

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

รายงานการวิจัย

การวิจัยบทบาทของว่านชักมดลูกต่อเนื้องอกมดลูก

Research on the effect of *Curcuma comosa* on uterine myoma

ผู้วิจัย

ผศ. ดร. พญ.อารีย์พรรณ โสภณสฤษดิ์สุข

ภาควิชา สูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์

โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ตีพิมพ์ พ.ศ. ๒๕๕๘

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความอนุเคราะห์จากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2556 และคณะกรรมการพิจารณาทุนการวิจัยทุกท่าน และขอขอบพระคุณ ศ.ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำตั้งแต่การเขียนโครงการวิจัย การดำเนินการวิจัย แนะนำการแก้ปัญหาอุปสรรคต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ นางสาววรรณวิสา ไวยพุด และนางสาวดวงพร แสงวิมล สำหรับการพากเพียรอุตสาหะ ทำให้การวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อวงการสาธารณสุขไทย และเพิ่มคุณภาพชีวิตให้แก่สตรีวัยทองในประเทศไทย

อารีย์พรรณ โสภณสฤษดิ์สุข

5 ตุลาคม 2558

บทคัดย่อ

ว่านชักมดลูก เป็นสมุนไพรไทยที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย มีการประชาสัมพันธ์ จำหน่ายผลิตภัณฑ์จากว่านชักมดลูกอย่างกว้างขวาง เพื่อที่จะรักษาและบรรเทาอาการต่างๆที่เกิดขึ้นทั้งสตรีในวัยเจริญพันธุ์และวัยหมดระดู ได้แก่ อาการปวดประจำเดือน กระชับช่องคลอด รักษาอาการตกขาวผิดปกติ ใช้หลังคลอดเพื่อให้มดลูกเข้าอู่ มดลูกอักเสบ ไปจนถึงบรรเทาอาการที่เกิดจากการหมดระดู เป็นต้น สารสกัดจากว่านชักมดลูกออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจน ได้แก่ ทำให้เยื่อบุมดลูกหนาตัว ช่วยป้องกันการสูญเสียของมวลกระดูก ลดระดับไขมันในเลือด และลดการตายของเซลล์ประสาท เป็นต้น เนื้องอกมดลูก (myoma uteri or uterine fibroid) เป็นเนื้องอกของกล้ามเนื้อมดลูกที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง (benign tumor) แต่อาจทำให้เกิดการเสียเลือดมากขณะมีระดู และขนาดก้อนที่โตอาจกดเบียดอวัยวะข้างเคียง อาทิ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ และท่อไตได้ การโตขยายขนาดของเนื้องอกมดลูกขึ้นกับการมีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นหากสตรีที่มีเนื้องอกมดลูกได้รับว่านชักมดลูกซึ่งอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาสมุนไพรซึ่งออกฤทธิ์เอสโตรเจนได้ อาจจะทำให้เนื้องอกเพิ่มขนาดจนทำให้เกิดอาการผิดปกติขึ้นได้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดว่านชักมดลูกและสารบริสุทธิ์หลักของว่านชักมดลูก (phytoestrogen, ASPP-049) ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ภาวะ apoptosis และการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนและโปรตีนของยีนเป้าหมายของเซลล์เนื้องอกมดลูกที่แยก และเพาะเลี้ยงจากเนื้องอกมดลูก และกล้ามเนื้อมดลูกที่อยู่บริเวณใกล้เคียงจากผู้ป่วย

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกและสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ไม่ได้มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนการแบ่งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกมดลูก ถึงแม้ว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อให้สารสกัดว่านชักมดลูกที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อซีซีก็ตาม แต่จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ชัดเจนจนมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อให้ความเข้มข้นของสารในขนาดที่สูงขึ้น จะมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนการแบ่งเซลล์ อย่างไรก็ตามขณะทำการวิจัยเพาะเลี้ยงเซลล์ ตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์เนื้องอก และเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกจะสูญหายไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นฤทธิ์ของสารสกัดว่านชักมดลูกและสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ที่ให้ผลในการศึกษานี้ไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านทางตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนของเซลล์

ดังนั้นการรับประทานว่านชักมดลูกในสตรีที่มีเนื้องอกมดลูกซึ่งยังมีตัวรับของฮอร์โมนอยู่ ควรใช้ด้วยความระวังเนื่องจากว่ามีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน

Abstract

Curcuma comosa (*C. comosa*) or Wan Chak Motluk is an indigenous medicinal herb which contains phytoestrogens. The products derived from this plant has gained high popularity and has been widely advertised and dispensed in the local market in Thailand for relief dysmenorrhea, strengthening vaginal mucosa, treating leucorrhea and endometritis, promoting uterine involution after baby delivery, and reducing vasomotor symptom. Crude extract of *C. comosa* exerts the estrogenic-like effects, for example, increase thickening of uterine mucosa, prevention of bone loss, reduction of abnormal high lipid level, and decrease death of neurons from injuries, etc. Myoma uteri or uterine fibroid is a benign tumor of the uterine myometrium. The tumor mass can cause heavy blood loss during menstruation and the large fibroid can press on the nearby pelvic organs, i.e. bladder and ureters. Estrogen hormone has ability to stimulate the growth of uterine fibroid. Since *C. comosa* possess the estrogenic activity, consumption of dietary supplement or herbal medicine containing *C. comosa* would enhance the growth of uterine fibroid mass. The objectives of the present study are to investigate the effects of the crude extract and pure compound, ASPP 049, of *C. comosa* on the cell proliferation, cell apoptosis, gene expression and protein production of estrogen target genes in smooth muscle cells isolated from uterine fibroid of patient.

