บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเกิดจากเซลล์ร่างกายมีการแบ่งตัวไม่เป็นไปตามแบบแผนโดยอยู่นอกเหนืออำนาจการควบคุม สามารถทำลายเนื้อเยื่อใกล้เคียงและแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นของร่างกายได้ โดยผ่านทางกระแสเลือด กระแสน้ำเหลือง หรือแทรกตัวไปตามพื้นผิวภายในอวัยวะที่เป็นมะเร็งและอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง สาเหตุที่แท้จริงของโรคมะเร็งนั้นยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัด แต่คาดว่ามาจากสาเหตุหลายๆอย่างร่วมกัน เช่น พันธุกรรม พฤติกรรม หรือได้รับสารก่อมะเร็งจากสิ่งแวดล้อม เช่น สารเคมี รังสี สารพิษจากการสูบบุหรี่ เป็นต้น (กฤษณ์กมล บุณยธาดา, 2006) จากการรวบรวมโดยกระทรวงสาธารณสุข พบว่า สาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของคนไทยในปี 2548 คือ โรคมะเร็ง มีอัตราการเสียชีวิต 81.4 ต่อประชากรไทย 100,000 คน โรคมะเร็งจึงนับว่าเป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบอย่างมากต่อตัวผู้ป่วย ครอบครัว และสังคมที่ต้องสูญเสียทรัพยากรบุคคลที่มีค่าไป ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีคือ การแทรกตัวหรือลุกลามไปเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นในร่างกาย (metastasis) มีการศึกษาที่แสดงว่า receptor for advanced glycation end products (RAGE) มีความเกี่ยวข้องกับการลุกลามเนื้อเยื่อข้างเคียงของเซลล์มะเร็ง

RAGE เป็นตัวรับ (receptor) ในกลุ่ม immunoglobulin superfamily ของโมเลกุลบนผิวเซลล์ RAGE มีคุณสมบัติเป็น multiligand receptor สามารถจับกับลิแกนด์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด นอกจาก advanced glycation endproducts (AGEs) แล้ว RAGE ยังจับกับลิแกนด์อื่นๆ ได้อีก เช่น amyloid-β peptide (Du Yan et al., 1997) S100/calgranulin (Hofmann et al., 1999) และ amphoterin (Hori et al., 1995) การแสดงออกของ RAGE มีอยู่บนผิวเซลล์เกือบทุกชนิด ในสภาวะปกติ จะมีการแสดงออก RAGE ในระดับที่ไม่มีนัยสำคัญ แต่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีการสะสมของลิแกนด์ของ RAGE และ/หรือ transcription factor เช่น nuclear factor-kappaB (NF-kB) ที่ควบคุม RAGE ถูกกระตุ้น (Bierhaus et al., 2005) มีรายงานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ RAGE กับความสามารถลุกลาม/แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kuniyasu et al., 2001) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Hirata et al., 2003) เซลล์มะเร็งตับอ่อน (Takada et al., 2001) และเซลล์มะเร็งในช่องปาก (Bhawal et al., 2005) Takada และคณะ (2004) ได้รายงานถึงการแสดงออกของ matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ที่

เป็นไปในทางเดียวกันกับ RAGE ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับอ่อนด้วย นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงปฏิกิริยาของ RAGE กับลิแกนด์ในเซลล์มะเร็ง Kuniyasu และคณะ (2002) รายงานถึงการแสดงออกของ RAGE กับ amphoterin ในเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโต (growth) การเคลื่อนที่ (migration) และการลุกลาม ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ที่มีการแสดงออกร่วมกันของ RAGE และ amphoterin พบว่ามีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของทั้งสองอย่างร่วมกัน (Kuniyasu et al., 2003) Taguchi และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็ง C6 glioma ของหนู พบว่า การกีดกัน (blockade) ปฏิกิริยาระหว่าง RAGE กับ amphoterin จะลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การลุกลามและการทำงานของ matrix metalloproteinase (MMP) สำหรับปฏิกิริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs พบว่าเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตและการลุกลามของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (Ishiguro et al., 2005) หรือในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma พบว่า ปฏิกิริยาระหว่าง RAGE กับ AGEs กระตุ้นการเจริญเติบโต/การเพิ่มจำนวนเซลล์ การเคลื่อนที่ และการลุกลามของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญในหลอดทดลอง และเมื่อปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งผิวหนังแก่หนูทดลองและให้ anti-RAGE antibody พบว่าขนาดของเนื้องอกลดลง อัตราการมีชีวิตรอดของหนูทดลองเพิ่มขึ้น และยังยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปที่ปอดด้วย (Abe et al., 2004)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นพืชในตระกูลเดียวกับขิง (Zingiberaceae) มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานและมีสรรพคุณเป็นที่ยอมรับจนเป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรายาของหลายประเทศในทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย รวมทั้งในยุโรป นอกจากนี้ ยังสามารถทำเป็นอาหารในลักษณะของเครื่องเทศแต่งสี กลิ่น รส ใช้เป็นเครื่องสำอางและใช้เป็นสีย้อม (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2544) สารสำคัญที่พบในขมิ้นชันได้แก่ เคอร์คิวมิน (curcumin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoid) เคอร์คิวมินเป็นสารหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีผู้ทำการศึกษากันเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเคอร์คิวมินเป็นสารที่มีคุณสมบัติหลากหลาย อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ruby et al., 1995) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Brouet and Ohshima, 1995; Motterlini et al., 2000) ฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน (Arun and Nalini, 2002; Sajithlal et al, 1998) และฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Kim et al., 2005; Mahady et al., 2002) ฯลฯ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งของเคอร์คิวมิน Koo และคณะ (2004) รายงานฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านการเจริญและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (Elattar and Virji, 2000) เซลล์มะเร็งปอด (Zhang et al., 2004) เซลล์มะเร็งตับ (Li et al., 2002) และเซลล์มะเร็งกระเพาะ

