม่ (new bile duct formations) มากขึ้น และยังพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งสูงมาก เพิ่มระดับ ALT และ ALP ลดระดับ direct bilirubin จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า ขมิ้นชั้นมีคุณสมบัติในการลดการอักเสบ ทำลายเซลล์ตับและเซลล์ท่อน้ำดี ช่วยบิบบัสน้ำดี และการเพิ่มจำนวนของท่อน้ำดีอีกด้วย

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is crucial public health problem in Northeastern part of Thailand. At present, Thai medicinal plants are used for prevention and treatment several diseases. The active ingredient in turmeric, the traditional medicine, is curcumin which has many properties including anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-cancer. This study investigated the effect of turmeric on the tumor relevant gene expression; apoptosis gene (BAX, p53), anti-apoptosis gene (Akt/PKB, c-ski) and telomerase and liver enzyme; Alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP) and direct bilirubin in hamster opisthorchiasis - associated cholangiocarcinoma (CCA) by using Reverse transcriptase polymerase chain reaction technique (RT-PCR). Hamsters were treated with *Opisthorchis viverrini* (OV) plus N-Nitrosodimethylamine (NDMA) to induce CCA development; and the other with OV plus NDMA and administered dietary turmeric (TUR). The result show that turmeric had no toxic in normal condition and anti-inflammatory property by significantly decreased the inflammatory cells. The unsatisfactory effect of turmeric in the OV plus NDMA group administered TUR increased in new bile duct formation, enhanced the expression of tumor relevant genes, ALT and ALP and reduced direct bilirubin. The present study demonstrated turmeric has anti-inflammation property, increases bile duct and gall bladder contraction and increase new bile duct formation.

คำสำคัญ : ขมิ้นชัน แสมสเตอร์ โรคพยาธิใบไม้ตับ มะเร็งท่อน้ำดี

Key Words : Turmeric, Hamster, Opisthorchiasis, Cholangiocarcinoma

บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดีมีอุบัติการณ์เกิดสูงที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Vatanasapt *et al.*, 1995) และเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอย่างยิ่งในภูมิภาคนี้ ซึ่งพบว่าการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) สูงเช่นเดียวกัน (Parkin *et al.*, 2002; Sriamporn *et al.*, 2004) จากการศึกษาของ Hoizinger *et al.*, 1999 พบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรค มะเร็งท่อน้ำดี การพัฒนาสู่การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีนั้นมีหลายปัจจัยทั้งจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับการได้รับสารก่อมะเร็ง (Nitrosamine) ซึ่งนำไปสู่กระบวนการผ่าเหล่าของยีนและเกิดมะเร็งตามมา ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีนั้น ยังคงเป็นปัญหาสำคัญ ซึ่งวิธีการรักษาในปัจจุบันได้แก่ การรักษาโดยการผ่าตัด

เอามะเร็งออก ถ้าไม่ผ่าตัดออกผู้ป่วยส่วนมากจะเสียชีวิตภายใน 5 ปี มีอัตราผู้รอดชีวิตเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น (Farley *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีการรักษาโดยเคมีบำบัด หรือการฉายแสง (NCCN, 2008) ส่วนยารักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีนั้น ยังไม่มีประสิทธิภาพที่จะรักษาโรคนี้ได้ ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรที่มีอยู่หลากหลายชนิด มาทดลองใช้เพื่อการป้องกันและการรักษาโรคมะเร็งต่างๆ ซึ่งขมิ้นชันก็เป็นสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่ได้มีการศึกษาคุณสมบัติอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพบว่ามีสาร Curcumin ที่อยู่ในขมิ้นชันมีคุณสมบัติช่วยในการสมานแผล (wound healing) ลดการอักเสบ (anti-inflammation) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการเกิดมะเร็ง (anti-cancer effects) (Maheshwari *et al.*, 2006) ต้านเชื้อรา ไวรัส และโปรโตซัว (Negi *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2007). จากการ

ศึกษาของ Johnson และ Mukhtar ในปี 2007 พบว่า สาร Curcumin สามารถใช้ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ ได้ยับยั้งการเกิดมะเร็งตับจากสาร Diethylnitrosamine ในหนู mouse (Chuang *et al.*, 2000) นอกจากนี้ ยังพบว่า curcumin ช่วยลดพยาธิสภาพจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Kaewsamut *et al.*, 2007) ซึ่งการใช้สาร Curcumin นั้น มีราคาค่อนข้างสูงและไม่แพร่หลายนัก ในการรักษาและป้องกันมะเร็งของประชาชนส่วนมากจะอยู่ในรูปแบบของขมิ้นสด และนำไปทำเป็นขมิ้นผง (Turmeric powder) เพื่อเก็บไว้ใช้มากกว่าที่จะอยู่ในรูปสาร Curcumin

