



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูก
ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมในเซลล์ไตและเซลล์ใน
ระบบภูมิคุ้มกัน

โดย ดร. อมรทัศน์ สดใส
สาขาวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มศว องค์กรักษ์

กรกฎาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูก ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมในเซลล์ไตและเซลล์ใน ระบบภูมิคุ้มกัน

ดร. อมรทัศน์ สดใส

สาขาวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ศ.ดร.ภาวิณี ปิยะจตุวัฒน์

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180016

ชื่อโครงการ : การศึกษาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูกต่อการเกิดพิษของแคดเมียมในเซลล์ไตและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

นักวิจัย และสถาบัน : ดร. อมรทัตน์ สดใส

สาขาวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มศว องค์กรักษ์

E-mail Address : amorntus@swu.ac.th, amorntus@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551-15 พฤษภาคม 2553 (2 ปี)

ขอขยายเวลา 2 ครั้ง รวม 1 ปี

บทคัดย่อ

แคดเมียมเป็นหนึ่งในโลหะหนักที่เป็นพิษมากในสิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบอย่างกว้างขวางในการเกิดพิษต่ออวัยวะต่างๆในมนุษย์ เซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนต้นและระบบภูมิคุ้มกันเป็นเป้าหมายปฐมภูมิของพิษแคดเมียม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของสารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษต่อเซลล์ของแคดเมียมในเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนต้น, LLC-PK₁ และพิษต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน, human T cell leukemia, Jurkat และ human pro-monocytic lymphoma, U937. ว่านชักมดลูกเป็นสมาชิกในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งมีที่ใช้ในประเทศไทยในการรักษาการอักเสบ การให้ 5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene และ 7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene) ที่สกัดได้จากว่านชักมดลูกสัมผัสกับเซลล์ก่อนได้รับแคดเมียม จะลดการเกิดเป็นพิษต่อเซลล์ได้ทั้งจากการวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) และการวัดปริมาณการรั่วของ lactate dehydrogenase (LDH). สารทั้งสองยังกดการสร้างโปรตีน c-Fos ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้น apoptosis และกดการทำลาย IκB-α และการกระตุ้น nuclear kappa B (NF-κB). ผลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารจากว่านชักมดลูกทั้งสองมีผลป้องกันพิษของแคดเมียมในเซลล์ LLC-PK₁. กลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเกิดจากการยับยั้งการกระตุ้น NF-κB. การให้สารทั้งสองก่อนการสัมผัสกับแคดเมียมและยังมีผลเพิ่มการหลั่ง interleukin 2 (IL-2) ในเซลล์ Jurkat ที่มีการกระตุ้นด้วย PMA/ ionomycin. และยังลดการหลั่ง tumor necrosis factor, TNF-α จากเซลล์ U937 ที่กระตุ้นด้วย PMA. ดังนั้นนอกจากผลในการป้องกันพิษต่อเซลล์ของแคดเมียมใน LLC-PK₁ แล้วยังมีแนวโน้มในการปรับการหลั่ง cytokine IL-2, TNF-α จากเซลล์ภูมิคุ้มกัน Jurkat และ U937 เมื่อถูกกระตุ้น

คำหลัก : ว่านชักมดลูก, แคดเมียม, เซลล์ไต, เซลล์ภูมิคุ้มกัน

Abstract

Project Code: MRG5180016

Project Title: Study on the effect of active compound from *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium-induced nephrotoxicity and immunotoxicity

Investigator: Dr, Amorntus Sodsai

Department of Biopharmacy Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirote University,
Nakhornnayok 26120

E-mail Address: amorntus@swu.ac.th, amorntus@yahoo.com

Project Period: 15 May 2008-15 May 2010 (2 years)

Cadmium, a one of the most toxic metal in the environment and affects wide range of organ toxicities in human. Renal proximal tubular epithelium and immune system are the primary targets of cadmium toxicity. In the present study, we aims to evaluate the protective effect of isolated compounds of *Curcuma comosa* on the cytotoxicity of cadmium (Cd) in renal proximal tubule epithelial cell line (LLC-PK₁) and the immunotoxicity in immune cell lines including human T cell leukemia, Jurkat and human pro-monocytic lymphoma, U937. *C. comosa* is a member of Zingiberaceae family which has traditionally been used in Thailand for treatment of inflammation. Pretreatment the cells with two diarylheptanoids (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene and 7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene) of *C. comosa* showed a dose dependent decrease in the Cd-induced cellular damage as evaluated by either MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and determination of lactate dehydrogenase (LDH) leakage. Both diarylheptanoids from *C. comosa* also suppressed Cd-induced c-Fos protein which plays a key role in activation of apoptosis and suppressed I κ B α degradation and activation of nuclear kappa B (NF- κ B). These results suggest that two diarylheptanoids of *C. comosa* effectively provide the protection against Cd cytotoxicity in LLC-PK₁ cells. Its mechanism of action is partly due to the inhibition of NF- κ B activation. Pretreatment with two diarylheptanoids significantly protected Cd-induced increasing interleukin 2 (IL-2) secretion in PMA/ ionomycin-stimulated Jurkat cells. The two diarylheptanoids also significantly decreased the release of tumor necrosis factor, TNF- α from Cd-PMA-stimulated U937 cells. Thus, in addition to the protective effect on the cytotoxicity of Cd in renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK₁, the isolated compounds of *Curcuma comosa* tend to modulate Cd-induced abnormal cytokine secretion in stimulated-immune cells, Jurkat and U937.

Key words: *Curcuma comosa* Roxb, Cadmium, LLC-PK₁, Jurkat, U937

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูกต่อการเกิดพิษของแคดเมียมในเซลล์ไตและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

(ภาษาอังกฤษ) Study on the effect of active compound from *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium-induced nephrotoxicity and immunotoxicity

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากว่านชักมดลูกที่สามารถป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อไตได้หรือไม่
2. เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากว่านชักมดลูกที่สามารถป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อระบบภูมิคุ้มกันได้หรือไม่
3. เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากว่านชักมดลูกที่สามารถป้องกันการอักเสบของไตซึ่งเกิดจากแคดเมียมไปมีผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการหลั่ง inflammatory cytokine ชนิดที่ทำให้เกิดการอักเสบได้หรือไม่

ที่มาของการวิจัย

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่เป็นผลพลอยได้จากการทำเหมืองสังกะสีและตะกั่ว นำมาใช้ประโยชน์ในการเคลือบโลหะเพื่อป้องกันสนิมและใช้ในโรงงานแบตเตอรี่และพลาสติก คนเราอาจได้รับแคดเมียม 5-10% จากปริมาณแคดเมียมที่มาจากอาหารที่รับประทาน โดยอาจติดมากับพืชผัก ผลไม้ หรือผลิตภัณฑ์จากอาหารสัตว์ที่นำมาปรุงอาหาร และอาจละลายอยู่ในน้ำที่ใช้ดื่ม หรือฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศโดยเฉพาะใกล้แหล่งอุตสาหกรรมที่มีการใช้แคดเมียมเป็นวัตถุดิบ การอยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในอากาศนานๆ จะทำให้แคดเมียมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายได้ (Rivai, Koyama et al. 1990; Niemczynowicz 1996)

ในประเทศไทย มีรายงานพบพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในสภาพแวดล้อม เช่น ที่ลุ่มแม่น้ำดาว อ. แม่สอด จ. ตาก ชาวบ้านในพื้นที่จำนวนมากมีแคดเมียมอยู่ในร่างกายโดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ 3-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังไม่พบอาการผิดปกติซึ่งระดับของแคดเมียมดังกล่าวมีแนวโน้มจะก่อให้เกิดความผิดปกติของไต (Teeyakasem, Nishijo et al. 2007, ชูติมา นุ่นมัน, 2547) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบผักที่ปลูกในบริเวณกรุงเทพฯ ที่มีขายในตลาด เช่น ผักขม มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก ได้แก่ปรอท ตะกั่วและแคดเมียม ในปริมาณที่ยังไม่เป็นอันตรายเมื่อบริโภคเข้าไปเพียงครั้งเดียว แต่อาจมีการสะสมในร่างกายจนเกิดเป็นพิษได้ (Gothberg, Greger et al. 2002). เนื่องด้วย

แคดเมียมถูกนำมาใช้ประโยชน์กว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ผลิตภัณฑ์หลายชนิดมีมาตรฐานกำหนดความเข้มข้นของแคดเมียมที่ยอมให้มีได้ เช่น ยาสำเร็จรูปที่เป็นสูตรยาแผนโบราณให้มีแคดเมียมได้ไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน ในน้ำดื่มอนุญาตให้มีได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่สร้างผลกระทบมาก ๆ คือการปนเปื้อนของแคดเมียมในอาหารทะเล นอกจากอาหารแล้ว สำหรับผู้ที่ยังสูบบุหรี่มีข้อมูลว่าในบุหรี่ 1 มวน มีแคดเมียมประมาณ 1-2 ไมโครกรัม และ 10% ของแคดเมียมจะถูกหายใจเข้าไปเวลาสูบ (วลัยพร मुखสุวรรณ, 2549) มีรายงานการวิจัยถึงผลของแคดเมียมในการทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆตายโดยมีสาเหตุมาจากภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) มีระดับ reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation สูง และเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione ในเซลล์ (Shaikh, Vu et al. 1999, Thijssen, Cuypers et al. 2007, Garcon, Leleu et al. 2004) และมีการศึกษาจำนวนมากที่ใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดออกซิไดซ์ (antioxidant) สามารถลดหรือป้องกันภาวะต่างๆ ที่มีการถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล เช่น สารจำพวก Carotenoid, Vitamin E, Flavonoids, Curcumin เป็นต้น (Cohly, Taylor et al. 1998, Pari, Murugavel et al. 2007). ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ใน *Curcuma* species ตระกูลเดียวกับขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ว่านชักมดลูกมีสารออกฤทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Curcumin ซึ่งพบในขมิ้นชัน และจากการศึกษาที่ผ่านมาปรากฏว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูกมีความสามารถในการป้องกันการอักเสบของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยสารพิษได้ และยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยมีผลลดการหลั่ง inflammatory cytokines จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ NF-KB (Sodsai, Piyachaturawat et al. 2007). ดังนั้นมีความเป็นไปได้สูงที่สารจากว่านชักมดลูกจะสามารถป้องกันการเกิดพิษที่ไตและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถนำมาเป็นแนวทางในการหาสารที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันนี้จากพืชชนิดอื่นๆ มาพัฒนาเป็นสารต้านอาการพิษจากแคดเมียมหรือโลหะหนักอื่นๆ ที่มีลักษณะการเกิดพิษคล้ายกับแคดเมียมได้

การดำเนินงานและผลที่ได้รับจากการวิจัย

1. สารจากว่านชักมดลูกที่ได้นำมาศึกษาวิจัย คือ #91: (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene) และ #92: (7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene)
2. หาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ โดยใช้ MTT และ LDH assay ผลที่ได้ คือ ขนาดของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-30 ไมโครโมลาร์ และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง
3. ศึกษาผลของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ LLCPK₁ พบว่า สารจากว่านชักมดลูก #91 และ #92 ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ ของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และ #92 ที่ขนาด 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ลดความ

เป็นพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อใช้แคดเมียมความเข้มข้น 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารจากวุ้นชั้กมดลูก #92 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเป็นพิษของแคดเมียมความเข้มข้น 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้ ขณะที่ #91 ไม่มีผลลดความเป็นพิษของแคดเมียมในขนาด 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และมีแนวโน้มว่าอาจจะเพิ่มความเป็นพิษ ผลการลดความเป็นพิษโดยดูจาก % LDH leakage release เป็นไปในทางเดียวกับผลของ cell viability โดยใช้ MTT

4. ศึกษากลไกของสารจากวุ้นชั้กมดลูกในการป้องกันพิษจากแคดเมียม โดย Western blot analysis เพื่อหา NF- κ B, I κ B- α และ c-Fos พบว่าสารจากวุ้นชั้กมดลูก #92 ในความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มป้องกันพิษจากแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ไซโตซอล #92 ทำให้แถบโปรตีนของ I κ B α เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว และที่นิวเคลียส #92 ทำให้แถบโปรตีนของ NF- κ B ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่ากลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ ของแคดเมียมและกลไกการป้องกันพิษของสารจากวุ้นชั้กมดลูกมีแนวโน้มว่าจะเกิดผ่าน I κ B- α , NF- κ B pathway

5. หาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ Jurkat cell line โดยใช้ MTT assay พบว่าขนาดของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-10 ไมโครโมลาร์ และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง

6. ศึกษาผลของสารจากวุ้นชั้กมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อ Jurkat T cells พบว่าทั้งสารจากวุ้นชั้กมดลูก #91 และ #92 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อ Jurkat T cells ของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 5 , 10 ไมโครโมลาร์ ได้

7. หาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ U937 cell line โดยใช้ MTT assay พบว่าขนาดของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-30 ไมโครโมลาร์ และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง

8. ศึกษาผลของสารจากวุ้นชั้กมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อ U937 cells พบว่าทั้งสารจากวุ้นชั้กมดลูก #91 และ #92 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อ U937 cells ของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 หรือ 30 ไมโครโมลาร์ ได้

9. ศึกษาผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากวุ้นชั้กมดลูกต่อการหลั่ง cytokine IL-2 โดยใช้ Jurkat T cells พบว่า พบว่าแคดเมียมทุกความเข้มข้นมีผลลดการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่ถูกกระตุ้น และเมื่อทำการทดลองโดย Pretreatment ด้วยสารจากวุ้นชั้กมดลูก 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมแล้วจึงทำการกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml พบว่า สารจากวุ้นชั้กมดลูก # 92 ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่สัมผัสกับแคดเมียม 10 และ 20 ไมโครโมลาร์

10. ศึกษาผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากว่านชักมดลูกต่อการหลั่ง cytokine $\text{TNF-}\alpha$ โดยใช้ U937 cells พบว่าแคดเมียมทุกความเข้มข้นมีผลลดการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ จาก U937 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA และเมื่อทำการทดลองโดย Pretreatment ด้วยสารจากว่านชักมดลูก 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมแล้วจึงทำการกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml พบว่า สารว่านชักมดลูก # 92 ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ จาก U937 cells ที่สัมผัสกับแคดเมียม 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ก่อนถูกกระตุ้น

11. ศึกษากลไกของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษจากแคดเมียม โดย Western blot analysis เพื่อหา NF- κ B, I κ B- α จาก Jurkat และ U937 cells พบว่า สารจากว่านชักมดลูก #92 ในความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มป้องกันพิษจากแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ไซโตซอล #92 ทำให้แถบโปรตีนของ I κ B α เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว และที่นิวเคลียส #92 ทำให้แถบโปรตีนของ NF- κ B ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่ากลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ Jurkat และ U937 ของแคดเมียมและกลไกการป้องกันพิษของสารจากว่านชักมดลูกมีแนวโน้มว่าจะเกิดผ่าน I κ B- α , NF- κ B pathway

12. ศึกษาผลของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมที่มีต่อระดับ glutathione ใน LLC PK_1 cells พบว่า การให้สาร #92 ก่อนได้รับแคดเมียมระดับ glutathione จะสูงกว่าเมื่อเทียบกับที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว

ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นจากการทำวิจัย

1. เนื่องจากห้องเลี้ยงเซลล์ เพิ่งถูกพัฒนาขึ้นมา มีการปรับปรุงห้องเป็นระยะ และมีปัญหาการ contamination อยู่บ้าง เป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้ล่าช้าจากที่วางแผนไว้
2. ระบบไฟฟ้าที่คณะเภสัชศาสตร์ มศว ชัดข้องในบางครั้ง ทำให้ตู้บ่มสำหรับเลี้ยงเซลล์ มี CO_2 และอุณหภูมิไม่เหมาะสมบ้างเป็นระยะ ทำให้การดำเนินการแต่ละขั้นตอน ต้องล่าช้าออกไป
3. ในระยะแรก ไม่สามารถส่งไนโตรเจนเหลวให้มาส่งที่คณะเภสัชศาสตร์ มศว องค์กรฯ ได้จึงต้องฝากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ เป็น stock ไว้ที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อเกิดการ contamination กับเซลล์ที่เลี้ยงเพื่อทำการวิจัยอยู่ จึงต้องใช้เวลาสำหรับการเดินทางมานำเซลล์จากใน stock มา thaw ใช้ใหม่ แต่อย่างไรก็ตามในปีที่ 2 ของการทำวิจัย สามารถหาบริษัทที่มาส่งไนโตรเจนเหลวให้ได้แล้ว

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 ยังไม่มีผลงานวิจัยที่พิมพ์ แต่กำลังดำเนินการเขียน Manuscript
 ชื่อเรื่องและชื่อวารสารนานาชาติที่คาดว่าจะตีพิมพ์ได้ คือ
 - 1.1 Effect of *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium-induced renal epithelial (LLCPK₁) toxicity เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Toxicology in Vitro หรือ เทียบเท่า
 - 1.2 Effect of *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium toxicity in immune cells เพื่อตีพิมพ์ใน วารสาร International Immunopharmacology หรือเทียบเท่า
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - 2.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 และ 10
 - 2.2 เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
 โดยใช้ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ มาพัฒนาการเรียนการสอนในวิชาโครงงานวิจัยของนิสิตระดับปริญญาตรี ในหัวข้อเรื่อง
 - การศึกษาผลของสาร(3R) 1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol ใน การป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน human monocytic U937 cells
 - การศึกษาผลของสาร (3R) 1, 7-diphenyl-(4E, 6E)-4,6-heptadiene-3-ol ในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ตับ (human hepatoma, HepG2 cells)

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

-

งานวิจัยที่คาดว่าจะดำเนินการต่อไป

- ศึกษาสารบริสุทธิ์จากवानชักมดลูกอื่นๆ ซึ่งมีมากมายหลายชนิด เพิ่มเติม
- ศึกษากลไกในแต่ละ signaling pathway นอกจาก NF-κB pathway เนื่องจากแคดเมียมมี กลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ได้หลาย pathway

สารบัญ
(TABLE OF CONTENTS)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	lii
Executive summary	iv
สารบัญ	ix
สารบัญรูป	x
สารบัญตาราง	xii
เนื้อหา	
บทนำ	1
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการทดลอง	6
ผลการทดลอง	18
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และ ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย อนาคต	38
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	46
ประวัติย่อผู้วิจัย	51

สารบัญรูป

(LIST OF FIGURES)

รูปที่	หน้า
1. LLCPK ₁ cells	7
2. Jurkat cells	7
3. U937 cells	8
4. แสดงโครงสร้างของ Compound I หรือ #91: (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene) และ Compound II หรือ #92: (7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene)	18
5. แสดง dose-response curve ของ แคดเมียมเปรียบเทียบระหว่าง % cell viability และ % LDH leakage release ใน LLCPK ₁ cells	19
6. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.	20
7. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.	21
8. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.	21
9. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ LDH assay เพื่อวัด % LDH leakage	23

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
10. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ LDH assay เพื่อวัด % LDH leakage release.	23
11. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ LDH assay เพื่อวัด % LDH leakage release.	24
12. แสดงแถบโปรตีนของ I κ B- α , NF- κ B และ c-Fos ที่เป็นผลจากการ pretreatment LLCPK ₁ cells ด้วยสารสกัดจากว่านชักมดลูก # 91 และ # 92 ขนาด 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนได้รับแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลยและที่ได้รับแคดเมียมอย่าง	26
13. แสดง dose-response curve ของแคดเมียมต่อ % cell viability Jurkat T cells	27
14. แสดง dose-response curve ของ แคดเมียมต่อ % cell viability U937 cells	28
15. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ใน Jurkat T cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.	29
16. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ใน Jurkat T cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด %	29
17. แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ใน U937 cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell	30