เซลล์มะเร็ง B16F-10 ผ่านทางการยับยั้ง MMP ส่งผลให้การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปปอดลดลง และเนื่องจากเคอร์คิวมินมีคุณสมบัติต้านมะเร็งผ่านทางการยับยั้งการกระตุ้น transcription factor NF-kB (Singh and Aggarwal, 1995) และในเซลล์มะเร็งหลายชนิดพบว่ามีการกระตุ้น NF-kB ตลอดเวลา (Darnell, 2002) จึงมีรายงานถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของเคอร์คิวมินที่ผ่านทางการยับยั้ง NF-kB ในเซลล์มะเร็งสมอง (Nagai et al., 2005) เซลล์มะเร็งเต้านม (Aggarwal et al., 2005) เซลล์มะเร็งศีรษะและคอ (Aggarwal et al., 2004) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Kwon et al., 2005) ผ่านการยับยั้งการทำงานของ IkappaBalpha kinase (IKK) ป้องกันการเกิดฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) และการย่อยสลายใน Inhibitory-kappaBalpha (IkBα) ส่งผลให้การเจริญ/การเพิ่มจำนวนเซลล์และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลดลง รวมถึงเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยอัตโนมัติด้วย (apoptosis)

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การลุกลามและการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการศึกษากลไกในเซลล์มะเร็งและนำไปสู่การพัฒนายารักษามะเร็งต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการลุกลามของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW480)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW480)

ขอบเขตของการวิจัย

1. ขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้ส่วนเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งซื้อมาจากตลาดปากคลอง กรุงเทพฯ และปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) โดยใช้สารละลาย 80% เอธานอล เป็นตัวทำละลาย และนำสารสกัดขมิ้นชันที่ได้มาวัดหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอร์คิวมิน
2. เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ คัดเลือกจากเซลล์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR) โดยเซลล์ที่จะนำมาใช้ต้องมีการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ซึ่งเซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa (Human cervical adenocarcinoma cells) และเซลล์มะเร็งลำไส้ SW480 (Human colon adenocarcinoma cells)

3. ใช้เทคนิค proliferation assay ซึ่งใช้หลักการทำให้เกิดสี (colorimetric method) สำหรับหาจำนวนเซลล์มีชีวิต โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS หรือ inner salt) เป็นสารตั้งต้นสำหรับศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง
4. ใช้เทคนิค matrigel invasion assay สำหรับศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง
5. ใช้เทคนิค RT-PCR สำหรับศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็ง การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน RAGE ในเชิงปริมาณใช้โปรแกรมสำเร็จรูป AlphaImager 2200 ระดับการแสดงออกของยีน RAGE คำนวณจากสัดส่วนระหว่างความเข้มของแถบ (band) ดีเอ็นเอ ของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β–actin ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ทราบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการลุกลามของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW480)

2 ทราบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW480)

3 เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยและพัฒนายาจากขมิ้นชันเพื่อรักษาโรคมะเร็งต่อไป

4 ส่งเสริมให้คนหันมาบริโภคพืชผักสมุนไพรเพื่อรักษาสุขภาพและลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง

5 เพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรพื้นบ้านและเป็นเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ที่เพาะปลูกพืชสมุนไพรเป็นการกระจายรายได้สู่ชนบท