อย่างไรก็ตามข้อมูลการรายงานการศึกษาผลของการใช้ขมิ้นผง (Turmeric powder) ในการรักษาโรคมะเร็งต่างๆ ในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ยังมีข้อจำกัด รวมทั้งโรคมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเป็นมะเร็งที่มีความสำคัญมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของขมิ้นต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งและศึกษาเอนไซม์แสดงการทำงานของตับหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้หนูแฮมสเตอร์เป็นโมเดลในการศึกษาโดยศึกษาในระดับโมเลกุลที่เชื่อมโยงเกี่ยวกับ DNA damage ที่อาจจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งได้ โดยเน้นการศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มกระตุ้นการตายของเซลล์ (BAX, p53) ยับยั้งการตายของเซลล์ (Akt/PKB, c-ski) และ telomerase ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับอาหารขมิ้นเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารขมิ้น

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ศึกษาถึงผลของการรักษาด้วยขมิ้น ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและ/หรือสารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine (NDMA) แล้วให้ขมิ้นเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นจะเก็บตัวอย่างเลือดของหนู

(serum) นำไปตรวจเอนไซม์ที่แสดงการทำงานของตับ Alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP) และ direct bilirubin และเก็บตัวอย่างตับศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มกระตุ้นการตายของเซลล์ (BAX, p53) ยับยั้งการตายของเซลล์ (Akt/PKB, c-ski) และ telomerase และย้อมสี Hematoxylin and Eosin จากนั้นนำมาตรวจดูพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ

หนูแฮมสเตอร์ (Syrian golden hamster) เพศผู้ อายุ ประมาณ 6-8 สัปดาห์ ทั้งหมด 45 ตัว การทดลองจะมี 9 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้ 1. หนูปกติที่ให้อาหารและน้ำดื่มปกติ (N) 2. หนูปกติที่ให้อาหารขมิ้น (N+TUR) 3. หนูปกติที่ให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine (N+NDMA) 4. หนูปกติที่ให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine และให้อาหารขมิ้น (N+NDMA+TUR) 5. หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (OV) 6. หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้อาหารขมิ้น (OV+TUR) 7. หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine (OV+NDMA) 8. หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine และอาหารขมิ้น (OV+NDMA+TUR) 9. หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine และอาหารขมิ้นเป็นการรักษาภายหลัง 1 เดือน (OV+NDMA+TUR(Treat))

3. การเตรียมตัวอ่อนระยะติดต่อก (เมตาเซอรคาร์เรีย) ของพยาธิใบไม้ในตับ เก็บตัวอย่างปลาวงศ์ตะเพียนจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดขอนแก่น นำปลามาแยกเอาตัวอ่อนระยะติดต่อก (เมตาเซอรคาร์เรีย) ของพยาธิใบไม้ตับโดยนำปลาไปปั่นรวมกับสารละลาย pepsin จนละเอียด นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ จนกว่าเนื้อปลาถูกย่อย แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดรูต่างๆ เพื่อแยกกากที่มีขนาดใหญ่ ออก และนำส่วนที่ผ่านตะแกรงได้ไปตกตะกอนด้วย

น้ำเกลือใน sedimentation jar จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปหาเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x

4. การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับในหนูแฮมสเตอร์และการเลี้ยงหนูแฮมสเตอร์ ทำให้หนูสลบด้วยไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) จากนั้นนำตัวอ่อนระยะติดต่อ (เมตาเซอร์คาเรีย) ของพยาธิใบไม้ตับที่แยกได้มาป้อนให้หนูแฮมสเตอร์ จำนวน 50 เมตาเซอร์คาเรียต่อตัว โดยสอดสายยางลงถึงกระเพาะอาหารแล้วนำหนูแฮมสเตอร์ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงหนูที่มีสภาพแวดล้อมที่ดี ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามที่กำหนดเดิมที่เป็นเวลา 2 เดือน

5. การเตรียมอาหารผสมไขมัน นำไขมันสดที่ซื้อจากฟาร์มที่จังหวัดเลย มาผ่านเป็นแผ่นบางๆ และตากให้แห้งกลางแดด 1 วัน แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ได้เป็นไขมันผง (ไขมันสด 10 กิโลกรัม ได้ไขมันผงประมาณ 700 กรัม) นำอาหารหนูนำอาหารสำหรับหนูทดลองของบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ 7 กิโลกรัม มาบดให้ละเอียดแล้วปั่นผสมกับไขมันผง 583.39 กรัม ซึ่งสกัดสาร Curcumin ด้วย ethyl alcohol แล้วผสมกับน้ำเชื่อม จากนั้นนำมาผ่านเครื่องอัดเม็ดและตากอาหารผสมไขมันให้แห้ง ทำการเตรียมอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ โดยจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา รายงานว่าในไขมันชั้นจะมีปริมาณสารประกอบ Curcumin 3 % และในการรักษามะเร็งใช้ Curcumin 0.25 % เป็นส่วนประกอบในอาหารทั้งหมด (19.8 มิลลิกรัม/วัน)

6. การเก็บตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อตับของหนูแฮมสเตอร์ทำให้หนูแฮมสเตอร์สลบด้วยไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) แล้วผ่าเปิดหน้าท้องเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจของหนูประมาณ 3 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างตับ lobe ที่มีถุงน้ำดีอย่างรวดเร็ว นำไปรักษาสภาพ (fixation) ด้วย 10% Formalin เพื่อนำไปตัด section แล้วย้อมสี Hematoxylin and Eosin จากนั้นนำมาตรวจดูพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายใต้