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
18. แสดงผลของแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นแต่ไม่ได้รับแคดเมียม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย	31
19. แสดงผลจากการ pretreatment ด้วย # 92 ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการสัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นและไม่ได้/ได้รับแคดเมียม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย	32
20. แสดงผลของแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง TNF- α จาก U937 cells เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย	33
21. แสดงผลจากการ pretreatment ด้วย #91 & # 92 ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการสัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง TNF- α จาก U937 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นแต่ไม่ได้รับแคดเมียม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย	34
22. แสดงแถบโปรตีนของ NF- κ B และ I κ B- α ที่เป็นผลจากการ pretreatment Jurkat T cells ด้วยสารสกัดว่านชักมดลูก # 91 และ # 92 ขนาด 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนได้รับแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลยและที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว	35
23. แสดงแถบโปรตีนของ NF- κ B และ I κ B- α ที่เป็นผลจากการ pretreatment U937 cells ด้วยสารสกัดว่านชักมดลูก # 91 และ # 92 ขนาด 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนได้รับแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลยและที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว	36

สารบัญตาราง
(LIST OF TABLES)

ตารางที่	หน้า
1. ผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อระดับของ glutathione ใน LLC _{PK} ₁ cells เมื่อได้รับพิษจากแคดเมียม 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	37
2. ผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อระดับของ glutathione ใน LLC _{PK} ₁ cells เมื่อได้รับพิษจากแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	37

บทนำ (INTRODUCTION)

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่เป็นผลพลอยได้จากการทำเหมืองสังกะสีและตะกั่ว นำมาใช้ประโยชน์ในการเคลือบโลหะเพื่อป้องกันสนิมและใช้ในโรงงานแบตเตอรี่และพลาสติก คนเราอาจได้รับแคดเมียม 5-10% จากปริมาณแคดเมียมที่มาจากอาหารที่รับประทาน โดยอาจติดมากับพืชผัก ผลไม้ หรือผลิตภัณฑ์จากอาหารสัตว์ที่นำมาปรุงอาหาร และอาจละลายอยู่ในน้ำที่ใช้ดื่ม หรือฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศโดยเฉพาะใกล้แหล่งอุตสาหกรรมที่มีการใช้แคดเมียมเป็นวัตถุดิบ การอยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในอากาศนานๆ จะทำให้แคดเมียมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายได้ ในประเทศไทย มีรายงานพบพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในสภาพแวดล้อม เช่น ที่ลุ่มแม่น้ำดาว อ. แม่สอด จ. ตาก ชาวบ้านในพื้นที่จำนวนมากมีแคดเมียมอยู่ในร่างกายโดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ 3-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ยังไม่พบอาการผิดปกติ ซึ่งระดับของแคดเมียมดังกล่าวมีแนวโน้มจะก่อให้เกิดความผิดปกติของไต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบผักที่ปลูกในบริเวณกรุงเทพฯ ที่มีขายในตลาด เช่น ผักขม มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก ได้แก่ปรอท ตะกั่วและแคดเมียม ในปริมาณที่ยังไม่เป็นอันตรายเมื่อบริโภคเข้าไปเพียงครั้งเดียว แต่อาจมีการสะสมในร่างกายจนเกิดเป็นพิษได้ เนื่องด้วยแคดเมียมถูกนำมาใช้ประโยชน์กว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ผลิตภัณฑ์หลายชนิดมีมาตรฐานกำหนดความเข้มข้นของแคดเมียมที่ยอมให้มีได้ เช่น ยาสำเร็จรูปที่เป็นสูตรยาแผนโบราณให้มีแคดเมียมได้ไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน ในน้ำดื่มอนุญาตให้มีได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่สร้างผลกระทบมาก ๆ คือการปนเปื้อนของแคดเมียมในอาหารทะเล นอกจากอาหารแล้ว สำหรับผู้ที่ยังสูบบุหรี่มีข้อมูลว่าในบุหรี่ 1 มวน มีแคดเมียมประมาณ 1-2 ไมโครกรัม และ 10% ของแคดเมียมจะถูกหายใจเข้าไปเวลาสูบ (วลัยพร มุขสุวรรณ, 2549) มีรายงานการวิจัยถึงผลของแคดเมียมในการทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆตายโดยมีสาเหตุมาจากภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) มีระดับ reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation สูง และเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione ในเซลล์ (Shaikh, Vu et al. 1999, Thijssen, Cuypers et al. 2007, Garcon, Leleu et al. 2004) และมีการศึกษาจำนวนมากที่ใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดออกซิไดซ์ (antioxidant) สามารถลดหรือป้องกันภาวะต่างๆ ที่มีการถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล เช่น สารจำพวก Carotenoid, Vitamin E, Flavonoids, Curcumin เป็นต้น (Cohly, Taylor et al. 1998, Pari, Murugavel et al. 2007).

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ใน *Curcuma species* ในตระกูลเดียวกับขิง ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ใน Family Zingiberaceae ประชาชนทั่วไปนิยมนำมาใช้รักษาอาการอักเสบของมดลูกโดยเฉพาะในสตรีที่ตกเลือดหลังคลอด จากการศึกษาที่ผ่านมาปรากฏว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูกมีความสามารถในการป้องกันการอักเสบของเซลล์ตับที่ถูกทำลายด้วยสารพิษได้ และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ใน microglia cell line, HAPI ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) มีกลไกการออกฤทธิ์โดยไปกุดการหลั่งของ nitric oxide และกด iNOS gene และ mRNA expression ผ่านการรบกวนการ transcription (Jantaratnotai, Utaisincharoen et al. 2006). จากการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวและเซลล์ human pro-monocytic U937 พบว่าสารบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบโดยลดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines 2 ชนิด คือ tumor necrosis factor และ interleukin-1 β และกุดการทำงานของ I κ B kinase (IKK β) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้ NF- κ B อยู่ในรูป active form โดยถูกปลดปล่อยจาก I κ B α ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมแล้วสามารถเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียสไปมีผลต่อการ transcription ของ gene ต่างๆ และยังลดการแสดงออกของ NF- κ B ด้วย (Sodsai, Piyachaturawat et al. 2007). สารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูกบางตัวมีโครงสร้างคล้ายกับ Curcumin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant สามารถป้องกันเซลล์จากภาวะ oxidative stress ได้ (Cohly et al. 1997) N-acetylcysteine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ก็สามารถป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้ (Wispriyono et al. 1998) ดังนั้นมีความเป็นไปได้สูงที่สารจากว่านชักมดลูกจะสามารถป้องกันการเกิดพิษที่ไตและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถนำมาเป็นแนวทางในการหาสารที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันนี้จากพืชชนิดอื่นๆ มาพัฒนาเป็นสารต้านอาการพิษจากแคดเมียมหรือโลหะหนักอื่นๆ ที่มีลักษณะการเกิดพิษคล้ายกับแคดเมียม

การวิจัยในครั้งนี้ทำการศึกษาใน cell culture system (in vitro) โดยใช้เซลล์ LLCPK₁ cell line ซึ่งเป็นเซลล์ไตของหนูและมีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ท่อไตส่วนต้น สำหรับการศึกษาผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ไตและใช้เซลล์ Jurkat T , U937 cell line ซึ่งเป็นตัวแทนของ T cells และ monocytes ตามลำดับ สำหรับการศึกษาผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อการเกิดพิษของแคดเมียมต่อระบบภูมิคุ้มกัน

2. วัตถุประสงค์และเป้าหมายของโครงการ

- 2.1 เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากว่านชักมดลูกว่าสามารถป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อไตได้หรือไม่
- 2.2 เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากว่านชักมดลูกว่าสามารถป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อระบบภูมิคุ้มกันได้หรือไม่
- 2.3 เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากว่านชักมดลูกว่าสามารถป้องกันการอักเสบของไตซึ่งเกิดจากแคดเมียมไปมีผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการหลั่ง inflammatory cytokine ชนิดที่ทำให้เกิดการอักเสบได้หรือไม่

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 สามารถนำผลที่ได้ไปพัฒนาสารจากว่านชักมดลูกเป็นยาที่ใช้ป้องกันหรือลดพิษจากแคดเมียมได้
- 3.2 สามารถนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์จากพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในการป้องกันพิษแคดเมียมที่มีผลกระทบต่ออวัยวะต่างๆ ได้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (LITERATURE REVIEW)

แคดเมียมมีพิษร้ายแรง เมื่อให้แกสัตว์ทดลอง พบว่าจะทำให้เกิดถุงอัมพาตหรือเกิดเนื้องอกที่อัมพาต ทำลายมดลูก ทำให้แท้ง ทารกในครรภ์พิการ ทำลายท่อไตและตับ กระดูกฟันเสียหาย และทำให้ร่างกายขาดธาตุแคลเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี (Nogawa, Yamada et al. 1984; Kazantzis 2004) ในคนพบโรคที่เกิดจากแคดเมียมครั้งแรกหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ในประเทศญี่ปุ่น โดยพบผู้ป่วยแสดงอาการปวดกระดูกและกระดูกแตกหักง่าย เจ็บปวดเวลาเดิน เรียกโรคนี้ว่าอิตาอิไต (itai-itai) ซึ่งมีสาเหตุจากผู้ป่วยบริโภคอาหารที่ทำมาจากพืชผักที่ปลูกในบริเวณใกล้ๆเหมืองแร่ สังกะสี ที่มีการปนเปื้อนด้วยแคดเมียมจำนวนมาก เมื่อแคดเมียมในอาหารบางส่วนถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้เกิดความดันโลหิตสูง เป็นสาเหตุให้เกิดโรคหัวใจ หัวเต้นผิดปกติ เมื่อมีการสะสมที่ไตทำให้เกิดนิ่วในไต เนื้อไต และตับถูกทำลาย รบกวนการทำงานของแคลเซียมในกระดูก กระดูกอ่อนแอแตกหักง่าย (Shigematsu 1984).

ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงกลไกการเกิดพิษของแคดเมียมกันมากขึ้นเรื่อยๆ มีรายงานพบว่าแคดเมียมทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis (ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ที่มีบทบาทในการเจริญพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์) ในเนื้อเยื่อและเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์ของระบบทางเดินหายใจ (Hart et al.1999), อัมพาต (Zhou et al.1999), ไต (Somji et al. 1999), ตับ (Habeebu et al. 1998) และระบบภูมิคุ้มกัน (el Azzouzi et al.1994) การศึกษาใน rat kidney epithelial cells พบว่า กลไกในการทำให้เกิด apoptosis โดยแคดเมียมนั้นเกี่ยวข้องกับการลดลงของ NF- κ B activity.

NF- κ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์ เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ gene ต่างๆ โดยเฉพาะที่ทำให้เกิดการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ และ gene ที่ป้องกันเซลล์จากการกระตุ้นที่ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis (Woods, Dieguez-Acuna et al. 2002) NF- κ B ถูกกระตุ้นได้ด้วย pro-inflammatory stimuli ได้แก่ cytokines, growth factors (Barnes et al. 1997) และยังสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) (Schoonbroodt and Piette 2000). ในโรคกรวยไตอักเสบ พบว่ามีการกระตุ้น NF- κ B ใน glomerular cells ทำให้เกิดการแสดงออกของ pro-inflammatory gene รวมทั้ง chemokines, adhesion molecules, inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase (COX) (Lopez-Franco et al. 2002) การยับยั้งการทำงานของ NF- κ B จึงเป็นทางหนึ่งในการรักษาโรคกรวยไตอักเสบ

การศึกษาบทบาทของแคดเมียมต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าแคดเมียมสามารถเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของ T cells ในการสร้าง interleukin-2 (IL-2) และสามารถปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหลอดทดลองได้ (Krocova, Macela et al. 2000, Petanova, Fucikova et al. 2000, Colombo, Hamelin et al. 2004) และการวิจัยในสัตว์ทดลอง (in vivo) ยังพบว่าแคดเมียมมีผลกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ในหนู mice (Muller, Gillert et al. 1979) นอกจากนี้ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับไต แคดเมียมทำให้มีการหลั่ง TNF- α ซึ่งเป็น cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่บริเวณไต (Kayama, Yoshida et al. 1995)

ในประเทศไทย มีรายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในสภาพแวดล้อมซึ่งเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขในปัจจุบัน และยังพบว่าผักที่นำมาขายในตลาด มีการปนเปื้อนของโลหะหนักรวมทั้งแคดเมียมในปริมาณที่ทำให้เกิดการสะสมในร่างกายจนเกิดเป็นพิษได้ นอกจากนี้แคดเมียมยังถูกนำมาใช้ประโยชน์กว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม มีการใช้ในผลิตภัณฑ์หลายชนิดรวมทั้งบุหรี่ ดังนั้นโอกาสที่จะได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจึงมีสูง

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ใน *Curcuma species* ในตระกูลเดียวกับขิง ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ใน Family Zingiberaceae ประชาชนทั่วไปนิยมนำมาใช้รักษาอาการอักเสบของมดลูกโดยเฉพาะในสตรีที่ตกเลือดหลังคลอด จากการศึกษาที่ผ่านมาปรากฏว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูกมีความสามารถในการป้องกันการอักเสบของเซลล์ตับที่ถูกทำลายด้วยสารพิษได้ และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ใน microglia cell line, HAPI ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) มีกลไกการออกฤทธิ์โดยไปกวดการหลั่งของ nitric oxide และกด iNOS gene และ mRNA expression ผ่านการรบกวนการ transcription (Jantaratnotai, Utaisincharoen et al. 2006). จากการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวและเซลล์ human pro-monocytic U937 พบว่าสารบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบโดยลดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines 2 ชนิด คือ tumor necrosis factor และ interleukin-1 β และกวดการทำงานของ I κ B kinase (IKK β) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้ NF- κ B อยู่ในรูป active form โดยถูกปลดปล่อยจาก I κ B α ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมแล้วสามารถเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียสไปมีผลต่อการ transcription ของ gene ต่างๆ และยังลดการแสดงออกของ NF- κ B ด้วย (Sodsai, Piyachaturawat et al. 2007). สารออกฤทธิ์จากว่านชักมดลูกบางตัวมีโครงสร้างคล้ายกับ Curcumin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant สามารถป้องกันเซลล์จากภาวะ oxidative stress ได้ (Cohly et al. 1997) N-acetylcysteine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ก็สามารถป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ LLCPK $_1$ ได้ (Wispriyono et al. 1998) ดังนั้นมีความเป็นไปได้สูงที่สารจากว่านชักมดลูกจะสามารถป้องกันการเกิดพิษที่ไตและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้

วิธีการทดลอง (MATERIALS AND METHODS)

วัสดุ อุปกรณ์

CO₂ incubator
Laminar flow hood
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
Refrigerated centrifuge
ELISA Plate reader spectrophotometer
96-well plate, 24-well plate, 6-well plate
Culture flask
Pasture pipette
Cell counter
Hematocytometer
Centrifuge tube 15, 50 ml
ชุดแยกโปรตีน

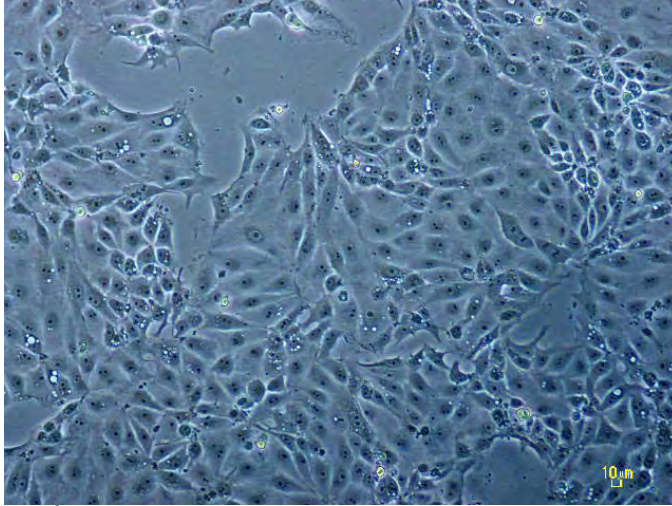
สารเคมี

Trypan blue dye
MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 และ DMEM
Trypsin-0.53 mM EDTA solution
Fetal bovine serum (FBS)
Non-Essential amino acid
Antibiotic-antimycotic solution
Primary antibody : NF- κ B (p65), I κ B- α , β -actin, c-Fos
Secondary antibody
SuperSignal West Pico Substrate
ฟิล์ม และน้ำยาล้างฟิล์ม
ELISA kit for IL-2 และ TNF- α
BCA (bicinchoninic acid) protein assay
Glutathione Colorimetric Detection Kit

วิธีดำเนินการวิจัย

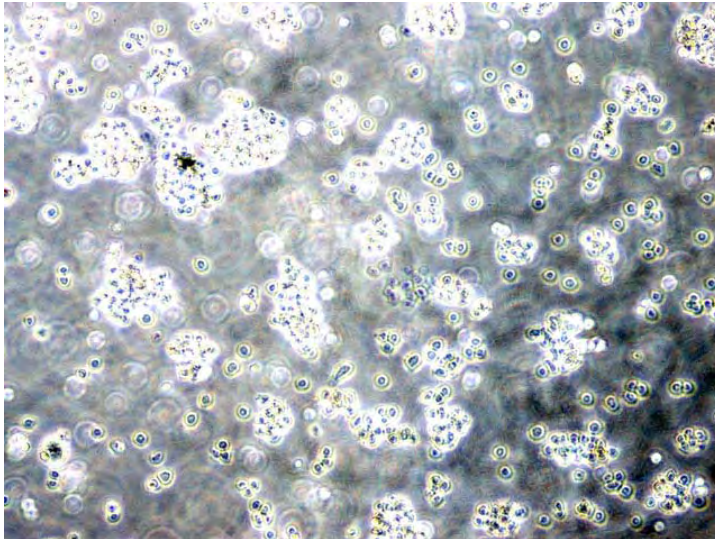
- การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