กล้องจุลทรรศน์

7. การตรวจเอนไซม์แสดงการทำงานของตับตัวอย่างเลือดนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ดูดแยกสารละลายส่วนใส (serum) แล้วนำส่งตรวจค่าเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP) และ direct bilirubin ซึ่งแสดงการทำงานของตับ ด้วยเครื่องตรวจทางเคมีของเลือด ห้องปฏิบัติการ (เคมีคลินิก) ห้องปฏิบัติการชุมชน คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

8. การสกัด RNA จากตับ และการทำ RT-PCR เพื่อตรวจหา tumor relevant gene โดยตัดเนื้อตับบริเวณใกล้กับท่อน้ำดีประมาณ 300 มก. เก็บรักษาใน Trizol(r) Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) หลังจากนั้นตับจะถูกบดด้วย glass homogenizer จนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันและปั่นแยกโปรตีนและตกตะกอนด้วย chloroform และ isopropanol ตามลำดับ แล้วหลังจากนั้นละลายตะกอนด้วย RNase-free water (210 ไมโครลิตร) เติม RNase inhibition 2.5 ไมโครลิตร DNase 12.5 ไมโครลิตร และ 10x DNase buffer 25 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร incubate ที่ 37 °C 60 นาที เติม Phenol และ Chloroform แล้วตกตะกอนด้วย Sodium acetate และ Ethanol แล้วละลายตะกอนด้วย RNase-free water จากนั้นทำ Reverse transcribed เป็น cDNA โดยใช้ M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) และ Oligo(dT) 15 primers หลังจากนั้น cDNA จะถูกนำมาใช้เป็น template เพื่อทำ PCR

9. การทำ PCR ใช้ cDNA template จำนวน 1.5 µl, 10 x HotStart Taq buffer 1.5 µl, 5 mM deoxynucleotide triphosphate 1.5 µl, 25 mM MgCl₂ 1.5 µl, 5 pM primer pairs 1.5 µl, 0.06 µl of HotStart Taq DNA polymerase และ 6 µl ของ distilled water ซึ่งจะได้ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ

15 μ l สำหรับ PCR conditions คือ 35 cycles ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที PCR products ที่ได้ จะนำมา ทำ gel electrophoresis with 2 % agarose gel และย้อมด้วย 0.01 mg/ml Ethidium bromide แล้วนำมาถ่ายรูปภายใต้ UV light

ตารางที่ 1 ยีนที่ใช้ในการศึกษาผลของไขมันชั้นต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี

Primer name	Sequence	Product length (bp)	GenBank Accession Number/Reference
Telomerase F	5'-AAACAACAAGCCAGTCCAC-3'	259	AF149012
Telomerase R	5'-GCATGGTTCACAAGCAACTG-3'		
Akt (PKB) F	5'-GGTGATCCTGGTGAAGGAGA-3'	201	Boonmars et al., (2007)
Akt (PKB) R	5'-GCGTACTCCATGACAAAGCA-3'		
c-Ski F	5'-CTGCGAGTGAGAAAGAGACG-3'	203	Wu et al., (2006)
c-Ski R	5'-TTTTCTGGCTGGATACAAG-3'		
BAX F	5'-AGTGCGAGAGGATGATTGCT-3'	215	Boonmars et al., (2007)
BAX R	5'-CTCTCGGAGGAAGTCCAGTG-3'		
p53 F	5'-AAGGCGATAGTTTGGCTCCT-3'	232	Boonmars et al., (2007)
p53 R	5'-CTGGGTCTTCCAGTGTGAT-3'		
MG3PDH F	5'-GGCATTGTGGAAGGGCTCAT-3'	228	Boonmars et al., (2005)
MG3PDH R	5'-GACACATTGGGGGTAGGAACAC-3'		

10. การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม Scion Image เพื่อวัดระดับความเข้ม (density) ของแถบ PCR product ที่ได้และนำไป plot กราฟเพื่อดูความแตกต่างของการแสดงออกของยีนแต่ละชนิด ในหนูแต่ละกลุ่ม และใช้โปรแกรม One-way ANOVA, with Duncan tests (SPSS v.13.0, USA; and EXCEL Microsoft, USA) ในการคำนวณเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระดับเอนไซม์ ALT, ALP, direct bilirubin

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (apoptosis) พบว่ามี

การแสดงออกของยีนทุกตัวที่ศึกษา แต่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันไป

แบบแผนการแสดงออกของยีน Telomerase มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม of N+TUR (0.42 ± 0.08), OV (0.44 ± 0.07) และ OV+TUR (0.49 ± 0.09) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มหนูปกติและมีการแสดงออกของยีน Telomerase สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่ม N+NDMA+TUR group (0.54 ± 0.12) และมีการแสดงออกของยีนสูงมากขึ้นในหนูกลุ่ม N+NDMA (0.58 ± 0.12), OV+NDMA+TUR (0.59 ± 0.09), OV+NDMA (0.59 ± 0.14) และ OV+NDMA+TUR (Treat) (0.63 ± 0.12) ตามลำดับ (ภาพที่ 1B)

แบบแผนการแสดงออกของยีน Akt (PKB) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม N+TUR (0.70 ± 0.13), OV (0.77 ± 0.14), OV+TUR (0.80 ± 0.13) และ N+NDMA (0.83 ± 0.14) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มหนูปกติ และมีการแสดงออกของยีน Akt สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่ม N+NDMA+TUR (0.86 ± 0.09), OV+NDMA (0.94 ± 0.19), OV+NDMA +TUR (0.96 ± 0.19) และ OV+NDMA+TUR (Treat) (0.97 ± 0.16) ตามลำดับ (ภาพที่ 1C)

แบบแผนการแสดงออกของยีน c-ski มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม N+TUR (0.75 ± 0.23), OV+TUR (0.79 ± 0.23), OV (0.81 ± 0.23) และ N+NDMA (0.83 ± 0.24) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มหนูปกติ และมีการแสดงออกของยีน c-ski สูงขึ้นในกลุ่ม OV+NDMA+TUR (0.87 ± 0.20), OV+NDMA (0.90 ± 0.18), N+NDMA+TUR (0.91 ± 0.18) และ OV+NDMA+TUR (Treat) (0.91 ± 0.19) ตามลำดับ (ภาพที่ 1D)

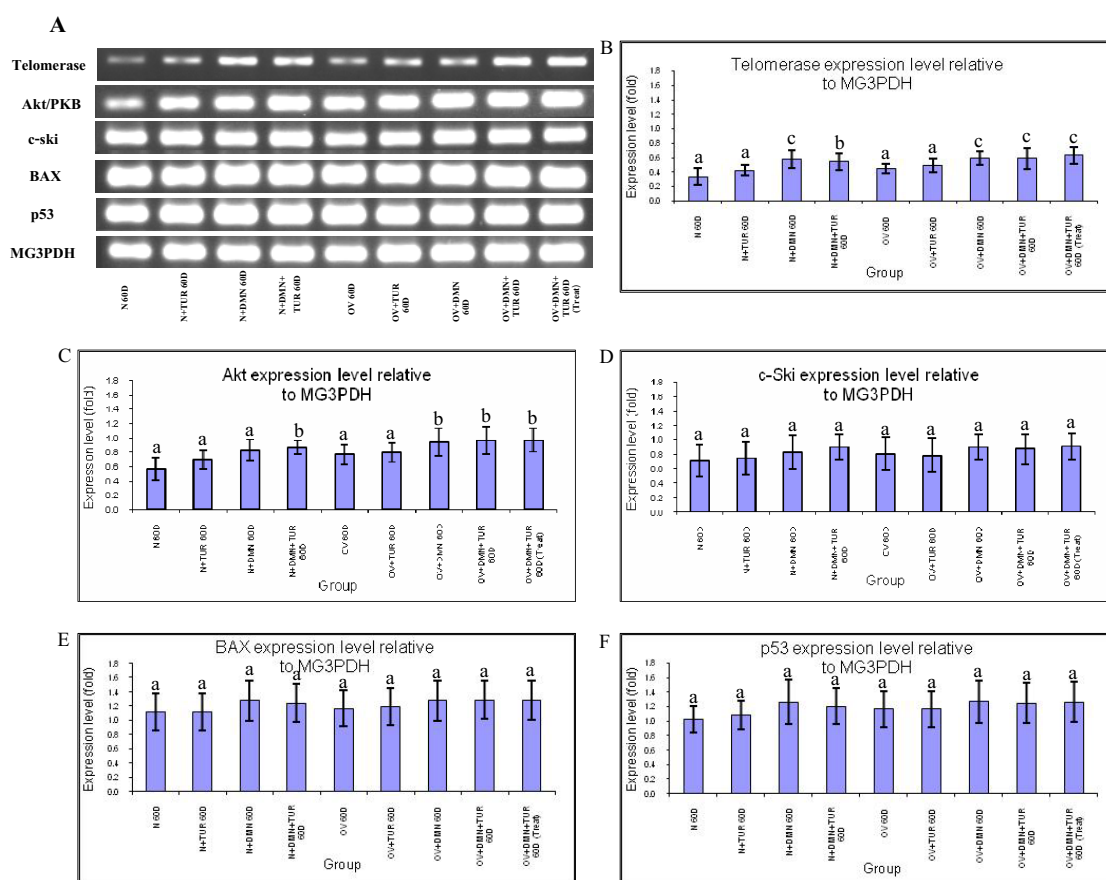
แบบแผนการแสดงออกของยีน BAX ในกลุ่ม N+TUR (1.12 ± 0.25) มีการแสดงออกต่ำกว่ากลุ่มหนูปกติ และยีน BAX มีแนวโน้มการ

แสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม OV (1.17 ± 0.26), OV+TUR (1.20 ± 0.26), N+NDMA+TUR (1.25 ± 0.27), OV+NDMA (1.28 ± 0.28), N+NDMA (1.28 ± 0.28), OV+NDMA+TUR (Treat) (1.28 ± 0.27) and OV+NDMA+TUR (1.29 ± 0.27) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มหนูปกติ (ภาพที่ 1E)