1. LLCPK₁ cell line : ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS)



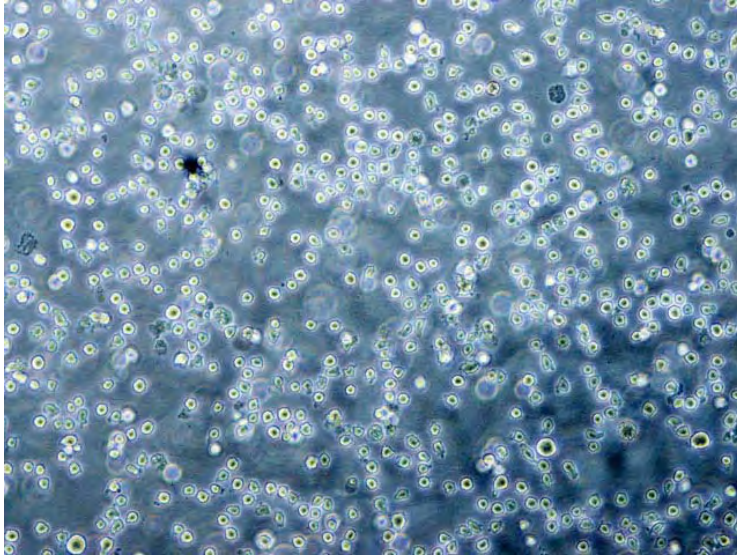
รูปที่ 1 LLCPK₁ cells

2. Jurkat T cell line : ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS)



รูปที่ 2 Jurkat cells

3. U937 cell line : ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS)



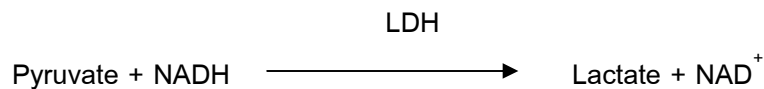
รูปที่ 3 U937 cells

- การเตรียมสารละลาย cadmium chloride (CdCl_2) : ละลาย cadmium chloride ใน ultra pure water ทำเป็นความเข้มข้น 20 mM สำหรับ stock solution กรองด้วย filter ($0.22 \mu\text{m}$) เจือจางด้วย media เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
- การเตรียมสารจากवानชักมดลูก : #91: (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene) และ #92: (7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene) โดยละลายใน 100% DMSO และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ โดยให้มี DMSO ไม่เกิน 0.1%
- หาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ โดยใช้ MTT assay ซึ่งมีหลักการ คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase ใน mitochondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ที่มีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
 1. เตรียม MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) โดยละลายใน phosphate buffer saline ให้เป็น 5 mg/ml
 2. หาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทำ MTT assay โดยใช้จำนวนเซลล์ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 5,000, 10,000, 15,000, 25,000 และ 30,000 cell/well ใน 96-well plate เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ติดและแผ่เต็ม well เติม MTT solution (5 mg/ml) 20 ไมโครลิตร และบ่มในตู้บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดส่วน supernatant ออกทำให้เซลล์แตกด้วยการ

เติม 100% DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm สร้าง Standard curve ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 540 nm จำนวนเซลล์ที่ให้ค่า OD) ประมาณ 1.00 หรือไม่ต่ำกว่า 1.00 คือ 2.5×10^4 cell/well

3. Plate เซลล์ใน 96-well plate ด้วยจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จาก Standard curve คือ 2.5×10^4 cell/well โดยแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลาสัมผัสแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติมสารละลาย MTT และบ่มในตู้บ่มต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อหาความเข้มข้น และเวลาการสัมผัสที่เหมาะสมของแคดเมียมซึ่งทำให้เกิดพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตาย

- หาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ cell line โดยใช้ LDH assay : ซึ่งมีหลักการ คือ เมื่อเกิดพิษต่อเซลล์ เอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) จะ release จากเซลล์สู่ medium , activity ของ LDH วัดโดยอาศัยปฏิกิริยา



การเปลี่ยน lactate ไปเป็น pyruvate ในขณะที่มี LDH ทำให้ NAD^+ ลดลงควบคู่กันไปด้วย การเกิดขึ้นของ NADH จากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm

1. หาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทำ LDH assay โดยใช้จำนวนเซลล์ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 5000, 10000, 15000, 25000 และ 30000 cell/well ใน 96-well plate เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ติดและแผ่เต็ม well บั่นด้วยเครื่อง centrifugation ที่ 800xg ดูดส่วน supernatant ทั้ง ทำให้เซลล์ในแต่ละ well แตกด้วย 0.1% Triton-X 100 บั่นด้วยเครื่อง centrifugation ที่ 800xg ดูดส่วน supernatant ซึ่งมี Lactate dehydrogenase (LDH) มาทำปฏิกิริยากับ pyruvate และ NADH ผลจากปฏิกิริยาจะได้ NAD^+ ซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงได้จากค่า OD ที่ 340 nm นำมาคำนวณหา activity ของ LDH สร้าง Standard curve ระหว่างจำนวนเซลล์และ activity ของ LDH
2. Plate เซลล์ใน 96-well plate ด้วยจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จาก Standard curve คือ 2.5×10^4 cell/well โดยแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลาสัมผัสแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg เพื่อเก็บสารน้ำเหนือเซลล์ (supernatant) มาทำปฏิกิริยา

กับ pyruvate และ NADH ผลจากปฏิกิริยาจะได้ NAD^+ วัดการเปลี่ยนแปลงได้จากค่า OD ที่ 340 nm หา activity ของ LDH และคิดเป็น % release เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติจำนวน 2.5×10^4 cell/well ที่ถูกทำให้แตกหมดด้วย 0.1% Triton X 100.

- ศึกษาฤทธิ์ของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ โดยให้เซลล์สัมผัสกับสารจากว่านชักมดลูกที่เวลาต่าง ๆ กัน ก่อน/พร้อม/หลัง ได้รับแคดเมียม หลังจากนั้นทำการทดสอบด้วย MTT และ LDH assay
- แยกโปรตีนจากเซลล์ LLCPK₁ cell line และวิเคราะห์ โดยเทคนิค Western Blot หา NF- κ B p65, I κ B- α เพื่อศึกษาว่าการเกิดพิษของแคดเมียมและ/หรือฤทธิ์ในการป้องกันพิษของสารจากว่านชักมดลูก มีความเกี่ยวข้องกับ NF- κ B pathway หรือไม่
 1. Plate LLCPK₁ 5×10^5 cell/well ใน 6-well plate แบ่ง well ต่าง ๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากว่านชักมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 1, 2, 4, 6 ชั่วโมง
 2. เมื่อครบเวลา บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ตูต media ทั้ง ล้างด้วย PBS
 3. ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysis buffer แยกส่วนไซโตซอล และนิวเคลียส ไซโตซอลใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา I κ B α และ c-Fos ส่วนของนิวเคลียสใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา NF- κ B p65
 4. วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ BCA (bicinchoninic acid) protein assay
 5. แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง (50 ไมโครกรัม) ด้วย 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลท์ ประมาณ 2 ชั่วโมง
 6. Transfer โปรตีนที่ถูกแยกจาก gel มาที่ PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA
 7. Block membrane ด้วย 5% nonfat milk ใน Tris-buffered saline (TBS) ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
 8. นำ membrane มา incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ c-Fos หรือ β -actin ใน 5% nonfat milk TBS เป็นเวลามากกว่า 18 ชั่วโมง หรือ overnight ที่ 4° C
 9. ล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้ง
 10. นำ membrane มา incubate กับ secondary antibody ใน 5% nonfat milk TBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง

11. นำ membrane incubate กับ SuperSignal West Pico Substrate เป็นเวลา 5 นาที (ในห้องมืด)
 12. หุ้ม membrane ด้วยพลาสติก นำไปประกบกับฟิล์มใน film cassette 5-20 นาที (ในห้องมืด)
 13. ล้างฟิล์มด้วย developer, fixer และน้ำ ตามลำดับ (ในห้องมืด)
 14. ถ้ามีโปรตีนของ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ c-Fos หรือ β -actin อยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่นำมาทดสอบ ก็จะปรากฏเป็นแถบให้เห็นชัดเจนซึ่งสามารถวัดค่าความหนาแน่นได้ด้วย Densitometer
- หาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ Jurkat T cell line และ U937 cell line โดยใช้ MTT assay โดยดำเนินการดังนี้
 1. ทำการเลี้ยง Jurkat T cell และ U937 cell line ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี 10% Fetal Bovine Serum
 2. หาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทำ MTT assay โดยใช้จำนวนเซลล์ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 20000, 50000, 100000, 150000 และ 200000 cell/well ใน 96-well plate เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง เติม MTT solution (5 mg/ml) 20 ไมโครลิตร และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปั่น plate ด้วยเครื่อง centrifugation ที่ 800xg ดูดส่วน supernatant ออกทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม 100% DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm สร้าง Standard curve ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 540 nm จำนวนเซลล์ที่ให้ค่า OD) ประมาณ 1.00 หรือไม่ต่ำกว่า 1.00 คือ 1×10^5 cell/well
 3. Plate เซลล์ใน 96-well plate ด้วยจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จาก Standard curve คือ 1×10^5 cell/well โดยแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลาสัมผัสแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติม MTT solution (5 mg/ml) 20 ไมโครลิตร และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปั่น plate ด้วยเครื่อง centrifugation ที่ 800xg ดูดส่วน supernatant ออกทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม 100% DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm
 - ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากवानชักมดลูกต่อการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ Jurkat T cells และ U937 โดยให้เซลล์สัมผัสกับสารจากवानชักมดลูกความเข้มข้นต่างๆ กัน ก่อน/พร้อม/หลัง ได้รับแคดเมียม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้ MTT assay

- เตรียมตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากว่านชักมดลูก ต่อการหลั่ง cytokine IL-2 โดยใช้ Jurkat T cells
 1. Plate cells จำนวน 1×10^6 cells/well ใน 24-well plate โดยเติมสารที่เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมในที่นี้ คือ Phorbol myristate acetate (PMA) 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml เพื่อกระตุ้นให้หลั่ง cytokine ดังกล่าวข้างต้น เติมน้ำเลี้ยง แคดเมียมที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยที่ในแต่ละ plate มีภาวะควบคุมที่มีเซลล์ปกติ และภาวะที่มีเฉพาะตัวกระตุ้นไม่มีแคดเมียม เพื่อเปรียบเทียบผล
 2. เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง นำ plate มาปั่นเพื่อให้สามารถเก็บน้ำเหนือเซลล์ (supernatant) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ปนอยู่กับสิ่งคัดหลั่งจากเซลล์ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บนี้มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบผลด้วยชุดตรวจ ELISA ของ cytokine IL-2
 3. เลือกความเข้มข้นของแคดเมียมที่มีผลต่อการหลั่ง cytokine IL-2 มากที่สุดมาศึกษาต่อ โดยทำการทดลองเหมือนกับข้อ 6.1-6.3 แต่มีการ Pretreatment ด้วยสารจากว่านชักมดลูก 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมและให้การกระตุ้นด้วย Phorbol myristate acetate (PMA) 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml
- เตรียมตัวอย่างสำหรับแยกโปรตีนจาก Jurkat T cells เพื่อวิเคราะห์ โดย Western Blot สำหรับหา NF- κ B (p65), I κ B- α
 1. Plate Jurkat T cells 2×10^6 cell/well ใน 6-well plate แบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากว่านชักมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 30 นาที, 1, 2, 4, 6 ชั่วโมง
 2. เมื่อครบเวลา ปั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ดูด media ทั้ง ล้างด้วย PBS
 3. ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysis buffer แยกส่วนไซโตซอล และนิวเคลียส ไซโตซอลใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา I κ B- α ส่วนของนิวเคลียสใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา NF- κ B เก็บตัวอย่างในแต่ละส่วนที่ -75 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบโดย Western blot
- วิเคราะห์ โดย Western Blot สำหรับหา NF- κ B (p65), I κ B- α จากตัวอย่างของ Jurkat T cells
 1. วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ BCA protein assay
 2. แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง (50 ไมโครกรัม) ด้วย 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลท์ ประมาณ 2 ชั่วโมง

3. Transfer โปรตีนที่ถูกแยกจาก gel มาที่ PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA
 4. Block membrane ด้วย 5% nonfat milk ใน Tris-buffered saline (TBS) ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
 5. นำ membrane มา incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ NF- κ B (p65) หรือ I κ B- α หรือ β -actin ใน 5% nonfat milk TBS เป็นเวลามากกว่า 18 ชั่วโมง หรือ overnight ที่ 4° C
 6. ล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้ง
 7. นำ membrane มา incubate กับ secondary antibody ใน 5% nonfat milk TBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง
 8. นำ membrane incubate กับ SuperSignal West Pico Substrate เป็นเวลา 5 นาที (ในห้องมืด)
 9. หุ้ม membrane ด้วยพลาสติก นำไปประกบกับฟิล์มใน film cassette 5-20 นาที (ในห้องมืด)
 10. ล้างฟิล์มด้วย developer, fixer และน้ำ ตามลำดับ (ในห้องมืด)
 11. ถ้ามีโปรตีนของ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ β -actin อยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่นำมาทดสอบก็จะปรากฏเป็นแถบให้เห็นชัดเจนซึ่งสามารถวัดค่าความหนาแน่นได้ด้วย Densitometer
- เตรียมทำการศึกษาผลของแคดเมียมและผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อการหลั่ง cytokine TNF- α โดยใช้ U937 cells
 1. Plate cells จำนวน 1×10^6 cells/well ใน 24-well plate โดยเติมสารที่เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมในที่นี้ คือ PMA 25 ng/ml เพื่อกระตุ้นให้หลั่ง cytokine TNF- α เติมสารละลายแคดเมียมที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยที่ในแต่ละ plate มีภาวะควบคุมที่มีเซลล์ปกติ และภาวะที่มีเฉพาะตัวกระตุ้นไม่มีแคดเมียม เพื่อเปรียบเทียบผล
 2. เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง นำ plate มาปั่นเพื่อให้สามารถเก็บน้ำเหนือเซลล์ (supernatant) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ปนอยู่กับสิ่งคัดหลั่งจากเซลล์ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บนี้มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 75 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบผลด้วยชุดตรวจ ELISA ของ cytokine TNF- α
 3. เลือกความเข้มข้นของแคดเมียมที่มีผลต่อการหลั่ง cytokine TNF- α มากที่สุดมาศึกษาต่อ โดยทำการทดลองเหมือนกับข้อ 9.1-9.3 แต่มีการ Pretreatment ด้วยสารจากว่านชักมดลูก 1 ชั่วโมง ก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมและให้การกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml

- เตรียมตัวอย่างสำหรับแยกโปรตีนจาก U937 cells เพื่อ วิเคราะห์ โดย Western Blot สำหรับหา NF- κ B, I κ B- α
 1. Plate U937 cells 2×10^6 cell/well ใน 6-well plate แบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากวุ้นชกมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 30 นาที, 1, 2, 4, 6 ชั่วโมง
 2. เมื่อครบเวลา บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ดูด media ทิ้ง ล้างด้วย PBS
 3. ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysis buffer แยกส่วนไซโทซอล และนิวเคลียส ไซโทซอลใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา I κ B α ส่วนของนิวเคลียสใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา NF- κ B (p65) เก็บตัวอย่างในแต่ละส่วนที่ -75 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบโดย Western blot
- วิเคราะห์ โดย Western Blot สำหรับหา NF- κ B (p65), I κ B- α จากตัวอย่างของ U937 cells
 1. วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ BCA protein assay
 2. แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง (50 ไมโครกรัม) ด้วย 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลท์ ประมาณ 2 ชั่วโมง
 3. Transfer โปรตีนที่ถูกแยกจาก gel มาที่ PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA
 4. Block membrane ด้วย 5% nonfat milk ใน Tris-buffered saline (TBS) ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
 5. นำ membrane มา incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ NF- κ B (p65) หรือ I κ B- α หรือ β -actin ใน 5% nonfat milk TBS เป็นเวลามากกว่า 18 ชั่วโมง หรือ overnight ที่ 4° C
 6. ล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้ง
 7. นำ membrane มา incubate กับ secondary antibody ใน 5% nonfat milk TBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง
 8. นำ membrane incubate กับ SuperSignal West Pico Substrate เป็นเวลา 5 นาที (ในห้องมืด)
 9. หุ้ม membrane ด้วยพลาสติก นำไปประกบกับฟิล์มใน film cassette 5-20 นาที (ในห้องมืด)
 10. ล้างฟิล์มด้วย developer, fixer และน้ำ ตามลำดับ (ในห้องมืด)
 11. ถ้ามีโปรตีนของ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ β -actin อยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่นำมาทดสอบก็จะปรากฏเป็นแถบให้เห็นชัดเจนซึ่งสามารถวัดค่าความหนาแน่นได้ด้วย Densitometer

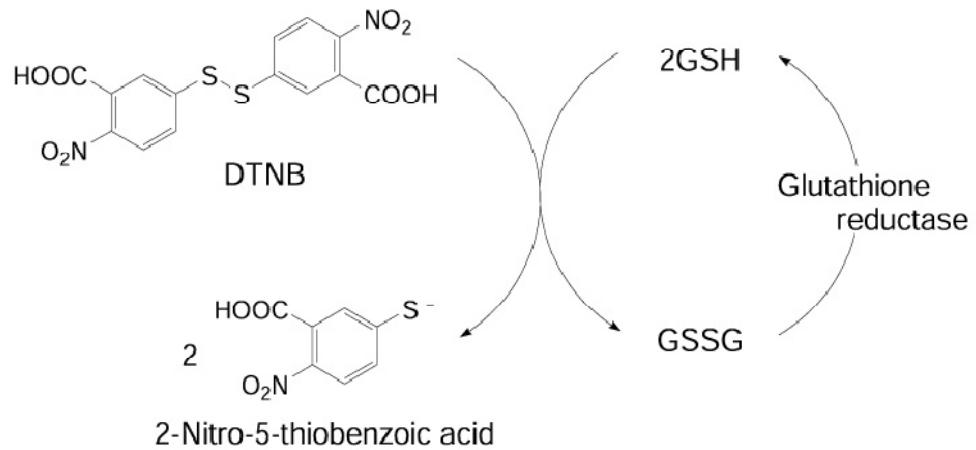
- ทดสอบเลี้ยง LLCPK₁ cells ร่วมกับ Jurkat T cells, LLCPK₁ cells ร่วมกับ U937 cells
 1. Plate LLCPK₁ cells 1×10^5 cells/well ใน 24 well-plate แบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 well สำหรับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด กลุ่มแรกเลี้ยงใน 10% FBS DMEM กลุ่มที่ 2 ใน 10% FBS RPMI 1640 เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ติด
 2. เติม U937 cells หรือ Jurkat cells จำนวน 1×10^5 cells/well ลงไปเลี้ยงร่วมตัวอีก 24 ชั่วโมง ดูด media ซึ่งมี U937 หรือ Jurkat cells ออกเพื่อดูลักษณะการเจริญของ LLCPK₁ cells พบว่าใน well ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิด 10% FBS RPMI 1640 นั้น LLCPK₁ cells ลอกหลุดออกเป็นแผ่นไม่ติดที่พื้น well ในการทดลองต่อไปที่เป็นการเลี้ยงเซลล์ร่วมกันจะใช้อาหารชนิด 10% FBS DMEM
- ศึกษาผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากว่านชักลูกต่อการหลั่ง cytokine TNF- α เมื่อเลี้ยง LLCPK₁ cells ร่วมกับ Jurkat T cells, LLCPK₁ cells ร่วมกับ U937 cells
 1. Plate LLCPK₁ cells 5×10^5 cells/well ใน 6 well-plate เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง
 2. เติม U937 cells หรือ Jurkat cells จำนวน 5×10^5 cells/well ลงไปเลี้ยงร่วมตัวอีก 24 ชั่วโมง ดูด media ซึ่งมี U937 หรือ Jurkat cells
 3. เติมสารละลายแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5, 10, 20, และ 30 ไมโครโมลาร์ และ บ่มในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง
ดูด media ซึ่งมี U937 หรือ Jurkat cells ออกให้หมด ล้างด้วย PBS ทำให้เซลล์แตกด้วย RIPA lysis buffer ทำเป็น whole lysate เก็บที่ -75 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบโดย Western blot วิเคราะห์หา TNF- α
- วิเคราะห์ โดย Western Blot สำหรับหา TNF- α จากตัวอย่างของ LLCPK₁ cells
 1. วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ BCA protein assay
 2. แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง (20 ไมโครกรัม) ด้วย 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง
 3. Transfer โปรตีนที่ถูกแยกจาก gel มาที่ PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA
 4. Block membrane ด้วย 5% nonfat milk ใน Tris-buffered saline (TBS) ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
 4. นำ membrane มา incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ TNF- α หรือ β -actin ใน 5% nonfat milk TBS เป็นเวลามากกว่า 18 ชั่วโมง หรือ overnight ที่ 4° C
 6. ล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้ง