แบบแผนการแสดงออกของยีน p 53 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม N+TUR (1.08 ± 0.20), OV (1.16 ± 0.25), OV+TUR (1.17 ± 0.25), N+NDMA+TUR (1.20 ± 0.25), OV+NDMA+TUR (1.25 ± 0.27), OV+NDMA+TUR (Treat)

(1.26 ± 0.27), N+NDMA (1.26 ± 0.31) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มหนูปกติ (ภาพที่ 1F)

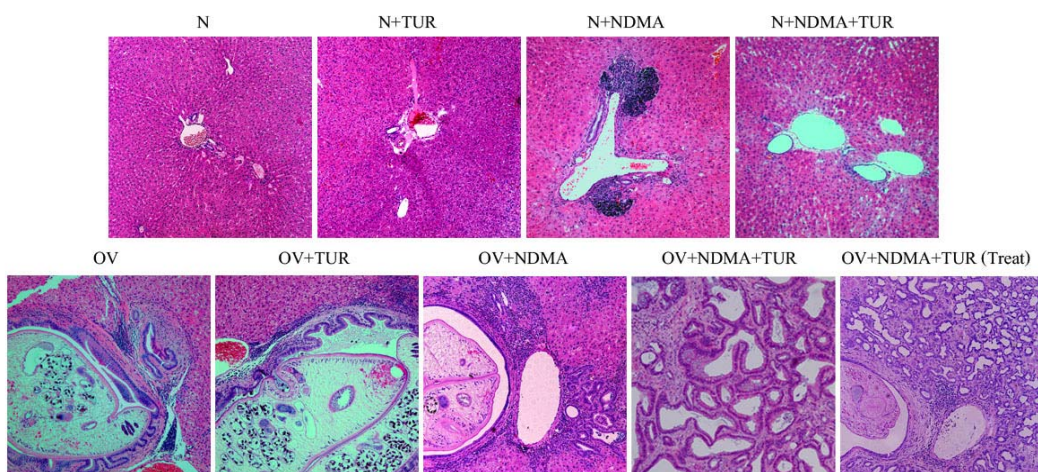
การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับพบว่าจากผลการทดลองพบว่าในหนูกลุ่มที่ให้ไขมันเพียงอย่างเดียว ไม่พบพยาธิสภาพเกิดขึ้น (ภาพที่ 2B) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine พบการจับกลุ่มกันของเซลล์อักเสบเป็นจำนวนมากรอบๆท่อน้ำดี (ภาพที่ 2C) ในขณะเดียวกันเมื่อกลุ่มนี้ได้รับอาหารไขมัน พบว่ามีจำนวนเซลล์อักเสบลดลงอย่างเห็นได้ชัด



ภาพที่ 1 แสดงผลของไขมันต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง (A) แสดงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเปรียบเทียบกับHouse keeping gene (MG3PDH), (B) แสดงการแสดงออกของยีนTelomerase เปรียบเทียบกับ MG3PDH, (C) แสดงการแสดงออกของยีน Akt/PKB เปรียบเทียบกับ MG3PDH, (D) แสดงการแสดงออกของยีน c-ski เปรียบเทียบกับ MG3PDH, (E) แสดงการแสดงออกของยีนBAX เปรียบเทียบกับ MG3PDH, (F) แสดงการแสดงออกของยีน p53 เปรียบเทียบกับ MG3PDH, ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของหนูทั้ง 5 ตัว

(ภาพที่ 2D) ส่วนในหนูกลุ่มที่ให้อาหารไขมันทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับพบว่าเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดีมีการเปลี่ยนแปลงของเพิ่มจำนวนขึ้น (epithelial hyperplasia) และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น goblet cell metaplasia และ adenomatous metaplasia เนื้อเยื่อรอบๆผนังท่อน้ำดีมีการหนาตัว (periductal fibrosis) และพบเซลล์อักเสบจำนวนมากในบริเวณเนื้อเยื่อรอบท่อน้ำดี (ภาพที่ 2E, 2F) ในหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและให้ Nitrosodimethyla-

mine พบว่า มีการสร้างท่อน้ำดีใหม่ (new bile duct formations) เกิดขึ้น และพบเซลล์อักเสบจำนวนมากในบริเวณเนื้อเยื่อรอบท่อน้ำดี (ภาพที่ 2G) ส่วนในกลุ่มเดียวกันที่อาหารไขมัน พบว่า มีการสร้างท่อน้ำดีใหม่ (new bile duct formations) เป็นจำนวนมากมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารไขมันร้อยละ 50 และพบเซลล์อักเสบลดลงในบริเวณเนื้อเยื่อรอบท่อน้ำดี เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ให้อาหารไขมัน (ภาพที่ 2H, 2I)



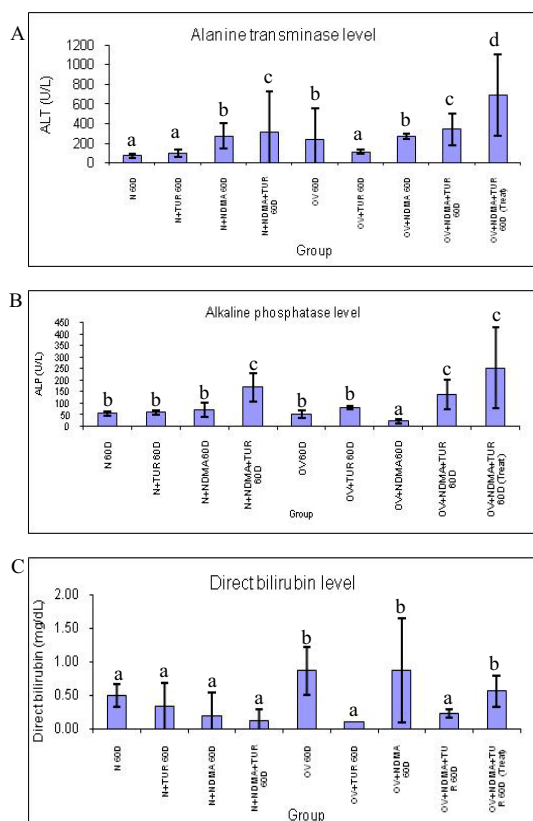
ภาพที่ 2 แสดงผลของไขมันต่อพยาธิสภาพภายในตับของหนูแฮมสเตอร์ (A) หนูปกติที่ให้อาหารและน้ำดื่มปกติ (N), (B) หนูปกติที่ให้อาหารไขมัน (N+TUR), (C) หนูปกติที่ให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine (N+NDMA), (D) หนูปกติที่ให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine และให้อาหารไขมัน (N+NDMA+TUR), (E) หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (OV), (F) หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้อาหารไขมัน (OV+TUR), (G) หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine (OV+NDMA), (H) หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine และ อาหารไขมัน (OV+NDMA+TUR), (I) หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและให้สารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine และอาหารไขมันเป็นการรักษาภายหลัง 1 เดือน (OV+NDMA+TUR (Treat))

ผลการศึกษาทางด้านเอนไซม์แสดงการทำงานของตับพบว่าระดับเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT) นั้นพบสูงที่สุดในกลุ่ม OV+NDMA+TUR(Treat) (684.00 ± 299.81) และแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในกลุ่ม OV (230.00 ± 7.07), OV+ NDMA (267.33 ± 30.24), N+NDMA (271.50 ± 16.26), N+NDMA+TUR (311.00 ± 82.02) OV+NDMA

+TUR (339.00 ± 162.34) จะมีระดับเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นตาม ลำดับ และสูงกว่าในกลุ่ม N, N+TUR และ OV+TUR ซึ่งมีเอนไซม์อยู่ในระดับปกติ (ภาพที่ 3A)

เนื่องจาก ALT เป็นเอนไซม์ที่สร้างจาก hepatocyte และจะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเซลล์ตับถูกทำลาย ดังนั้นในกลุ่ม OV+NDMA+TUR(Treat) เซลล์ตับถูกทำลายไปมาก จึงทำให้ค่า ALT ขึ้นสูง

ระดับของ alkaline phosphatase (ALP) จะค่อยๆสูงขึ้นเล็กน้อยในหนู OV (51.67 ± 15.82), N+TUR(59.33 ± 8.96), N+NDMA(72.67 ± 30.44) และ OV+TUR(79.67 ± 6.51) ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูปกติ และพบว่าหนู OV+NDMA (16.00 ± 10.82) มีค่า ALP ต่ำกว่าระดับปกติ แต่อย่างไรก็ตาม ระดับของ ALP จะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม OV+NDMA+TUR (110.67 ± 62.96), N+NDMA+TUR (170.76 ± 61.60) และ OV+NDMA +TUR(Treat) (188.33 ± 176.02) (ภาพที่ 3B)



ภาพที่ 3 แสดงผลของไขมันต่อระดับเอนไซม์แสดงการทำงานของตับ (A) ผลของไขมันต่อระดับAlanine transaminase, (B) ผลของไขมันต่อระดับAlkaline phosphatase, (C) ผลของไขมันต่อระดับ direct bilirubin, ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของหนูทั้ง 5 ตัว

และระดับของ direct bilirubin จะค่อยๆสูงขึ้นเล็กน้อยในหนู OV+TUR(0.10 ± 0.00), N+NDMA+TUR (0.13 ± 0.15), N+NDMA(0.20 ± 0.35) และ N +TUR (0.33 ± 0.35) ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูปกติ แต่อย่างไรก็ตามระดับของ direct bilirubin จะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม OV+NDMA +TUR (Treat) (0.57 ± 0.23), OV(0.87 ± 0.35) และ OV+NDMA(0.87 ± 0.78) ซึ่งผลของระดับของ alkaline phosphatase และ direct bilirubin สอดคล้องกับผลของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากการอุดตันของท่อน้ำดี (ภาพที่ 3C)