7. นำ membrane มา incubate กับ secondary antibody ใน 5% nonfat milk TBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง
 8. นำ membrane incubate กับ SuperSignal West Pico Substrate เป็นเวลา 5 นาที
 9. หุ้ม membrane ด้วยพลาสติก นำไปประกบกับฟิล์มใน film cassette 5-20 นาที
 10. ล้างฟิล์มด้วย developer, fixer และน้ำ ตามลำดับ (ในห้องมืด)
 11. ถ้ามีโปรตีนของ TNF- α หรือ β -actin อยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่นำมาทดสอบก็จะปรากฏเป็นแถบให้เห็นชัดเจนซึ่งสามารถวัดค่าความหนาแน่นได้ด้วย Densitometer
- จากการทดสอบหาแถบโปรตีน TNF- α ในขั้นตอนนี้ไม่เห็นแถบโปรตีนเลยจากทุกตัวอย่าง ประกอบกับในระยะถัดมา U937 และ Jurkat cells มีปัญหาเรื่องการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงไม่สามารถทำการทดสอบต่อไปได้

การทดลองที่ได้ทำเพิ่มเติมนอกเหนือจากที่วางแผนไว้

1. การวิเคราะห์หาทรานสคริปต์ c-Fos ในเซลล์ตัวอย่าง LLCPK₁ วิธีทำกล่าวอยู่ข้างต้น
 2. ศึกษาฤทธิ์ของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมที่มีต่อระดับ glutathione ในเซลล์ LLCPK₁
- ศึกษาฤทธิ์ของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมที่มีต่อระดับ glutathione ในเซลล์ LLCPK₁
 1. Plate LLCPK₁ cells 5×10^5 cells/well ใน 6 well-plate เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมงแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากว่านชักมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 2. เมื่อครบเวลา บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ดูด media ที่ล้างด้วย PBS
 3. ทำให้เซลล์แตกด้วย glutathione buffer (เย็น) บ่มเป็นเวลา 10 นาที
 4. เติม 5% SSA 20 μ l, ผสมและ centrifuge ที่ 8000xg เป็นเวลา 10 นาที
 5. ดูด supernatant เก็บที่ -75 องศาเซลเซียสเพื่อวิเคราะห์ระดับ glutathione

6. ตรวจระดับ glutathione โดยใช้ชุดทดสอบ Glutathione Colorimetric Detection Kit โดยอาศัยหลักการ glutathione recycling system โดย DTNB และ glutathione reductase



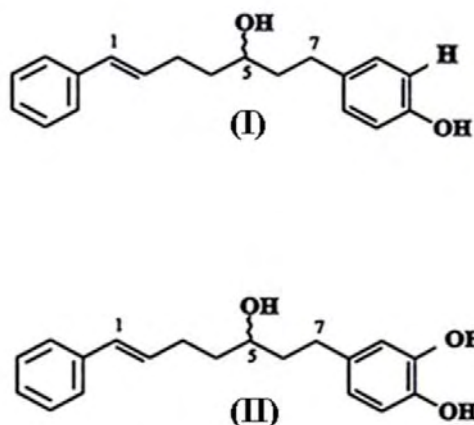
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ และการแปลผล (Statistical analysis)

ผลการวิจัยแสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM โดยข้อมูลแต่ละกลุ่มจะทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วย One-way ANOVA แล้วทำการตรวจสอบระดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มต่อไป ด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลการทดลอง

(RESULTS)

สารจากवानชักมดลูกที่ได้นำมาศึกษาวิจัยในช่วงนี้ คือ #91: (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene) และ #92: (7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene) มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4

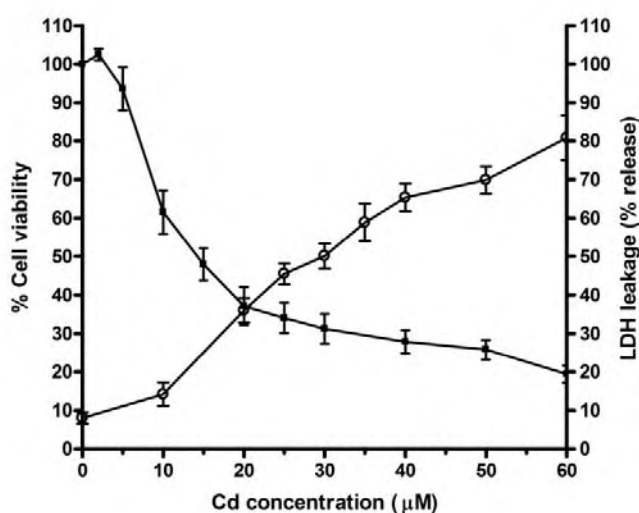


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ Compound I หรือ #91: (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene) และ Compound II หรือ #92: (7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene)

- ขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ โดยใช้ MTT และ LDH assay

เมื่อ Plate เซลล์ 2.5×10^4 cell/well ใน 96-well plate โดยแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลาสัมผัสแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติมสารละลาย MTT และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อหาความเข้มข้นและเวลาการสัมผัสที่เหมาะสมของแคดเมียมซึ่งทำให้เกิดพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตาย พบว่า ขนาดของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-30 ไมโครโมลาร์ โดยเป็นขนาดที่ทำให้ cell viability ลดลง 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับการสัมผัสกับแคดเมียม และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง

สำหรับ LDH assay ทำการ plate เซลล์และให้สัมผัสกับแคดเมียมตามทีระบุข้างต้น เมื่อครบเวลาปั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg เพื่อเก็บสารน้ำเหนือเซลล์ (supernatant) มาทำปฏิกิริยากับ pyruvate และ NADH ผลจากปฏิกิริยาจะได้ NAD^+ วัดการเปลี่ยนแปลงได้จากค่า OD ที่ 340 nm หา activity ของ LDH และคิดเป็น % release เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติจำนวน 2.5×10^4 cell/well ที่ถูกทำให้แตกหมดด้วย 0.1% Triton X 100 พบว่า ขนาดที่เหมาะสมของแคดเมียมอยู่ในช่วง 20-30 ไมโครโมลาร์ โดยเป็นขนาดที่ทำให้ LDH leakage release 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับการสัมผัสกับแคดเมียม และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง (รูปที่ 5)

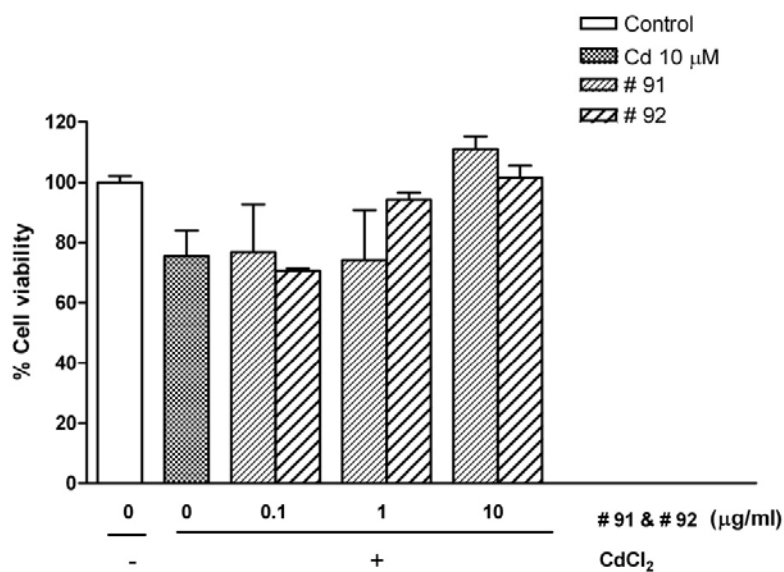


รูปที่ 5 แสดง dose-response curve ของ แคดเมียมเปรียบเทียบระหว่าง % cell viability และ % LDH leakage release ใน LLCPK₁ cells

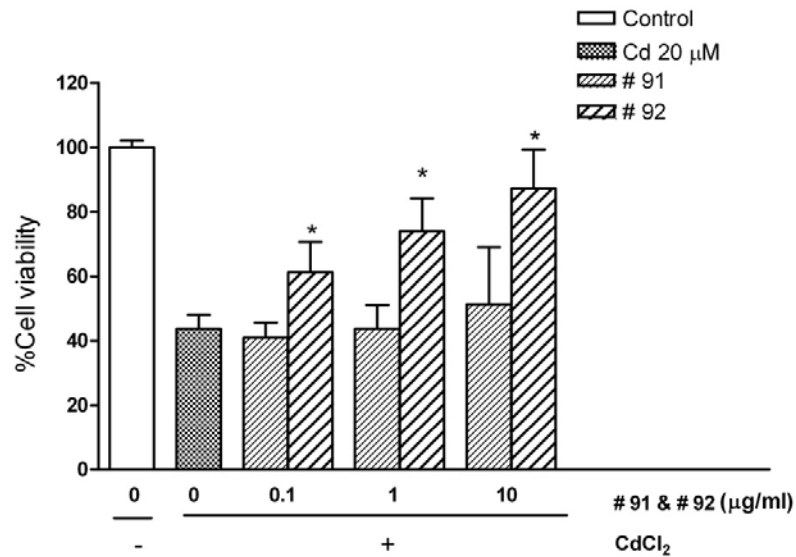
- ผลของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ LLCPK₁

เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสารจากว่านชักมดลูกความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้น 18 ชั่วโมงเติมสารละลาย MTT และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อหา % cell viability ผลการทดสอบพบว่า สารจากว่านชักมดลูก #91 และ #92 ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ ของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ได้โดยเพิ่ม % cell viability เท่ากับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแคดเมียม (รูปที่ 6) และ #92 ที่ขนาด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดความเป็นพิษของแคดเมียมที่

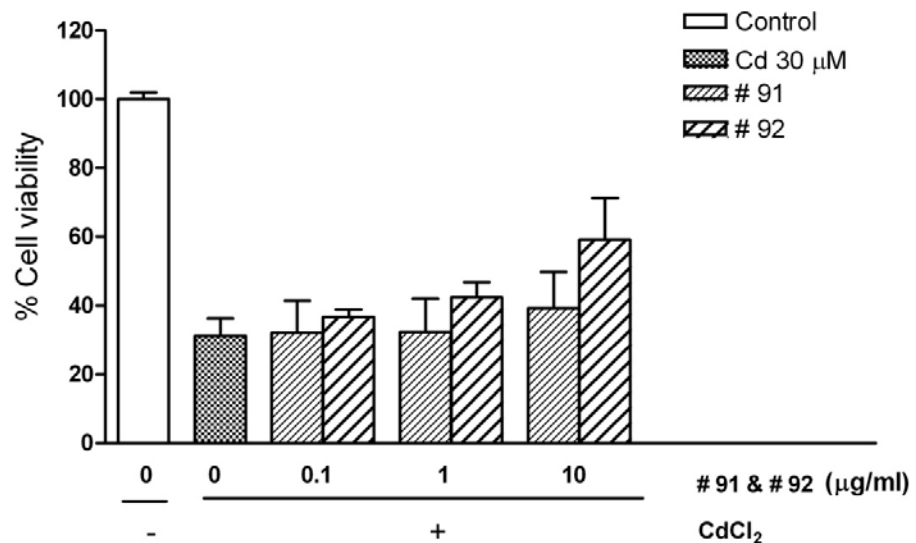
ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อใช้แคดเมียมความเข้มข้น 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารจากว่านชักมดลูก #92 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเป็นพิษของแคดเมียมความเข้มข้น 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้โดยเพิ่ม % cell viability เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว ในขณะที่ #91 ไม่มีผลลดความเป็นพิษของแคดเมียมในขนาด 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มความเป็พิษ (รูปที่ 7, 8)



รูปที่ 6 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.



รูปที่ 7 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.

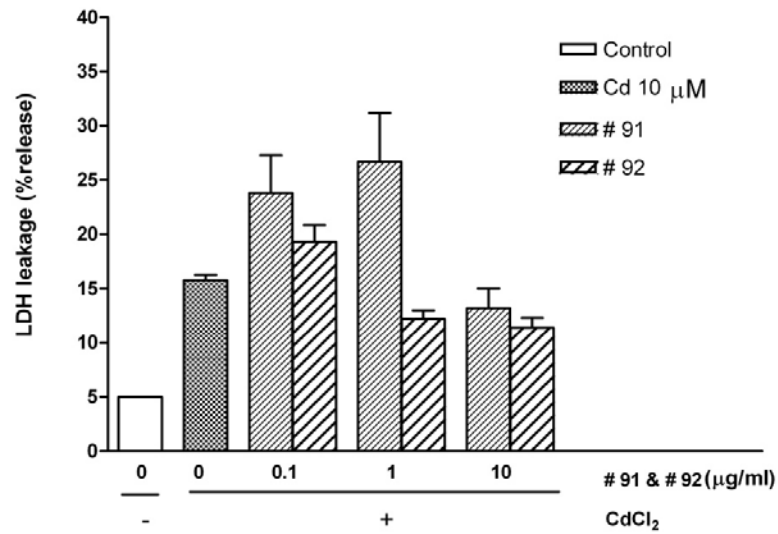


รูปที่ 8 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.

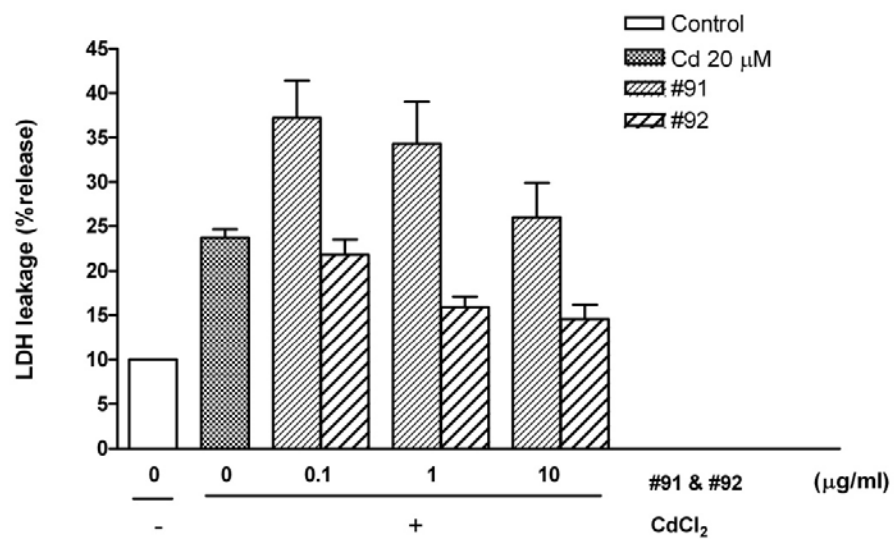
เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสารจากวุ้นชั้กมดลูกความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้น 18 ชั่วโมง บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg เพื่อเก็บสารน้ำเหนือเซลล์ (supernatant) มาทำปฏิกิริยากับ pyruvate และ NADH ผลจากปฏิกิริยาจะได้ NAD^+ วัดการเปลี่ยนแปลงได้จากค่า OD ที่ 340 nm พบว่า สารจากวุ้นชั้กมดลูก #91 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเป็นพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้โดยลด % LDH leakage release เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว ในขณะที่ #91 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มเพิ่ม % LDH leakage release (รูปที่ 9)

สารจากวุ้นชั้กมดลูก #92 ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันความเป็นพิษของแคดเมียมความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้โดยลด % LDH leakage release ในขณะที่ #92 ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มเพิ่ม % LDH leakage release

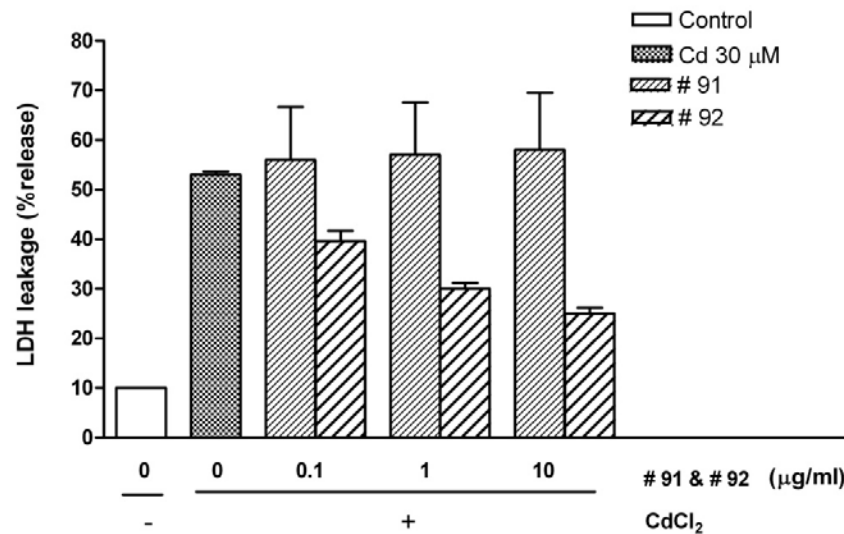
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมเป็น 20 ไมโครโมลาร์ พบว่า #91 เพิ่ม LDH leakage release ส่วน #92 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันและลดความเป็นพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้โดย ลด % LDH leakage release ลงมาเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ อย่างเดียว (รูปที่ 10) และเมื่อใช้แคดเมียมความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ พบว่า #91 มีแนวโน้มเพิ่ม % LDH leakage release ในขณะที่ #92 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเป็นพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ LLCPK₁ ได้โดยลด % LDH leakage release ลงมาเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ อย่างเดียว (รูปที่ 11)



รูปที่ 9 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ LDH assay เพื่อวัด % LDH leakage release.



รูปที่ 10 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ LDH assay เพื่อวัด % LDH leakage release.



รูปที่ 11 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ LDH assay เพื่อวัด % LDH leakage release.

- กลไกของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษจากแคดเมียม ศึกษาโดย Western blot analysis เพื่อหา NF-κB, IκB-α และ c-Fos

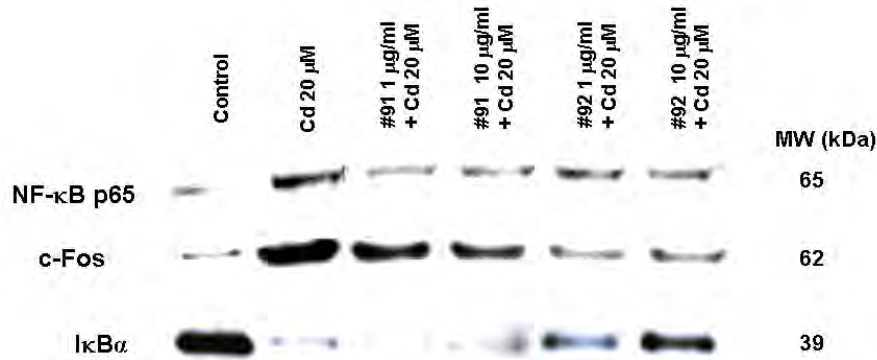
Nuclear factor-κB (NF-κB) คือ transcription factor family ที่ควบคุมเกี่ยวกับ cell function ต่างๆ ในภาวะปกติ NF-κB อยู่ในไซโตซอล ส่วนใหญ่ประกอบด้วย p50 และ p65 subunits รวมอยู่กับ inhibitory of kappa B (IκB) การถูกกระตุ้นจะทำให้เกิด phosphorylation ของ IκB โดย IκB kinase (IKK) และเกิดการปล่อย NF-κB เข้าสู่นิวเคลียส ไปจับกับ consensus sequence และเริ่มต้น transcription ของ gene ต่างๆ

เพื่อศึกษาว่าการเกิดพิษของแคดเมียมและ/หรือฤทธิ์ในการป้องกันพิษของสารจากว่านชักมดลูก มีความเกี่ยวข้องกับ NF-κB pathway หรือไม่ plate LLCPK₁ 5x10⁵ ใน 6-well plate แบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากว่านชักมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 1, 2, 4, 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ตูด media ทั้ง ล้างด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysis buffer แยกส่วนไซโตซอลและนิวเคลียส ไซโตซอลใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา IκBα ส่วนของนิวเคลียสใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา NF-κB แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง (50 ไมโครกรัม) ด้วย 10% SDS-PAGE ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง Transfer โปรตีนที่ถูก

แยกจาก gel มาที่ PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA. Block membrane ด้วย 5% nonfat milk ใน Tris-buffered saline (TBS) ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ β -actin ใน 5% nonfat milk TBS เป็นเวลามากกว่า 18 ชั่วโมง หรือ overnight ที่ 4° C ล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้ง incubate กับ secondary antibody ใน 5% nonfat milk TBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง incubate กับ SuperSignal West Pico Substrate เป็นเวลา 5 นาที ประกบกับฟิล์มใน film cassette ถ้ามีโปรตีนของ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ β -actin อยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่นำมาทดสอบ ก็จะปรากฏเป็นแถบให้เห็นชัดเจนซึ่งสามารถวัดค่าความหนาแน่นได้ด้วย densitometer จากการทดลองพบว่าสารจากวุ้นชั้กมดลูก #92 ในความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มป้องกันพิษจากแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ไซโตซอล #92 ทำให้แถบโปรตีนของ I κ B- α เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว และที่นิวเคลียส #92 ทำให้แถบโปรตีนของ NF- κ B ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าการเกิดพิษต่อเซลล์ LLCPK₁ ของแคดเมียมและกลไกการป้องกันพิษของสารจากวุ้นชั้กมดลูกมีแนวโน้มว่าจะเกิดผ่าน I κ B- α , NF- κ B pathway

c-Fos เป็นโปรตีนที่ถอดรหัสมาจาก c-fos gene สมาชิกของ immediate early genes. c-Fos เป็นองค์ประกอบของ transcription factor AP-1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ ได้แก่การแบ่งตัวและ apoptosis และเพื่อศึกษาว่าการเกิดพิษของแคดเมียมและ/หรือฤทธิ์ในการป้องกันพิษของสารจากวุ้นชั้กมดลูก มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis หรือไม่ plate LLCPK₁ 5x10⁵ ใน 6-well plate แบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากวุ้นชั้กมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 1, 2, 4, 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ดูด media ทิ้ง ล้างด้วย PBS ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ RIPA lysis buffer ให้ได้ whole cell lysate สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา c-Fos

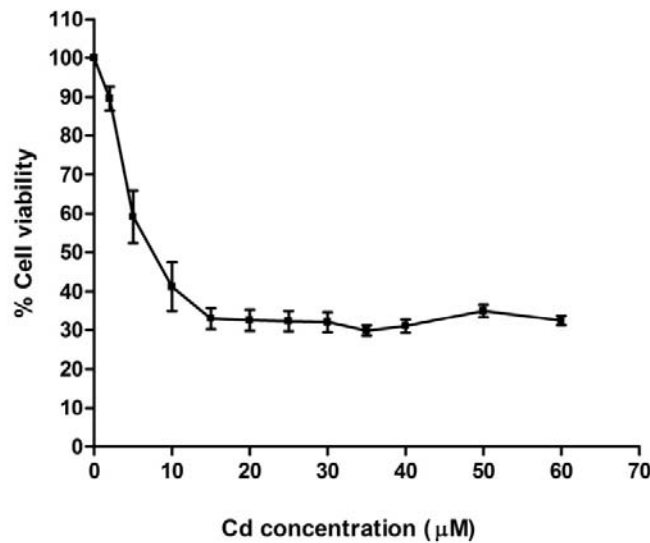
พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่ให้ผลของแถบโปรตีนชัดเจนที่สุด คือ 2 ชั่วโมง และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลที่เป็นแถบโปรตีนของ I κ B- α และ NF- κ B ปรากฏดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงแถบโปรตีนของ $I\kappa B-\alpha$, $NF-\kappa B$ และ $c-Fos$ ที่เป็นผลจากการ pretreatment LLC PK₁ cells ด้วยสารสกัดจากชั่งมดลูก # 91 และ # 92 ขนาด 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนได้รับแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลยและที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว

- ขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ Jurkat cell line โดยใช้ MTT assay

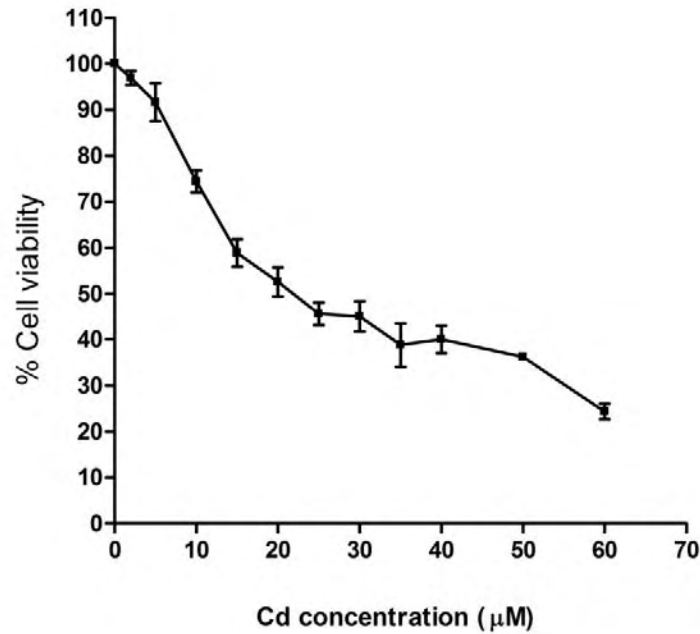
Plate Jurkat T cells ใน 96-well plate ด้วยจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จาก Standard curve คือ 1×10^5 cell/well โดยแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลาสัมผัสแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมน้ำ MTT solution (5 mg/ml) 20 ไมโครลิตร และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปั่น plate ด้วยเครื่อง centrifugation ที่ 800xg ดูดส่วน supernatant ออกทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม 100% DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm คำนวณหา % cell viability พบว่า ขนาดของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-10 ไมโครโมลาร์ โดยเป็นขนาดที่ทำให้ cell viability ลดลง 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับการสัมผัสกับแคดเมียม และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง



รูปที่ 13 แสดง dose-response curve ของ แคดเมียมต่อ % cell viability Jurkat T cells

- ขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ U937 cell line โดยใช้ MTT assay

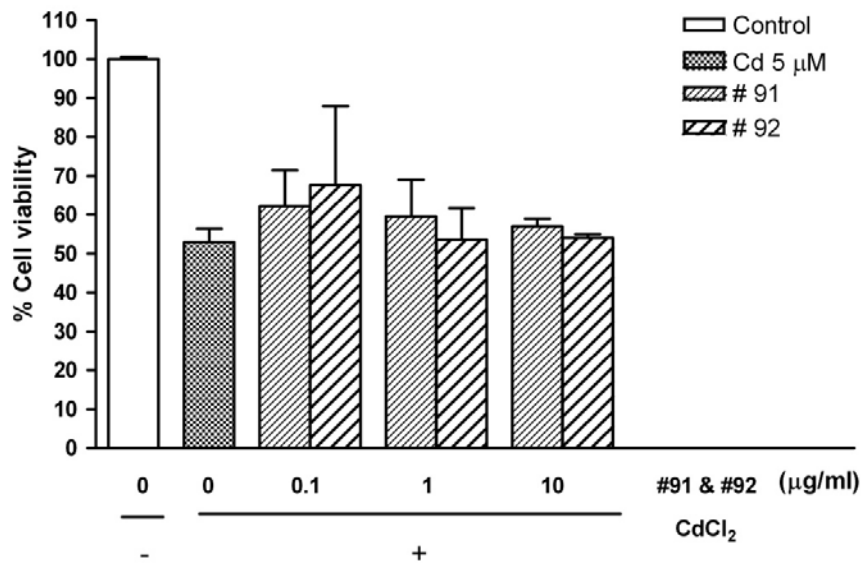
Plate U937 cells ใน 96-well plate ด้วยจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จาก Standard curve คือ 1×10^5 cell/well โดยแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับ แคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลาสัมผัสแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมน MTT solution (5 mg/ml) 20 ไมโครลิตร และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปั่น plate ด้วยเครื่อง centrifugation ที่ 800xg ดูดส่วน supernatant ออกทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม 100% DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm คำนวณหา % cell viability พบว่า ขนาดของ แคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-30 ไมโครโมลาร์ โดยเป็นขนาดที่ทำให้ cell viability ลดลง 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับการสัมผัสกับแคดเมียม และ ระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 18 ชั่วโมง



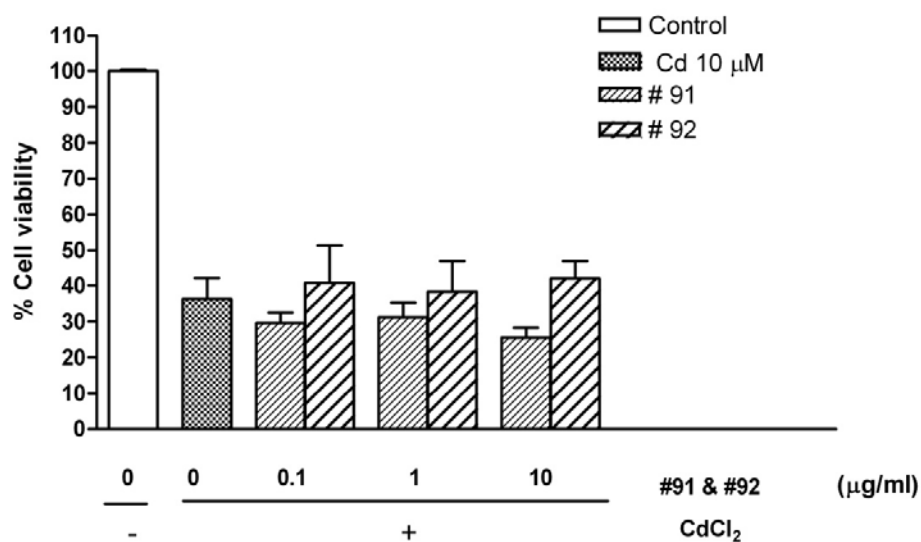
รูปที่ 14 แสดง dose-response curve ของ แคดเมียมต่อ % cell viability U937 cells

6. ผลของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อ Jurkat T cells

เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสารจากว่านชักมดลูกความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมขนาด 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้น 18 ชั่วโมงเติมสารละลาย MTT และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อหา % cell viability ผลการทดสอบพบว่า ทั้งสารจากว่านชักมดลูก #91 และ #92 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อ Jurkat T cells ของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 5 , 10 ไมโครโมลาร์ ได้



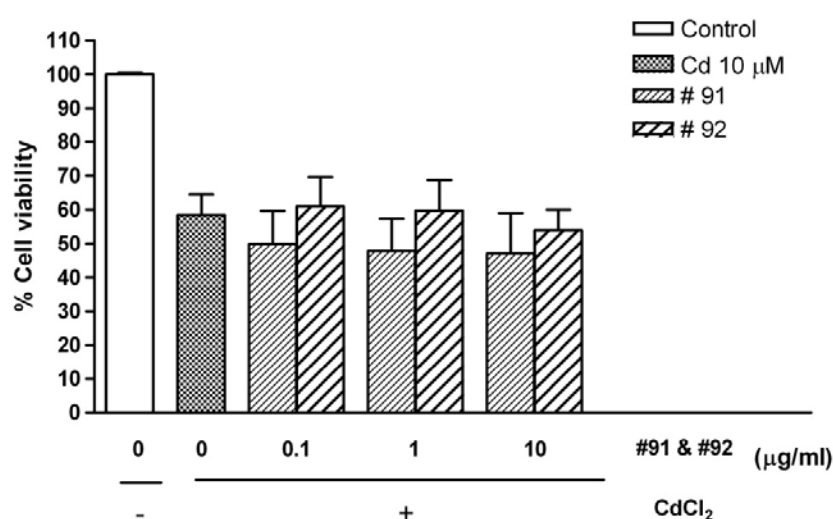
รูปที่ 15 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ใน Jurkat T cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.



รูปที่ 16 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ใน Jurkat T cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.

- ผลของสารจากว่านชักมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อ U937 cells

เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสารจากว่านชักมดลูกความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้น 18 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT และบ่มในตู้บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อหา % cell viability ผลการทดสอบพบว่า ทั้งสารจากว่านชักมดลูก #91 และ #92 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อ U937 cells ของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 (รูปที่ 17), 20 หรือ 30 ไมโครโมลาร์ ได้

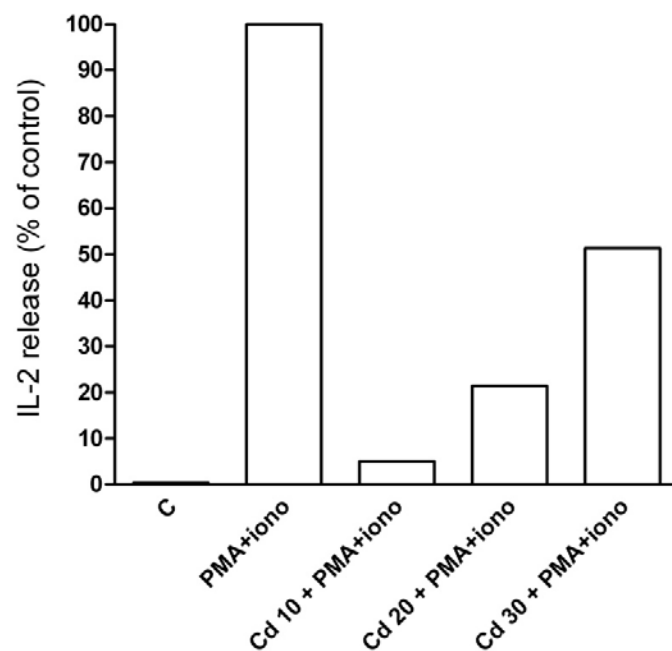


รูปที่ 17 แสดงผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ใน U937 cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว โดยใช้ MTT assay เพื่อวัด % cell viability.

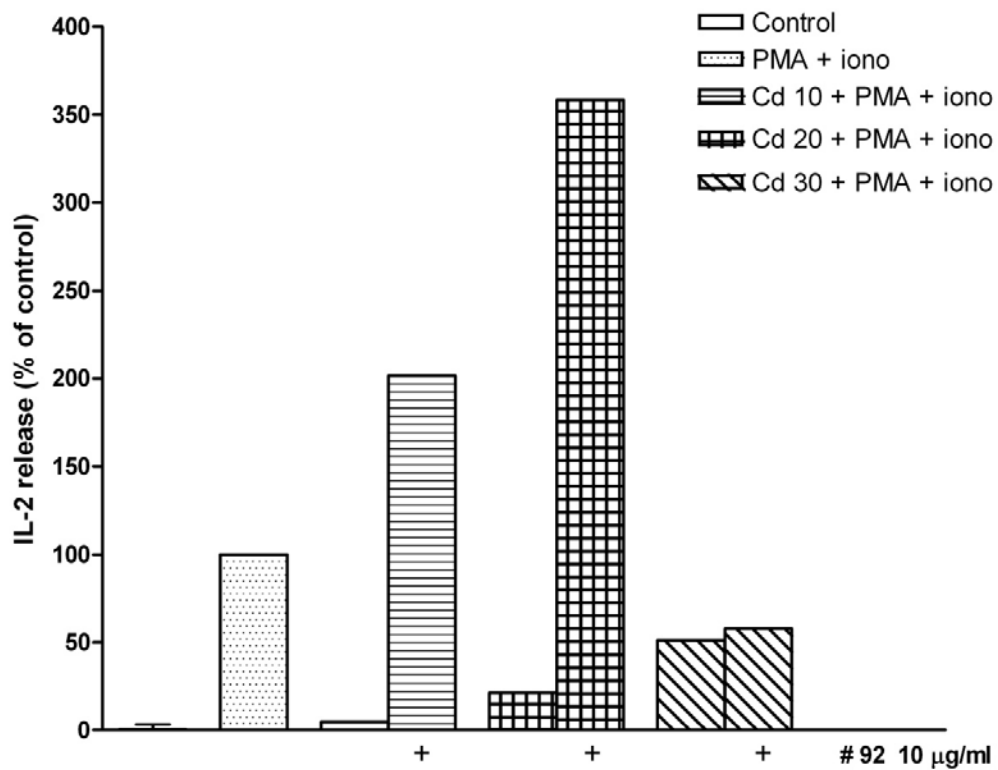
- ผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากว่านชักมดลูกต่อการหลั่ง cytokine IL-2 โดยใช้ Jurkat T cells

Plate cells จำนวน 5×10^5 cells/well ใน 24-well plate incubate 24 ชั่วโมง เติมสารละลายแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20, 30 ไมโครโมลาร์ ก่อนการกระตุ้นด้วย Phorbol myristate acetate (PMA) 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml โดยที่ในแต่ละ plate มีภาวะควบคุมที่มีเซลล์ปกติ และภาวะที่มีเฉพาะตัวกระตุ้นแต่ไม่มีแคดเมียม เพื่อเปรียบเทียบผล เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง นำ plate มาปั่นเพื่อให้สามารถเก็บน้ำเหนือเซลล์ (supernatant) ซึ่งมี

อาหารเลี้ยงเซลล์ปนอยู่กับสิ่งคัดหลั่งจากเซลล์ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บนี้มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 75 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลด้วยชุดตรวจ ELISA ของ cytokine IL-2 พบว่าแคดเมียมทุกความเข้มข้นมีผลลดการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่ถูกกระตุ้น (รูปที่ 18) และเมื่อทำการทดลองโดย Pretreatment ด้วยสารจากวุ้นชั่งมดลูก 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมแล้วจึงทำการกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml พบว่า สารวุ้นชั่งมดลูก # 92 ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่สัมผัสกับแคดเมียม 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ก่อนถูกกระตุ้น (รูปที่ 19)



รูปที่ 18 แสดงผลของแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นแต่ไม่ได้รับแคดเมียม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย

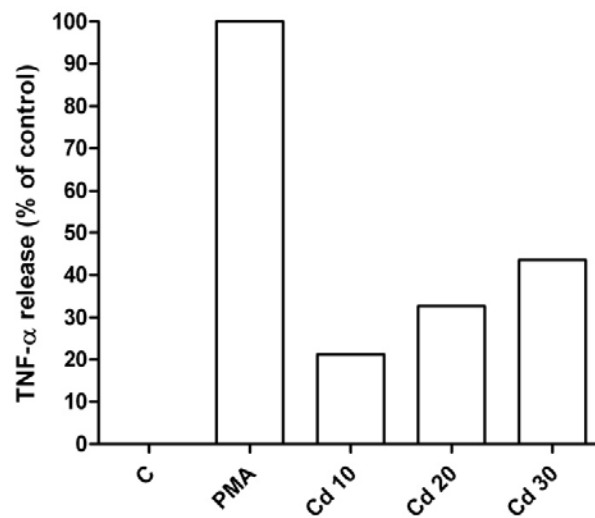


รูปที่ 19 แสดงผลจากการ pretreatment ด้วย # 92 ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการสัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง IL-2 จาก Jurkat T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และ ionomycin 500 ng/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นและไม่ได้/ได้รับแคดเมียม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย

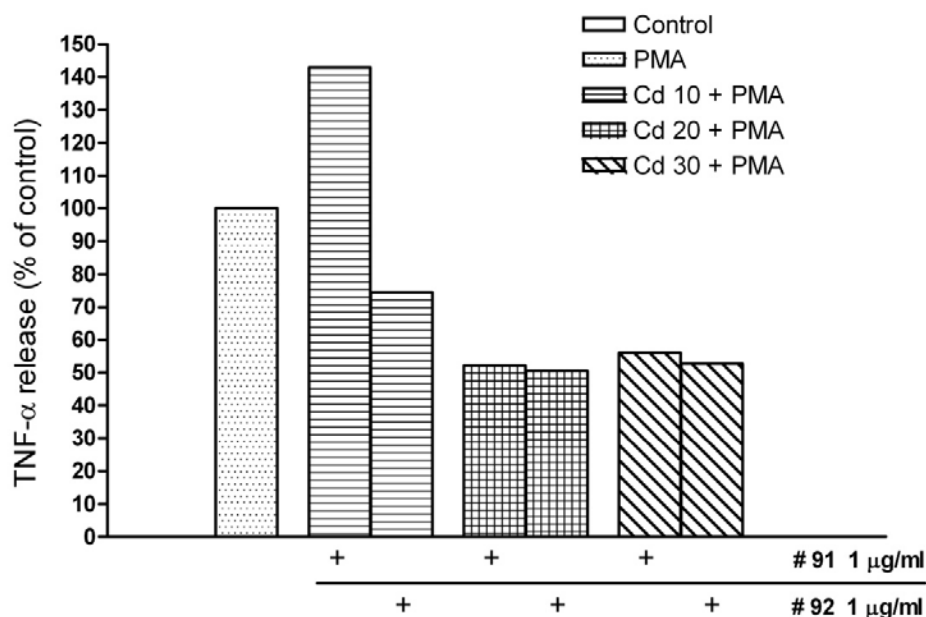
- ผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากवानชักมดลูกต่อการหลั่ง cytokine TNF- α โดยใช้ U937 cells

Plate cells จำนวน 1×10^5 cells/well ใน 24-well plate incubate 24 ชั่วโมง เติมสารละลายแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20, 30 ไมโครโมลาร์ ก่อนการกระตุ้นด้วย PMA) 25 ng/ml โดยที่ในแต่ละ plate มีภาวะควบคุมที่มีเซลล์ปกติ และภาวะที่มีเฉพาะตัวกระตุ้นแต่ไม่มีแคดเมียม เพื่อเปรียบเทียบผล เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง นำ plate มาปั่นเพื่อให้น้ำเหนือเซลล์ (supernatant) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ปนอยู่กับสิ่งคัดหลั่งจากเซลล์ ตรวจสอบผลด้วยชุดตรวจ ELISA ของ TNF- α พบว่าแคดเมียมทุกความเข้มข้นมีผลลดการหลั่ง TNF- α จาก U937 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA และเมื่อทำการทดลองโดย Pretreatment ด้วยสารจากवानชักมดลูก 1 ชั่วโมงก่อนให้สัมผัสกับแคดเมียมแล้วจึงทำการกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml พบว่า สารวานชัก

มดลูก # 92 ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดการหลั่ง $TNF-\alpha$ จาก U937 cells ที่สัมผัสกับ แคดเมียม 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ก่อนถูกกระตุ้น



รูปที่ 20 แสดงผลของแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง $TNF-\alpha$ จาก U937 cells เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย

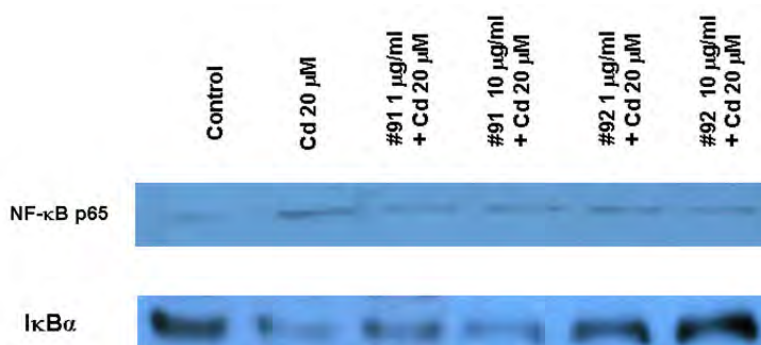


รูปที่ 21 แสดงผลจากการ pretreatment ด้วย #91 & #92 ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการสัมผัสกับแคดเมียมขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ต่อการหลั่ง TNF- α จาก U937 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA 25 ng/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นแต่ไม่ได้รับ แคดเมียม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย

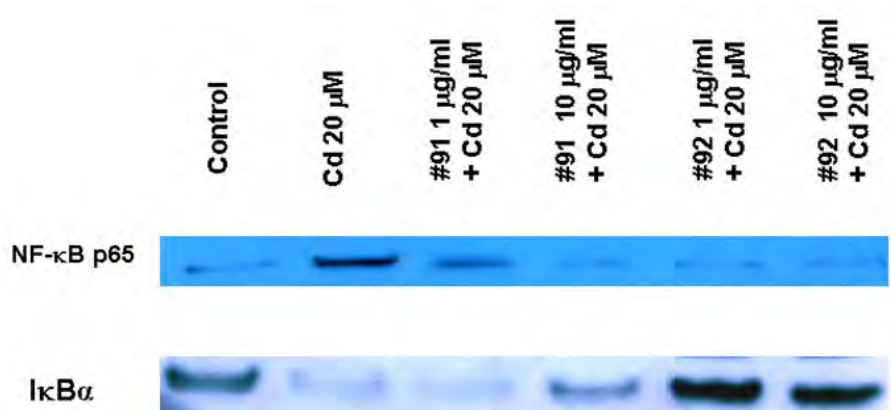
- กลไกของสารจากवानชักมดลูกในการป้องกันพิษจากแคดเมียม ศึกษาโดย Western blot analysis เพื่อหา NF- κ B, I κ B- α จาก Jurkat และ U937 cells

เพื่อศึกษาว่าการเกิดพิษของแคดเมียมและ/หรือฤทธิ์ในการป้องกันพิษของสารจาก วานชักมดลูก มีความเกี่ยวข้องกับ NF- κ B pathway หรือไม่ ทำโดย plate Jurkat หรือ U937 cells ใน 6-well plate แบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากวานชักมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับ แคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา บั่น plate ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 800xg ดูด media ทั้ง ล้างด้วย PBS ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysis buffer แยกส่วนไซโตซอลและนิวเคลียส ไซโตซอล ใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์หา I κ B α ส่วนของนิวเคลียสใช้สำหรับแยกโปรตีนเพื่อวิเคราะห์ หา NF- κ B แยกโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง (50 ไมโครกรัม) ด้วย 10% SDS-PAGE ภายใต้ กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง Transfer โปรตีนที่ถูกแยกจาก gel มา ที่ PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA. Block membrane ด้วย 5% nonfat milk ใน Tris-buffered saline (TBS) ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย Tris-buffered saline-

0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ β -actin ใน 5% nonfat milk TBS เป็นเวลามากกว่า 18 ชั่วโมง หรือ overnight ที่ 4° C ล้างด้วย Tris-buffered saline-0.1% Tween (TBS-T) 3 ครั้ง incubate กับ secondary antibody ใน 5% nonfat milk TBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง incubate กับ SuperSignal West Pico Substrate เป็นเวลา 5 นาที ประกบกับฟิล์มใน film cassette ถ้ามีโปรตีนของ NF- κ B หรือ I κ B- α หรือ β -actin อยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่นำมาทดสอบจากการทดลองพบว่าผลจากเซลล์ตัวอย่างทั้ง Jurkat และ U937 cells เป็นไปในทำนองเดียวกัน และใกล้เคียงกับที่พบในเซลล์ LLCPK1 ดังนั้น คือ สารจากวุ้นชักมดลูก #92 ในความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มป้องกันพิษจากแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ไซโตซอล #92 ทำให้แถบโปรตีนของ I κ B α เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว และที่นิวเคลียส #92 ทำให้แถบโปรตีนของ NF- κ B ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่ากลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ Jurkat และ U937 ของแคดเมียมและกลไกการป้องกันพิษของสารจากวุ้นชักมดลูกมีแนวโน้มว่าจะเกิดผ่าน I κ B- α , NF- κ B pathway



รูปที่ 22 แสดงแถบโปรตีนของ NF- κ B และ I κ B- α ที่เป็นผลจากการ pretreatment Jurkat T cells ด้วยสารสกัดวุ้นชักมดลูก # 91 และ # 92 ขนาด 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนได้รับแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลยและที่ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว



รูปที่ 23 แสดงแถบโปรตีนของ NF- κ B และ I κ B- α ที่เป็นผลจากการ pretreatment U937 cells ด้วยสารสกัดจากช้กมดลูก # 91 และ # 92 ขนาด 1, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนได้รับ แคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลยและที่ได้รับแคดเมียม อย่างเดียว

- ผลของแคดเมียมและฤทธิ์ในการป้องกันของสารจากช้กมดลูกต่อการหลั่ง cytokine TNF- α เมื่อเลี้ยง LLCPK₁ cells ร่วมกับ Jurkat T cells, หรือ ร่วมกับ U937 cells

จากการทดสอบหาแถบโปรตีน TNF- α ในขั้นตอนนี้ไม่เห็นแถบโปรตีนเลยจากทุก ตัวอย่าง ประกอบกับในระยะถัดมา U937 และ Jurkat cells มีปัญหาเรื่องการเจริญเติบโต ดังนั้นจึง ไม่สามารถทำการทดสอบต่อไปได้

- ผลของสารจากช้กมดลูกในการป้องกันพิษของแคดเมียมที่มีต่อระดับ glutathione ใน LLCPK₁ cells

เพื่อศึกษาว่าการเกิดพิษของแคดเมียมต่อ LLCPK₁ cells มีความเกี่ยวข้องกับการลด ระดับของ glutathione ภายในเซลล์ และสารจากช้กมดลูกสามารถลดการเกิดพิษได้โดยมี กลไกผ่านการเพิ่มระดับของ glutathione ทำการศึกษาโดย Plate LLCPK₁ cells 5×10^5 cells/well ใน 6 well-plate เลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมงแบ่ง well ต่างๆ เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสกับ แคดเมียมที่ความเข้มข้น 10, 20 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ได้รับสารจากช้กมดลูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรากฏว่าการให้สาร #92 ก่อนได้รับแคดเมียม ระดับ glutathione จะสูงกว่าเทียบกับเมื่อได้รับแคดเมียมอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 1&2

ตารางที่ 1 ผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อระดับของ glutathione ใน LLCPK₁ cells เมื่อได้รับพิษจากแคดเมียม 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (n=3)

Treatment	Glutathione (GSH) $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ protein
Control	11.00 ± 1.5
Cd 10 μM	5.02 ± 0.5
(091) 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 10 μM	4.11 ± 4.0
(091) 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 10 μM	5.08 ± 3.2
(091) 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 10 μM	6.11 ± 3.4
(092) 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 10 μM	7.16 ± 1.2
(092) 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 10 μM	9.81 ± 2.9
(092) 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 10 μM	10.18 ± 2.4

ตารางที่ 2 ผลของสารจากว่านชักมดลูกต่อระดับของ glutathione ใน LLCPK₁ cells เมื่อได้รับพิษจากแคดเมียม 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (n=3)

Treatment	Glutathione (GSH) $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ protein
Control	11.00 ± 1.5
Cd 20 μM	2.83 ± 2.2
(091) 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 20 μM	2.41 ± 5.3
(091) 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 20 μM	3.98 ± 4.2
(091) 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 20 μM	4.19 ± 2.4
(092) 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 20 μM	5.96 ± 3.2
(092) 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 20 μM	10.31 ± 3.9
(092) 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ + Cd 20 μM	12.18 ± 2.7

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต (CONCLUSION AND DISCUSSION)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของสารจากवानชักมดลูกที่สามารถป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อไต และต่อระบบภูมิคุ้มกันได้หรือไม่ และสามารถป้องกันการอักเสบของไตที่เกิดจากแคดเมียมไปมีผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้มีการหลั่ง inflammatory cytokine ได้หรือไม่ในการศึกษาได้ใช้เซลล์ที่เป็นตัวแทนของเซลล์จากท่อไตส่วนต้น (proximal tubule cells) ได้แก่ LLCPK₁ cells เซลล์ที่เป็นตัวแทนของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นตัวแทนของ T cells ได้แก่ Jurkat T cells และเซลล์ที่เป็นตัวแทนของ monocyte ได้แก่ U937 cells

สารจากवानชักมดลูกที่นำมาใช้ คือ #91: (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene) และ #92: (7-(3,4 dihydroxyphenyl)- 5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene) ซึ่งเป็นสารพวก diarylheptanoids ผลการศึกษาในส่วนของการป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ไต พบว่าสารทั้งสองโดยเฉพาะ #92 มีแนวโน้มลดหรือป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมได้บางส่วนโดยทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (cell viability) จากการวิเคราะห์ผลด้วย MTT assay ของเซลล์เพิ่มขึ้น และมีผลลดหรือป้องกันการรั่วของ LDH ออกจากเซลล์จากเมื่อเซลล์สัมผัสกับแคดเมียมอย่างเดียวก่อนกลไกบางส่วนมีความเกี่ยวข้องกับ NF-κB pathway โดยยับยั้ง NF-κB activation ผ่านการยับยั้ง IκB-α ทำให้ NF-κB ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อจับกับตำแหน่งเฉพาะบนสาย DNA ได้ และการป้องกันการเกิด apoptosis ผ่านการยับยั้งการสร้างโปรตีน c-Fos ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ transcription factor AP-1 ที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ ได้แก่ การแบ่งตัวและ apoptosis ในขณะที่สามารถป้องกันการลดลงของ glutathione ซึ่งมีบทบาทใน cellular defense ต่อภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์หลังจากที่เซลล์สัมผัสกับแคดเมียม ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารจากवानชักมดลูกโดยเฉพาะ #92 สามารถป้องกันหรือลดพิษของแคดเมียมต่อไตได้ ส่วน #91 นั้นผลไม่ชัดเจน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างมี -OH group น้อยกว่า จึงมีคุณสมบัติในการเป็น antioxidant น้อยกว่า

ผลการศึกษาในส่วนของการป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันพบว่าสารทั้งสองไม่สามารถป้องกันหรือลดพิษจากแคดเมียมที่ทำให้เซลล์ตายเมื่อวิเคราะห์ด้วย MTT assay และไม่ลดการรั่วของ LDH ออกนอกเซลล์ทั้งใน Jurkat T cells และ U937 cells แต่เมื่อศึกษาผลต่อการหลั่ง cytokine IL-2 จาก Jurkat T cells พบว่า #92 ทำให้มีการหลั่งของ cytokine IL-2 เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย PMA /ionomycin ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่เซลล์ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว

ปกติการกระตุ้น T cells โดยใช้ PMA และ ionomycin เมื่อเซลล์ได้รับโลหะหนัก ทำให้ทราบว่ากลไกมีความเกี่ยวข้องกับ tyrosine kinase pathway ซึ่งมีผลต่อการปรับ NFAT (nuclear factor activated T cell) activity และเมื่อศึกษาผลต่อการหลั่ง cytokine TNF- α จาก U937 cells พบว่า ทั้ง #91 และ #92 ลดการหลั่ง cytokine TNF- α จาก U937 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA เมื่อเปรียบเทียบกับที่เซลล์ได้รับแคดเมียมอย่างเดียว และเมื่อศึกษาความเกี่ยวข้องกับ NF- κ B pathway พบว่าสารยับยั้ง NF- κ B activation ผ่านการยับยั้ง I κ B- α ได้เช่นเดียวกับ LLCPK₁ cells จึงสามารถสรุปได้ว่าสารทั้งสองไม่สามารถป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันได้โดยตรง แต่มีผลต่อการปรับ (modulation) การหลั่ง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์อื่น ได้แก่ การเพิ่มการหลั่ง IL-2 จาก T cells และปรับการหลั่ง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ การลดการหลั่ง TNF- α จากเซลล์ monocyte จึงน่าจะเป็นผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกันถ้านำมาใช้ในการป้องกันพิษจากแคดเมียม อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารจากว่านชักมดลูกในการมีบทบาทป้องกันพิษของแคดเมียมนั้น น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้นโดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

สำหรับการศึกษาว่าสารจากว่านชักมดลูกสามารถป้องกันการอักเสบของไตที่เกิดจากแคดเมียมไปมีผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้มีการหลั่ง inflammatory cytokine ได้หรือไม่จากการเลี้ยงเซลล์ได้ร่วมกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันนั้น ไม่สามารถดำเนินการทดลองต่อได้ เนื่องจากเกิดปัญหาดังที่กล่าวในวิธีการทดลองแล้ว แต่จากผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารจากว่านชักมดลูกในเซลล์ภูมิคุ้มกันทั้งใน Jurkat T cells และ U937 cells แล้วมีผลยับยั้ง NF- κ B pathway ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้าง inflammatory cytokine ด้วย ดังนั้นจึงอาจคาดได้ว่าสามารถป้องกันการอักเสบของไตที่เกิดจากแคดเมียมไปมีผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้มีการหลั่ง inflammatory cytokine ได้ด้วย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

- ศึกษาสารบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกอื่นๆ ซึ่งมีมากมายหลายชนิด เพิ่มเติม
- ศึกษากลไกในแต่ละ signaling pathway นอกจาก NF- κ B pathway เนื่องจากแคดเมียมมีกลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ได้หลาย pathway

เอกสารอ้างอิง

1. Aggarwal, B. B., A. Kumar, et al. (2003). "Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies." Anticancer Res **23**(1A): 363-98.
2. Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." Annu Rev Immunol **12**: 141-79.
3. Charital, Y. M., G. van Haasteren, et al. (2009). "A functional NF-kappaB enhancer element in the first intron contributes to the control of c-fos transcription." Gene **430**(1-2): 116-22.
4. Charoenwanthanang, P., S. Lawanprasert, et al. "Effects of Curcuma comosa on the expression of atherosclerosis-related cytokine genes in rabbits fed a high-cholesterol diet." J Ethnopharmacol **134**(3): 608-13.
5. Chen, L., T. Jin, et al. (2006). "Plasma metallothionein antibody and cadmium-induced renal dysfunction in an occupational population in China." Toxicol Sci **91**(1): 104-12.
6. Chen, L., T. Jin, et al. (2006). "Critical exposure level of cadmium for elevated urinary metallothionein--an occupational population study in China." Toxicol Appl Pharmacol **215**(1): 93-9.
7. Cohly, H. H., A. Taylor, et al. (1998). "Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury." Free Radic Biol Med **24**(1): 49-54.
8. Colombo, M., C. Hamelin, et al. (2004). "Differential effects of mercury, lead, and cadmium on IL-2 production by Jurkat T cells." Clin Immunol **111**(3): 311-22.
9. Descotes, J. (1992). "Immunotoxicology of cadmium." IARC Sci Publ(118): 385-90.
10. Exon, J. H. (1984). "The immunotoxicity of selected environmental chemicals, pesticides and heavy metals." Prog Clin Biol Res **161**: 355-68.
11. Gao, X., J. Kuo, et al. (2004). "Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro." Biochem Pharmacol **68**(1): 51-61.