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าหนูปกติที่ได้รับอาหารไขมันไม่เกิดพยาธิสภาพเกิดขึ้นภายในตับ โดยการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง และระดับเอนไซม์แสดงการทำงานของตับอยู่ในระดับเดียวกันกับหนูปกติซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Reyes-Gordillo และคณะ ในปี 2008 ซึ่งพบว่า การให้สาร curcumin ไม่เกิดความผิดปกติในหนูปกติ ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง Nitrosodimethylamine นั้นพบว่าเกิดพยาธิสภาพขึ้นภายในตับ มีปริมาณเซลล์อักเสบเป็นจำนวนมากรอบท่อน้ำดี การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ และtelomerase มีการแสดงออกสูง เมื่อหนูกลุ่มนี้ได้รับอาหารไขมันพบว่ายีน telomerase มีการแสดงออกลดลง และปริมาณเซลล์อักเสบลดลงอย่างเห็นได้ชัดสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Chuang และคณะ ในปี 2000 ซึ่งรายงานการยับยั้งการเกิดมะเร็งตับจากสาร Diethylnitrosamine ในหนู mouse ด้วยสาร Curcumin ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทั้งที่ได้ รับประทานอาหารไขมันและไม่ได้รับอาหารไขมันนั้นพบว่าปริมาณเซลล์อักเสบเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันนัก การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ telomerase และค่าเอนไซม์แสดงการทำงานของตับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างหนูสองกลุ่มนี้ นอกจากนี้ในกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ และให้ Nitrosodimethylamine

มีการสร้างท่อน้ำดีใหม่ (new bile duct formations) เป็นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบจำนวนมากในบริเวณเนื้อเยื่อรอบท่อน้ำดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในปี 1987 ของ Thamavit และคณะ ซึ่งศึกษาการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์ และในกลุ่มเดียวกันนี้หลังจากให้อาหารไขมันแล้ว พบว่ามีการสร้างท่อน้ำดีใหม่ (new bile duct formations) เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและให้ Nitrosodimethylamine แต่ไม่ได้ให้อาหารไขมัน และยังพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งทั้งยีนที่กระตุ้นการตายเซลล์และยับยั้งการตายของเซลล์ และ telomerase ขึ้นสูงมาก นอกจากนี้ค่าเอนไซม์แสดงการทำงานของตับทั้ง ALP และ ALT สูงขึ้นมากซึ่งแสดงให้เห็นถึงสถานะที่เซลล์ตับและเซลล์ท่อน้ำดีถูกทำลายไปสูง ส่วนค่า direct bilirubin พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันนั้นมีระดับต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารไขมันซึ่งเป็นผลจากการที่สาร curcumin ในขมิ้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งน้ำดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rasyid and Lelo ในปี 1999

จากผลการทดลองนี้พบว่าผลของการใช้ขมิ้นสดในการศึกษาครั้งนี้ไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัด curcumin เนื่องจากพบว่าทั้งสารสกัด curcumin และขมิ้นสด นั้นไม่ก่อให้เกิดอันตรายในสภาวะปกติ (Reyes-Gordillo *et al.*, 2008) ช่วยลดปริมาณเซลล์อักเสบ (Chuang *et al.*, 2000) และสอดคล้องกับข้อควรระวังในการใช้สาร curcumin ที่ควรหลีกเลี่ยงในผู้ที่มีการอุดตันของท่อน้ำดี (Ross, 2003) ผลการศึกษานี้ผลที่ได้ขัดแย้งกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาว่า ขมิ้นเป็นสารต้านมะเร็ง (anti-cancer) หรือกระตุ้นการตายของเซลล์ (apoptosis) เนื่องจากเมื่อท่อน้ำดีอุดตัน มีการบีบขับน้ำดีไม่ได้ น้ำดีคั่งอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อได้รับไขมันเข้ามาเพิ่มการบีบขับของน้ำดีมากขึ้น ในขณะที่ท่อน้ำดีอุดตันไม่สามารถระบายน้ำดีออกได้ ทำให้ง่ายต่อการอักเสบที่ระบายน้ำดีออกโดยสร้างท่อน้ำดีใหม่ (New bile duct formations) ส่งผลให้เกิดเป็นมะเร็ง

ท่อน้ำดีขึ้น ซึ่งกลไกดังกล่าวน่าจะสอดคล้องกับโรค Filariasis แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของขมิ้นในสัตว์ทดลอง หรือผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีแต่อย่างใด ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า

1. ขมิ้นชันไม่เกิดพิษใดๆ ในสภาวะหนูปกติ
2. ขมิ้นชันมีคุณสมบัติในการลดการอักเสบพบว่าปริมาณเซลล์อักเสบลดลงอย่างเห็นได้ชัด
3. ขมิ้นชันทำให้เพิ่มการทำลายของเซลล์ตับในสภาวะของหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและได้รับสารก่อมะเร็ง
4. ขมิ้นชันมีคุณสมบัติในการช่วยขับขับน้ำดีทำให้ค่า direct bilirubin ต่ำลง
5. ขมิ้นชันส่งผลให้เกิดการส่งเสริมการพัฒนาและเพิ่มจำนวนของท่อน้ำดี ซึ่งไม่ทราบกลไกแน่ชัด
6. ขมิ้นชันไม่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งท่อน้ำดี