12. Garcon, G., B. Leleu, et al. (2007). "Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: usefulness of alpha-glutathione S-transferase." Sci Total Environ **377**(2-3): 165-72.
13. Garcon, G., B. Leleu, et al. (2004). "Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium." J Occup Environ Med **46**(11): 1180-6.
14. Gennari, A., E. Cortese, et al. (2003). "Sensitive endpoints for evaluating cadmium-induced acute toxicity in LLC-PK1 cells." Toxicology **183**(1-3): 211-20.
15. Gopee, N. V., Q. He, et al. (2003). "Fumonisin B1-induced apoptosis is associated with delayed inhibition of protein kinase C, nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor alpha in LLC-PK1 cells." Chem Biol Interact **146**(2): 131-45.
16. Gothberg, A., M. Greger, et al. (2002). "Accumulation of heavy metals in water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in the Bangkok region, Thailand." Environ Toxicol Chem **21**(9): 1934-9.
17. Handler, J. S., F. M. Perkins, et al. (1980). "Studies of renal cell function using cell culture techniques." Am J Physiol **238**(1): F1-9.
18. Hemdan, N. Y., F. Emmrich, et al. (2006). "The in vitro immune modulation by cadmium depends on the way of cell activation." Toxicology **222**(1-2): 37-45.
19. Hsu, T. S., P. M. Yang, et al. (2009). "Attenuation of cadmium-induced necrotic cell death by necrostatin-1: potential necrostatin-1 acting sites." Toxicol Appl Pharmacol **235**(2): 153-62.
20. Hurtenbach, U., J. Oberbarnscheidt, et al. (1988). "Modulation of murine T and B cell reactivity after short-term cadmium exposure in vivo." Arch Toxicol **62**(1): 22-8.
21. Intapad, S., A. Suksamrarn, et al. (2009). "Enhancement of vascular relaxation in rat aorta by phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb." Vascul Pharmacol **51**(4): 284-90.
22. Jantaratnotai, N., P. Utaisinchaoen, et al. (2006). "Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia." Life Sci **78**(6): 571-7.

23. Jariyawat, S., P. Kigpituck, et al. (2009). "Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by *Curcuma comosa* Roxb. ethanol extract." J Nat Med **63**(4): 430-6.
24. Jitsanong, T., K. Khanobdee, et al. "Diarylheptanoid 7-(3,4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death." Toxicol In Vitro **25**(1): 167-76.
25. Karakaya, A., B. Yucesoy, et al. (1994). "An immunological study on workers occupationally exposed to cadmium." Hum Exp Toxicol **13**(2): 73-5.1.
26. Karin, M., Y. Yamamoto, et al. (2004). "The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development." Nat Rev Drug Discov **3**(1): 17-26.
27. Koller, L. D. (1979). "Effects of environmental contaminants on the immune system." Adv Vet Sci Comp Med **23**: 267-95.
28. Krocova, Z., A. Macela, et al. (2000). "The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro." Toxicol In Vitro **14**(1): 33-40.
29. Liu, J., Y. Liu, et al. (1994). "Nephrotoxicity of CdCl₂ and Cd-metallothionein in cultured rat kidney proximal tubules and LLC-PK1 cells." Toxicol Appl Pharmacol **128**(2): 264-70.
30. Liu, Y., S. P. Zhang, et al. (2007). "Cytoprotective effects of selenium on cadmium-induced LLC-PK1 cells apoptosis by activating JNK pathway." Toxicol In Vitro **21**(4): 677-84.
31. Mao, W. P., J. L. Ye, et al. (2007). "Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria." Toxicol In Vitro **21**(3): 343-54.
32. Marth, E., S. Jelovcan, et al. (2001). "The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations." Int J Occup Med Environ Health **14**(4): 375-86.
33. Matsuoka, M. and K. M. Call (1995). "Cadmium-induced expression of immediate early genes in LLC-PK1 cells." Kidney Int **48**(2): 383-9.
34. Matsuoka, M., B. Wispriyono, et al. (1997). "Induction of c-fos gene by mercury chloride in LLC-PK1 cells." Chem Biol Interact **108**(1-2): 95-106.

35. Miquel, J., A. Bernd, et al. (2002). "The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review." Arch Gerontol Geriatr **34**(1): 37-46.
36. Morales, A. I., C. Vicente-Sanchez, et al. (2006). "Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties." Food Chem Toxicol **44**(12): 2092-100.
37. Nakamura, S., Y. Qu, et al. (2008). "Structures of new monoterpenes from Thai herbal medicine *Curcuma comosa*." Chem Pharm Bull (Tokyo) **56**(11): 1604-6.
38. Nasuhara, Y., I. M. Adcock, et al. (1999). "Differential I κ B kinase activation and I κ B degradation by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human U937 monocytic cells. Evidence for additional regulatory steps in I κ B-dependent transcription." J Biol Chem **274**(28): 19965-72.
39. Olabarrieta, I., B. L'Azou, et al. (2001). "In vitro effects of cadmium on two different animal cell models." Toxicol In Vitro **15**(4-5): 511-7.
40. Ozaki, Y. (1990). "Antiinflammatory effect of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb, and its active principles." Chem Pharm Bull (Tokyo) **38**(4): 1045-8.
41. Pathak, N. and S. Khandelwal (2008). "Comparative efficacy of piperine, curcumin and picroliv against Cd immunotoxicity in mice." Biomaterials **21**(6): 649-61.
42. Piwocka, K., E. Jaruga, et al. (2001). "Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in Jurkat cells." Free Radic Biol Med **31**(5): 670-8.
43. Piyachaturawat, P., J. Charoenpiboonsin, et al. (1999). "Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters." J Ethnopharmacol **66**(2): 199-204.
44. Qu, Y., F. Xu, et al. (2009). "Sesquiterpenes from *Curcuma comosa*." J Nat Med **63**(1): 102-4.
45. Ramsewak, R. S., D. L. DeWitt, et al. (2000). "Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*." Phytomedicine **7**(4): 303-8.
46. Schoeters, G., E. Den Hond, et al. (2006). "Cadmium and children: exposure and health effects." Acta Paediatr Suppl **95**(453): 50-4.

47. Schoonbroodt, S. and J. Piette (2000). "Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways." Biochem Pharmacol **60**(8): 1075-83.
48. Shaikh, Z. A., T. T. Vu, et al. (1999). "Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants." Toxicol Appl Pharmacol **154**(3): 256-63.
49. Singh, S. and B. B. Aggarwal (1995). "Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]." J Biol Chem **270**(42): 24995-5000.
50. Sodsai, A., P. Piyachaturawat, et al. (2007). "Suppression by Curcuma comosa Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells." Int Immunopharmacol **7**(4): 524-31.
51. Suksamrarn, A., S. Eiamong, et al. (1997). "Phloracetophenone glucoside with choleric activity from Curcuma comosa." Phytochemistry **45**: 103-105.
52. Suksamrarn, A., M. Ponglikitmongkol, et al. (2008). "Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of Curcuma comosa: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation." Bioorg Med Chem **16**(14): 6891-902.
53. Suzuki, Y. J., M. Mizuno, et al. (1994). "Signal transduction for nuclear factor-kappa B activation. Proposed location of antioxidant-inhibitable step." J Immunol **153**(11): 5008-15.
54. Syljuasen, R. G., J. H. Hong, et al. (1996). "Apoptosis and delayed expression of c-jun and c-fos after gamma irradiation of Jurkat T cells." Radiat Res **146**(3): 276-82.
55. Tang, W., J. Xie, et al. (2006). "Protection of renal tubular cells against the cytotoxicity of cadmium by glycine." Toxicology **223**(3): 202-8.
56. Teeyakasem, W., M. Nishijo, et al. (2007). "Monitoring of cadmium toxicity in a Thai population with high-level environmental exposure." Toxicol Lett **169**(3): 185-95.
57. Thampithak, A., Y. Jaisin, et al. (2009). "Transcriptional regulation of iNOS and COX-2 by a novel compound from Curcuma comosa in lipopolysaccharide-induced microglial activation." Neurosci Lett **462**(2): 171-5.
58. Thevenod, F. (2003). "Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium." Nephron Physiol **93**(4): p87-93.

59. Thevenod, F. (2009). "Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be?" Toxicol Appl Pharmacol **238**(3): 221-39.
60. Tsangaris, G. T. and F. Tzortzatou-Stathopoulou (1998). "Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines." Toxicology **128**(2): 143-50.
61. Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-208.
62. Winuthayanon, W., P. Piyachaturawat, et al. (2009). "Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: biologic actions in vitro and in vivo indicate estrogen receptor-dependent mechanisms." Environ Health Perspect **117**(7): 1155-61.
63. Winuthayanon, W., K. Suksen, et al. (2009). "Estrogenic activity of diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. Requires metabolic activation." J Agric Food Chem **57**(3): 840-5.
64. Wispriyono, B., M. Matsuoka, et al. (1998). "Protection from cadmium cytotoxicity by N-acetylcysteine in LLC-PK1 cells." J Pharmacol Exp Ther **287**(1): 344-51.
65. Xie, J. and Z. A. Shaikh (2006). "Cadmium-induced apoptosis in rat kidney epithelial cells involves decrease in nuclear factor-kappa B activity." Toxicol Sci **91**(1): 299-308.
66. Xu, F., S. Nakamura, et al. (2008). "Structures of new sesquiterpenes from *Curcuma comosa*." Chem Pharm Bull (Tokyo) **56**(12): 1710-6.
67. Yadav, N. and S. Khandelwal (2006). "Effect of Picroliv on cadmium-induced hepatic and renal damage in the rat." Hum Exp Toxicol **25**(10): 581-91.
68. Yasni, S., K. Yoshiie, et al. (1993). "Dietary *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. increases mitogenic responses of splenic lymphocytes in rats, and alters populations of the lymphocytes in mice." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **39**(4): 345-54.
69. Yoneshima, Y., T. Ichiyama, et al. (2003). "Fosfomycin inhibits NF-kappaB activation in U-937 and Jurkat cells." Int J Antimicrob Agents **21**(6): 589-92.
70. Zhou, Y. J., S. P. Zhang, et al. (2009). "The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK(1) cells." Toxicol In Vitro **23**(2): 288-94.

ภาคผนวก (APPENDIX)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ยังไม่มีผลงานวิจัยที่พิมพ์ แต่กำลังดำเนินการเขียน Manuscript
ชื่อเรื่องและชื่อวารสารนานาชาติที่คาดว่าจะตีพิมพ์ได้ คือ

1.1 Effect of *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium-induced renal epithelial (LLCPK₁) toxicity เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Toxicology in Vitro หรือ เทียบเท่า

1.2 Effect of *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium toxicity in immune cells เพื่อตีพิมพ์ใน วารสาร International Immunopharmacology หรือเทียบเท่า

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 และ 10

2.2 เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

โดยใช้ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ มาพัฒนาการเรียนการสอนในวิชา

โครงการวิจัย

ของนิสิตระดับปริญญาตรี ในหัวข้อเรื่อง

- การศึกษาผลของสาร(3*R*) 1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol ในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน human monocytic U937 cells
- การศึกษาผลของสาร (3*R*) 1, 7-diphenyl-(4*E*, 6*E*)-4,6-heptadiene-3-ol ในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ตับ (human hepatoma, HepG2 cells)



Effect of *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium-induced renal epithelial cell (LLC-PK₁) toxicity



Sodsai, A.¹, Suksamran, A.², Piyachaturawat, P.³

1. Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhornnayok 26120, Thailand

E-mail: amornus@swu.ac.th

2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

3. Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

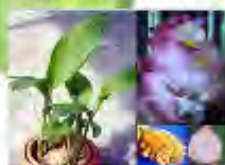
E-mail: scppy@mahidol.ac.th

Abstract

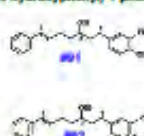
Cd, one of the most toxic metal in the environment and affects wide range of organ toxicities in human. Renal proximal tubular epithelium is the primary target of cadmium toxicity. It generates reactive oxidative species (ROS) and alters various anti-oxidative stress activities in the cells. In the present study, we aims to evaluate the protective effect of isolated compounds of *Curcuma comosa* on the cytotoxicity of Cd in renal proximal tubule epithelial cell line. *C. comosa* is a member of Zingiberaceae family which has traditionally been used in Thailand for treatment of inflammation. Pretreatment the cells with two diarylheptanoids (#91 and #92) of *C. comosa* showed a dose dependent decrease in the Cd-induced cellular damage as evaluated by either MTT assay and determination of LDH leakage. Both diarylheptanoids from *C. comosa* also suppressed Cd-induced c-Fos protein which plays a key role in activation of apoptosis and suppressed I κ B α degradation and activation of NF- κ B. These results suggest that two diarylheptanoids of *C. comosa* effectively provide the protection against Cd cytotoxicity in LLC-PK₁ cells. Its mechanism of action is partly due to the inhibition of NF- κ B activation.

Introduction

The rhizome of *Curcuma comosa* Roxb. commonly known as Waan Chak Modluk in Thai, has long been used to alleviate the inflammation in postpartum uterine bleeding, perimenopausal bleeding, and uterine inflammation. Recent study demonstrated that the diarylheptanoids, compound I (#91) and II (#92) of *C. comosa* reduced the expression of TNF- α and suppressed expression of I κ B kinase and activation of NF- κ B⁽²⁾



5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene

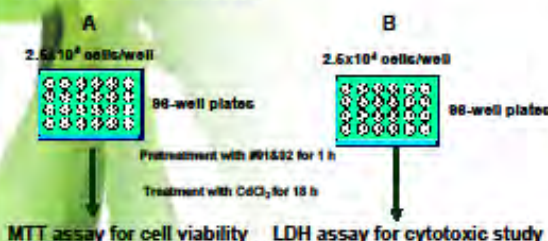


7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene

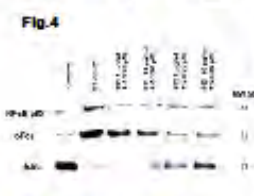
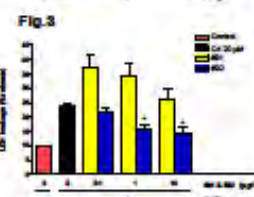
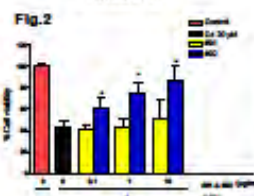
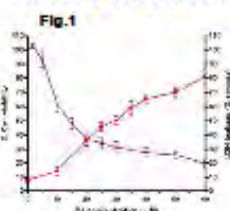
Objective

To evaluate the protective effect of isolated compounds of *Curcuma comosa* on the cytotoxicity of Cd in LLC-PK₁.

Materials & Methods



Results & Discussion



Conclusion



Depending on the incubation time and the dose of CdCl₂, Cell viability assayed by MTT decreased and LDH leakage increased. Based on this result, effects of compound from *C. comosa* on Cd cytotoxicity were examined in cells exposed to 20 μ M CdCl₂ for 18 h (fig.1)

When cells were preincubated with #92 at 0.1, 1 and 10 μ g/ml for 1 h, Cd-induced decrease of cell viability was suppressed by markedly (fig.2). Similar to these finding, Cd induced increase LDH leakage was suppressed by pretreatment for 1 h with 1 and 10 μ g/ml (fig.3).

Accumulated evidence has shown that Cd increased cellular ROS levels and the majority of studies suggest that Cd induced ROS formation triggers NF- κ B dependent trans-activation of oxidative stress genes^(1,2). Since phosphorylation of I κ B α by IKK is required for I κ B α degradation and optimal activation and translocation of NF- κ B p65 to the nucleus, the effect of compounds from *C. comosa* on Cd-induced changes in this pathway were evaluated. After exposure with CdCl₂ 20 μ M for 2 h, we found decreasing in level of I κ B α and increasing in level of NF- κ B p65. As shown in the fig.4, pretreatment with both compounds for 1 h before exposure to Cd, can suppress increased level of NF- κ B p65 while pretreatment with #92 suppress degradation of I κ B α . In addition, we also found that both compounds abolished increased c-Fos protein which has been shown to play role in the activation of apoptosis.

Our results show that two diarylheptanoids from *C. comosa*, especially #92 can prevent Cd-induced cellular damage and suppress accumulation of c-Fos protein. Possible sites of actions are (1) block I κ B degradation (2) interfere translocation of NF- κ B and (3) suppress expression of c-fos so inhibit Cd-induced apoptosis.

References

1. Schoonbroodt, S. and J. Piette (2000). "Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways." *Biochem Pharmacol* 60(8): 1075-83.
2. Sodsai, A., P. Piyachaturawat, et al. (2007). "Suppression by Curcuma comosa Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells." *Int Immunopharmacol* 7(4): 524-31.
3. Thevenod, F. (2009). "Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be?" *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 221-39.

Acknowledgements

This study is supported by Research Grant for New Scholar (co-funded by TRF and CHE). Document code = MRG5180016



The effect of active compounds from *Curcuma comosa* Roxb. on cadmium-induced nephrotoxicity and immunotoxicity

Sodcal, A.¹, Suksumran, A.², Piyachaturawat, P.³
¹ Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhornnayok 26120, Thailand
 E-mail: amornituz@swu.ac.th
² Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand
³ Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
 E-mail: scppy@mahidol.ac.th



Abstract

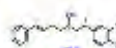
Cd, a one of the most toxic metal in the environment and affects wide range of organ toxicities in human. Renal proximal tubular epithelium and immune system are the primary targets of cadmium toxicity. In the present study, we aimed to evaluate the protective effect of isolated compounds of *Curcuma comosa* on the cytotoxicity of Cd in renal proximal tubule epithelial cell line (LLC-PK1) and the immunotoxicity in immune cell lines including human T cell leukemia, Jurkat and human pro-monocytic lymphoma, U937. *C. comosa* is a member of Zingiberaceae family which has traditionally been used in Thailand for treatment of inflammation. Pretreatment the cells with two diarylheptanoids (5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene and 7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene) of *C. comosa* showed a dose dependent decrease in the Cd-induced cellular damage as evaluated by either MTT assay and determination of LDH leakage. Both diarylheptanoids from *C. comosa* also suppressed Cd-induced c-Fos protein which plays a key role in activation of apoptosis and suppressed I κ B α degradation and activation of nuclear kappa B (NF- κ B). These results suggest that two diarylheptanoids of *C. comosa* effectively provide the protection against Cd cytotoxicity in LLC-PK1 cells. Its mechanism of action is partly due to the inhibition of NF- κ B activation. Pretreatment with two diarylheptanoids significantly protected Cd-induced decreasing interleukin 2 (IL-2) secretion in PMA/ ionomycin-stimulated Jurkat cells. The two diarylheptanoids also significantly decreased the release of tumor necrosis factor, TNF- α from Cd-PMA-stimulated U937 cells. Thus, in addition to the protective effect on the cytotoxicity of Cd in renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK1, the isolated compounds of *Curcuma comosa* tend to modulate Cd-induced abnormal cytokine secretion in stimulated-immune cells, Jurkat and U937.

Introduction

The rhizome of *Curcuma comosa* Roxb. commonly known as Waan Chak Modluk in Thai, has long been used to alleviate the inflammation in postpartum uterine bleeding, perimenopausal bleeding, and uterine inflammation. Recent study demonstrated that the diarylheptanoids, compound I (#91) and II (#92) of *C. comosa* reduced the expression of TNF- α and suppressed expression of I κ B kinase and activation of NF- κ B [9].