ประโยชน์ที่ได้จากขมิ้นชันนี้เป็นการสนับสนุนคุณสมบัติต่างๆ ของขมิ้นชันได้เป็นอย่างดี แต่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการพัฒนามะเร็งในท่อน้ำดีเร็วขึ้น ซึ่งนับว่าเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการที่จะควรที่จะมีการประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนระมัดระวังในการบริโภคสมุนไพรขมิ้นเพื่อต้านมะเร็งให้คำนึงถึงสภาวะร่างกายในขณะนั้นว่าเป็นอย่างไรโดยควรหลีกเลี่ยงในผู้ที่มีการอุดตันของทางเดินน้ำดี (Ross, 2003) ควรพิจารณาเกี่ยวกับขนาดหรือความเข้มข้นที่บริโภค รวมทั้งการบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานานอาจเป็นผลเสียตามมาได้ และคำนึงถึงในการเลือกใช้สมุนไพรควรได้รับการรับรองอย่างแน่นอนก่อนว่าสามารถใช้กับโรคนั้นๆ ได้จริง

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR (semi-quantitative technique) นั้นยังไม่สามารถแยกแยะระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงควรตรวจด้วยวิธี Real time RT-PCR ซึ่งเป็น quantitative technique บอกความแตกต่างได้ชัดเจนขึ้น

2. การตรวจทางพยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ และการตรวจวัดเอนไซม์แสดงการทำงานของตับ ALT, ALP และ direct bilirubin ช่วยบอกถึงความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น

3. การทดลองควรเพิ่มช่วงเวลาของการศึกษาให้มากขึ้นเพื่อจะได้บอกการพัฒนาของโรคได้ดีขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการทํางานในครั้งนี้ และขอขอบคุณบุคลากร แก้วสมุทร คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุน

เอกสารอ้างอิง

Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y., 2005. What is the role of p53 during the cyst formation of *Trichinella spiralis* ? A comparable study between knockout mice and wild type mice. *Parasitology*; 131(Pt 5): 705-12.

Boonmars, T., Srisawangwong, T., Srirach, P., Kaewsamut, B., Pinlaor, S., Sithithaworn, P. 2007. Apoptosis-related gene expressions in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini* and re-treated with praziquantel. *Parasitol Res*; 102(1):57-62.

Chuang, SE., Kuo, ML., Hsu, CH., Chen, CR., Lin, JK., Lai, GM., Hsieh, CY., Cheng. AL 2000. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*; 21(2): 331-5.

Cui, L., Miao, J., Cui, L. 2007. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother*; 51(2): 488-94.

Farley, DR., Weaver, AL., Nagorney, DM. 1995. "Natural history" of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention. *Mayo Clin Proc* 1995; 70(5): 425-9.

Holzinger F, Z'graggen K, Büchler MW. Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenetic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10(4): 122-6.

Johnson, J., Mukhtar, H. 2007. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Letters*; 255(2): 170-181.

Kaewsamut, B., Pinlaor, S., Boonmars, T., Srisawangwong, T., Yongvanit, P. 2007. Effect of curcumin on the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and antioxidant enzyme expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health*; 38(suppl 1): 66-73.

Maheshwari, R., Singh, AK., Gaddipati, J., Srimal, RC. 2006. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci* 2006;78, 2081-2087.

- Negi, PS., Jayaprakasha, GK., Jagan Mohan Rao. L., Sakariah. KK. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 47(10):4297–300.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). hepatobiliary cancer. NCCN Clinical Practice guidelines in oncology 2008; 2: INTRA-1 –EXTRA-1.
- Parkin, DM., Whelan, SL., Ferlay, J., Teppo, L., Thomas, DB. (eds.). 2002. Cancer incidence in five continents, volume VIII. International Agency for Research on Cancer;(155):1–781.
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Vergara, P., Moreno, MG., Muriel, P. 2008. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl₄ in rats: role of TGF- β modulation and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol*; 22(4): 417–27.
- Raysid, A., Lelo, A. 1999. The effect of curcumin and placebo on human gall-bladder function: An ultrasound study. *Ailment Pharmacol Ther*; 13(2); 245–249.
- Ross, CC. 2008. Anticancer Potential of Turmeric. *Alternative Medicine Alert* [serial online] 2003September 1[cited 2008 July 15] Available from: <http://thepowerhour.com/curcumin/Turmeric.pdf>
- Sriamporn, S., Pisani, P., Pipitgool, V., Suwanrungruang, K., Kamsa-ard, S., Parkin, DM. 2004. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Trop Med Int Health* ; 9(5):588–94.
- Thamavit, W., Kongkanunt, R., Tiwawech, D., Moore, MA. 1987. Level of *Opisthorchis infestation* and carcinogen dose-dependence of cholangiocarcinoma induction in syrian golden hamster. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*; 54:52–58.
- Vatanasapt, V., Martin, N., Sriplung, H., Chindavijak, K., Sontipong, S., Sriamporn, H., Parkin, DM., and Ferlay, J. 1995. Cancer incidence in Thailand, 1988–1991. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 1995; 4(5): 475–483.
- Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Takahashi, Y. 2006. of the c-Ski oncoprotein in cell cycle arrest and transformation during nurse cell formation after *Trichinella spiralis* infection. *Int J Parasitol* ; 36(10–11):1159–66.