5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene



7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene

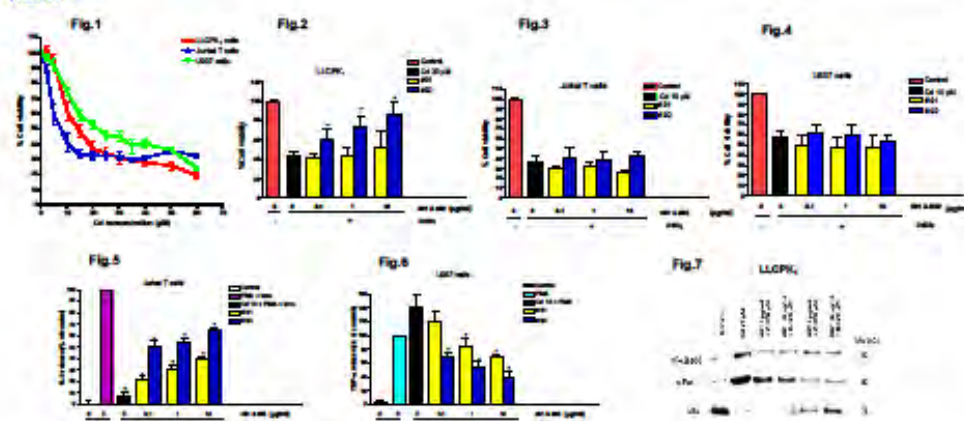
Objective

To evaluate the protective effects of isolated compounds of *Curcuma comosa* on the cytotoxicity of Cd in LLC-PK1, Jurkat T and U937 cells.

Materials & Methods

1. LLC-PK1 cells, Jurkat T cells, U937 cells
2. MTT assay, LDH assay, IL-2 ELISA kit, TNF- α ELISA kit, Western Blotting

Results



Viability of three cell types assayed by MTT after 18 h incubation with CdCl₂ were studied and the results shown that Cd induced decreasing viability of all cell types (Fig. 1). Based on these results, effects of compounds from *C. comosa* on Cd cytotoxicity were examined in LLC-PK1 cells exposed to 20 μ M CdCl₂, Jurkat T and U937 cells exposed to 10 μ M CdCl₂. When LLC-PK1 cells were preincubated with #91 or #92 at 0.1, 1 and 10 μ M for 1 h, Cd-induced decrease of cell viability was suppressed by markedly (Fig. 2) while decreased cell viability were not attenuated by two compounds in Jurkat T and U937 cells (Fig. 3&4). However, these two compounds significantly protected Cd-induced decreasing IL-2 secretion in PMA/ ionomycin-stimulated Jurkat cells and also significantly decreased the release of TNF- α from Cd-PMA-stimulated U937 cells (Fig. 5&6). After incubation of LLC-PK1 cells with CdCl₂ 20 μ M for 2 h, we found decreasing in level of I κ B α and increasing in level of NF- κ B p65. As shown in the Fig. 7, pretreatment with both compounds for 1 h before exposure to Cd, can suppress increased level of NF- κ B p65 while pretreatment with #92 suppress degradation of I κ B α . In addition, we also found that both compounds abolished increased c-Fos protein which has been shown to play role in the activation of apoptosis.

Conclusion

Our results show that two diarylheptanoids from *C. comosa*, especially #92 can prevent Cd-induced cellular damage and suppress accumulation of c-Fos protein. Possible sites of actions are (1) block I κ B degradation (2) Interfere translocation of NF- κ B and (3) suppress expression of c-Fos so inhibit Cd-induced apoptosis.

However, the detailed mechanism of the protective effects on Cd-induced decreased IL-2 secretion in PMA/ ionomycin-stimulated Jurkat T cells and Cd-induced increased TNF- α in PMA-stimulated U937 cells were not unclear and remained to be investigated.



References

1. Marth, E., Barth, S. and Jelovcan, S. (2000). "Influence of cadmium on the immune system. Description of stimulating reactions" *Curr Opin Immunol* 12: 40-4.
2. Schoonbrood, S. and J. P. P. (2000). "Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways" *Biochem Pharmacol* 60(8): 1075-83.
3. Sodcal, A., P. Piyachaturawat, et al. (2007). "Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells." *J Nat Immunopharmacol* 7(4): 524-51.
4. Thiravorn, F. (2000). "Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be?" *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 221-30.

Acknowledgements

This study is supported by Research Grant for New Scholar (co-funded by TRF and CHE).
Document code = MRG5180016



การศึกษาผลของสาร (3R) 1, 7-diphenyl-(4E, 6E)-4,6-heptadiene-3-ol ในการป้องกันพิษของแอดเมียมต่อเซลล์ตับ (human hepatoma HepG2 cells)

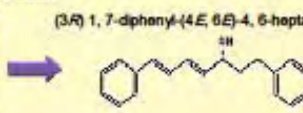
นักศึกษาระดับปริญญาตรี: ศนิงณีย์ ธรรมวงษ์, ณัฐสุดา คงหอม
อาจารย์ที่ปรึกษา: อ.ดร.อมรรัตน์ สดใส, ผศ.ดร.เบญจพร กิ่งจุฬเพชร
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

แอดเมียมเป็นโลหะหนักที่สามารถพบได้ในชีวิตประจำวัน ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายที่รุนแรงได้ในระยะยาว โดยเฉพาะตับ จึงได้ทำการวิจัยขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสาร (3R) 1, 7-diphenyl-(4E, 6E)-4, 6-heptadiene-3-ol (หรือ สาร 049) ซึ่งเป็นสารสกัดจากเหงือกขมิ้นชัน (*Curcuma comosa*) วงศ์ Zingiberaceae ในการป้องกันพิษของแอดเมียมต่อเซลล์ตับ (human hepatoma HepG2 cells) วิธีที่ใช้ตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) คือ MTT assay ความเข้มข้นของแอดเมียมที่นำมาใช้ทดสอบโดยการให้สัมผัสกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้ % cell viability ลดลงประมาณ 60% คือความเข้มข้นที่ 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนให้สัมผัสกับแอดเมียมที่ ความเข้มข้น 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สาร 049 ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ กับแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ ให้ค่า %cell viability เท่ากับ 63.47 ± 26.263 สูงกว่าเมื่อเทียบกับ % cell viability ของแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ และสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ กับแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า %cell viability 62.86 ± 24.866 สูงกว่าเมื่อเทียบกับ %cell viability ของแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ และสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ กับแอดเมียม 70 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า %cell viability 66.88 ± 26.389 สูงกว่าเมื่อเทียบกับ %cell viability ของแอดเมียม 70 $\mu\text{g/ml}$ ผลการศึกษาจึงสนับสนุนได้ว่าสารสกัดจากเหงือกขมิ้นชัน (หรือ สาร 049) ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนการให้สัมผัสกับแอดเมียมที่ความเข้มข้น 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ สามารถป้องกันการตายของเซลล์ HepG2 จากพิษของแอดเมียมได้บางส่วน อย่างไรก็ตามยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล และทำการศึกษากลไกในการป้องกันพิษของแอดเมียมต่อไปในอนาคต

บทนำ

เหงือกขมิ้นชัน (*Curcuma comosa*) วงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชที่นำมาใช้เป็นยาสมุนไพรหลาย โดยใช้ส่วนที่เป็นเหง้า เมื่อสกัดด้วย hexane แล้วนำไปผ่านกระบวนการแยกสารจะได้สารบริสุทธิ์ที่ชื่อว่า (3R) 1, 7-diphenyl-(4E, 6E)-4, 6-heptadiene-3-ol หรือ สาร 049 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบ สามารถใช้รักษา neurodegenerative diseases ได้ และกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมัน cholesterol ในเลือด นอกจากนี้ยังช่วยลดการอักเสบของหลอดเลือดในตับ และลดการตกตะกอนเกิดนิ่วในถุงน้ำดีอีกด้วย



(3R) 1, 7-diphenyl-(4E, 6E)-4, 6-heptadiene-3-ol

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเหงือกขมิ้นชัน (หรือ สาร 049) ในการป้องกันพิษของแอดเมียมต่อเซลล์ตับ (human hepatoma HepG2 cells)

วัสดุและวิธีการวิจัย

A

2.5x10⁴ cells

Treatment with CdCl₂ for 24 h

B

2.5x10⁴ cells

Pre-treatment 049 for 30 min

Treatment with CdCl₂ for 24 h

MTT assay for cell viability

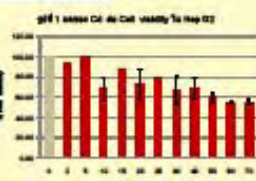
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Nucleoside diphosphate

Formazan $\leftrightarrow$ Dimethyl sulfoxide (DMSO)

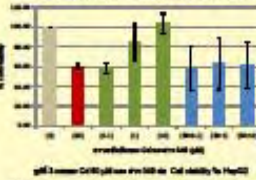
Plate reader spectrophotometer (570 nm)

ผลการวิจัย



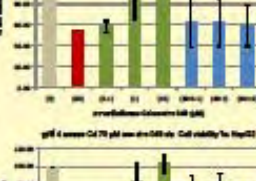
Bar chart 1: Effect of 049 on CdCl₂-induced cell viability. The y-axis represents % cell viability (0-100). The x-axis shows CdCl₂ concentrations (0, 60, 60, 70 $\mu\text{g/ml}$) and 049 concentrations (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$). The control (CdCl₂ 0) is at 100%. CdCl₂ 60 $\mu\text{g/ml}$ reduces viability to ~60%. 049 1 $\mu\text{g/ml}$ + CdCl₂ 60 $\mu\text{g/ml}$ shows higher viability (~63.47%) compared to CdCl₂ alone.

จากผลการทดลอง พบว่าค่า %cell viability ของเซลล์ HepG2 ของแอดเมียมที่ 12 ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าใกล้เคียงกัน 60% มากที่สุดโดยมีค่า %cell viability เท่ากัน 60.38 ± 2.867 , 64.96 ± 0.321 และ 64.86 ± 1.496 ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้น 70 $\mu\text{g/ml}$ มี %cell viability น้อยที่สุด แสดงว่าทำให้เซลล์ HepG2 ตามมากที่สุด (รูปที่ 1)



Bar chart 2: Effect of 049 on CdCl₂-induced cell viability at 60 $\mu\text{g/ml}$. The y-axis represents % cell viability (0-100). The x-axis shows 049 concentrations (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) with CdCl₂ at 60 $\mu\text{g/ml}$. The control (049 0) is at 100%. 049 1 $\mu\text{g/ml}$ shows higher viability (~63.47%) compared to CdCl₂ alone.

เมื่อสาร 049 ที่ 3 ความเข้มข้น มาทดสอบกับแอดเมียม ที่ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสาร 049 1 $\mu\text{g/ml}$ กับแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า %cell viability มากที่สุด คือ 63.47 ± 26.263 เมื่อเทียบกับ %cell viability ของแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ (60.38 ± 2.867) (รูปที่ 2) และที่ความเข้มข้นของสาร 049 0.1 $\mu\text{g/ml}$ กับความเข้มข้นของแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า %cell viability มากที่สุด คือ 62.86 ± 24.866 เมื่อเทียบกับ %cell viability ของแอดเมียม 60 $\mu\text{g/ml}$ (64.96 ± 0.321) (รูปที่ 3) และที่ความเข้มข้นของสาร 049 0.1 $\mu\text{g/ml}$ กับความเข้มข้นของแอดเมียม 70 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า %cell viability มากที่สุด คือ 66.88 ± 26.389 เมื่อเทียบกับ %cell viability ของความเข้มข้นของแอดเมียม 70 $\mu\text{g/ml}$ (64.86 ± 1.496) (รูปที่ 4)



Bar chart 3: Effect of 049 on CdCl₂-induced cell viability at 60 $\mu\text{g/ml}$. The y-axis represents % cell viability (0-100). The x-axis shows 049 concentrations (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) with CdCl₂ at 60 $\mu\text{g/ml}$. The control (049 0) is at 100%. 049 0.1 $\mu\text{g/ml}$ shows higher viability (~62.86%) compared to CdCl₂ alone.



Bar chart 4: Effect of 049 on CdCl₂-induced cell viability at 70 $\mu\text{g/ml}$. The y-axis represents % cell viability (0-100). The x-axis shows 049 concentrations (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) with CdCl₂ at 70 $\mu\text{g/ml}$. The control (049 0) is at 100%. 049 0.1 $\mu\text{g/ml}$ shows higher viability (~66.88%) compared to CdCl₂ alone.

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบพิษของแอดเมียมด้วยวิธี MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ HepG2 มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (%cell viability) เท่ากัน 60% พบว่า ความเข้มข้นของแอดเมียมที่มีค่า %cell viability ใกล้เคียงกัน 60% มากที่สุดคือ ที่ความเข้มข้น 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งที่ความเข้มข้น 70 $\mu\text{g/ml}$ มี %cell viability น้อยที่สุด แสดงว่าทำให้เซลล์ HepG2 ตามมากที่สุด เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนให้สัมผัสกับแอดเมียมที่ ความเข้มข้น 60, 60 และ 70 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถป้องกันการตายของเซลล์ HepG2 จากพิษของแอดเมียมได้บางส่วน อย่างไรก็ตามยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล และทำการศึกษากลไกในการป้องกันพิษของแอดเมียมต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- เชนฮัต ธนาภิลาญเจริญ, นงนารถ เมฆะจิณันต์, สุรัชต์ ฉิมวงษ์ โสตถิโยธิน และ ความเป็พิษของโลหะหนักแอดเมียม: โดยการศึกษา กษยวิทยาสาส์นการ; 2561
- Thamphithaka A, Jaisin Y, Meesarapee B, Chongthammakun S, et al. Transcriptional regulation of iNOS and COX-2 by a novel compound from *Curcuma comosa* in lipopolysaccharide-induced microglial activation. *Neuroscience Letters*. 2009; 462: 171-176.
- ภาวรัตน์ ปิยะฉัตรวิวัฒน์, อภิชาติ สุเคราะห์, วากรณ์ จันทร์วาทย์, ปรัชญ์ โกษากร และฉัตรวิวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. รานขมิ้นชันกับแนวทางการพัฒนาอาหารเพื่อลดไขมันในเลือด และลดการอักเสบของหลอดเลือด. (งานวิจัย): มหาวิทยาลัยมหิดล; 2561. 2 หน้า.

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับฉันทานุญาตให้ใช้จากอ.ดร.อมรรัตน์ สดใส และผศ.ดร.เบญจพร กิ่งจุฬเพชร และได้รับฉันทานุญาตจากสารสกัดจากเหงือกขมิ้นชัน 049 จาก ผศ.ดร.ภาวรัตน์ ปิยะฉัตรวิวัฒน์ และ รศ.ดร. อภิชาติ สุเคราะห์



การศึกษาผลของสาร(3R) 1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol ในการป้องกันพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน human monocyte U937 cells

ชัชกร นนทะวาสุธร , บุณยพร เคฉวนพิชาญ , วรพจน์ สดก , บุญพร คงจันทร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการต้านพิษของสาร (3R) 1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol หรือสาร 049 สารสกัดพืชจากเหงือกปลาหมอ (Curcuma comosa) ชนิด Zingiberaceae ในการป้องกันพิษของแคดเมียมที่มีต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน human monocyte U937 cells โดยวัดด้วยค่า % cell viability โดยใช้ MTT assay ผลเบื้องต้นในการทดสอบสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 ถึง 0.1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง % cell viability มีค่าเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ

บทนำ

แคดเมียมเป็นธาตุโลหะหนักที่มีอยู่มากในสิ่งแวดล้อมมากในอุตสาหกรรมเหมืองแร่ แต่ในทางกลับกันก็มีพิษต่อมนุษย์เช่นกัน ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์เป็นปราการด่านแรกในการป้องกันพิษของสารพิษต่าง ๆ ปัจจุบันมีการศึกษาการบำบัดพิษของแคดเมียมในสภาพแวดล้อมทางชีวภาพโดยใช้พืชในระบบนิเวศและแบบชีววิธี ซึ่งเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อลดพิษของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพโดยใช้พืชในระบบนิเวศและแบบชีววิธี ซึ่งเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อลดพิษของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพโดยใช้พืชในระบบนิเวศและแบบชีววิธี



เหงือกปลาหมอ (Curcuma comosa) และ (3R) 1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol หรือ สาร 049



Human monocyte U937 cells

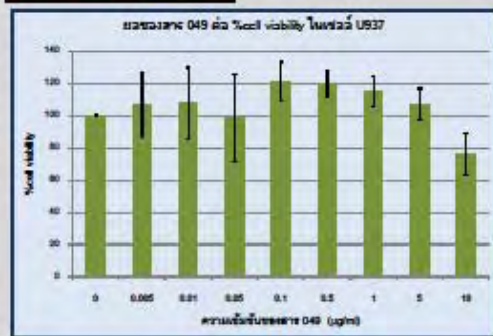
วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการต้านพิษของสาร 049 ที่มีค่า % cell viability ของเซลล์ บวกร
2. ศึกษาการต้านพิษของสาร 049 ที่มีค่า % cell viability ของเซลล์ บวกร โดยวัดค่า % cell viability โดยใช้ MTT assay
3. ศึกษาการต้านพิษของสาร 049 ที่มีค่า % cell viability ของเซลล์ บวกร โดยวัดค่า % cell viability โดยใช้ MTT assay

วิธีการวิจัย



ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย



การทดสอบการต้านพิษของสาร 049 ต่อเซลล์ U937

ผลการทดลองพบว่าสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 ถึง 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง % cell viability มีค่าเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบการต้านพิษของสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 ถึง 0.1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง % cell viability มีค่าเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับสาร 049 ที่ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ ผลการทดสอบ 049 ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลกระทบต่อเซลล์ที่มีค่า % cell viability ลดลงลงเหลือ 73.52% และ 107.10% ตามลำดับ

แหล่งอ้างอิง

1. สดก, ว. และคณะ. การศึกษาการต้านพิษของสาร 049 ที่มีค่า % cell viability ของเซลล์ บวกร. 2561. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
2. Sodal, A., Piyachetwong, P., Sophan, S., Sukkarn, A. and Vongkajul, M. Suppression by Curcuma comosa Rhiz. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. International Immunopharmacology, 7 (2007) 524-531.
3. Sukkarn, A. et al. Glycyflavanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of Curcuma comosa: isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16(2008) 5991-5997.
4. Thampitak, A. et al. Transcriptional regulation of iNOS and COX-2 by a novel compound from Curcuma comosa in lipopolysaccharide-induced microglial activation. Neuroscience Letters, 452 (2009) 171-175.

ติดต่อขอแปลภาษา

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี โดยได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ประจำปี 2561 จาก อ.ดร. กานทิณี ปิยะสุวรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี และ อ.ดร. วชิราวุธ สุระคำบุญ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

ประวัติผู้วิจัย

Vita

ชื่อ อาจารย์ ดร. อมรทัสน์ สดใส

Dr. Amorntus Sodsai

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3-1399-00075-12-2

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์

หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

สาขาวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์)

63 หมู่ 7 ถนนรังสิต-องครักษ์ จังหวัดนครนายก

26120

โทรศัพท์ 037-395094-5 ต่อ 1540

โทรสาร 037-395096

E-mail : amorntus@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ภ.บ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2533

ภ.ม. (เภสัชวิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2540

ปร.ด. (พิษวิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล

2549

ผลงานการตีพิมพ์

1. Sodsai, A., Piyachaturawat, P., Sophasan, S., Suksamrarn, A. and Vongsakul, M.,
Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in
phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. Int
Immunopharmacol. 2007. 7(4): p. 524-31.