The present study shows that crude extract and ASPP 049 did not increase the proliferation of fibroid smooth muscle cells. Although, the crude extract at a concentration of 10 ug/ml increased the proliferation but it did not reach statistical significance. Moreover, the higher concentrations of crude extract and ASPP 049 inhibited the proliferation of cells. However, loss of estrogen receptor (ER) was found during cell culture in the *in vitro* experiment. The expression of ER rapidly disappeared after enzyme collagenase digestion of the myometrium and myoma tissues during the establishment of primary cell culture. Therefore, the obtained stimulatory effect of *C. comosa* crude extract and ASPP 049 on the cell proliferation did not mediate through estrogen receptor. It should be used with caution in women with an intact ER function in uterus and uterine fibroid.

คำสำคัญ (Keyword) ของการวิจัย

ว่านชักมดลูก เนื้องอกมดลูก เอสโตรเจน การแบ่งเซลล์

Curcuma comosa, Myoma uteri, Fibroid, Estrogen, Cell proliferation

สารบัญเรื่อง Table of Contents

	หน้า
สารบัญตาราง (LIST OF TABLES)	7
สารบัญภาพ (LIST OF ILLUSTRATION)	8
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (LIST OF ABBREVIATIONS)	12
ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	13
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	16
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	16
4. ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ผล	21
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	42
6. บรรณานุกรม	34
ผู้รับผิดชอบงานวิจัย	37

สารบัญตาราง List of Tables

	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดข้อมูลทั่วไปของ primary cell line	19

สารบัญภาพ Lists of Illustration

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เพาะเลี้ยง (ก) จากกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก (ข) จากเนื้องอกมดลูก	22
รูปที่ 2 ก แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านชักมดลูก ต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อบ่มไว้กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูกปกติ เป็นเวลา 24-72 ชม.	22
รูปที่ 2 ข แสดงฤทธิ์ของสารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อบ่มไว้กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูกปกติ เป็นเวลา 24-72 ชม.	23
รูปที่ 3 ก แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านชักมดลูก ต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อบ่มไว้กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกของมดลูกเป็นเวลา 24-72 ชม.	23
รูปที่ 3 ข แสดงฤทธิ์ของ สารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อบ่มไว้กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกของมดลูกเป็นเวลา 24-72 ชม.	24
รูปที่ 4 ก แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จากมดลูกปกติ เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน	24
รูปที่ 4 ข แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จากเนื้องอกของมดลูก เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน	25
รูปที่ 4 ค แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จาก และ สารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์จากมดลูกปกติ เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน	25
รูปที่ 4 ง แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จากและ สารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์จากเนื้องอกของมดลูก เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน	26
รูปที่ 5 ก แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จากมดลูกปกติ	27

เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน

รูปที่ 5 ข	แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากวุ้นชั้กมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จากเนื้องอกของมดลูก เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน	28
รูปที่ 6	แสดงการแสดงออกของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) โดยการทำเทคนิค Western blot วันแรก (Day 0) ของการเพาะเลี้ยง	29
รูปที่ 7	แสดงการแสดงออกของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) โดยการทำเทคนิค Western blot passage ที่ 2	29
รูปที่ 8	แสดงการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และระหว่างเนื้อเยื่อเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR	30
รูปที่ 9 ก	แสดงการแสดงออกของยีน PGR เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และระหว่างเนื้อเยื่อเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR	31
รูปที่ 9 ข	แสดงการแสดงออกของยีน V-MYC เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และระหว่างเนื้อเยื่อเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR	31
รูปที่ 9 ค	แสดงการแสดงออกของยีน TFF1 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และระหว่างเนื้อเยื่อเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR	32
รูปที่ 9 ง	แสดงการแสดงออกของยีน CTSD เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และระหว่างเนื้อเยื่อเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR	32

รูปที่ 10 ก	แสดงการแสดงออกของยีน CTSD ที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) ในเซลล์จากกล้ามเนื้อดลูก	33
รูปที่ 10 ข	แสดงการแสดงออกของยีน CTSD ที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) ในเซลล์จากเนื้อเยื่ออกมดลูก	33
รูปที่ 11 ก	การแสดงออกของยีน EGFR ในเซลล์จากกล้ามเนื้อดลูก	34
รูปที่ 11 ข	การแสดงออกของยีน EGFR ในเซลล์จากเนื้อเยื่ออกมดลูก	34
รูปที่ 11 ค	การแสดงออกของยีน TNF beta ในเซลล์จากกล้ามเนื้อดลูก	35
รูปที่ 11 ง	การแสดงออกของยีน TNF beta ในเซลล์จากเนื้อเยื่ออกมดลูก	35
รูปที่ 12 ก	การแสดงออกของยีนตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ผิวเซลล์เกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้อเยื่ออกมดลูก (G protein estrogen receptor, GPER) ของเซลล์จากกล้ามเนื้อดลูก	36
รูปที่ 12 ข	การแสดงออกของยีนตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ผิวเซลล์เกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้อเยื่ออกมดลูก (G protein estrogen receptor, GPER) ของเซลล์จากเนื้อเยื่ออกมดลูก	36
รูปที่ 13	ภาวะ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก (ก) ภาพการตรวจวิเคราะห์ Flow cytometry ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก โดยย้อม Annexin V และ Propidium iodide (ข) ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (live) เซลล์ตาย (necrotic) และเซลล์ที่เริ่มตายแบบ apoptosis (early apoptosis)	38

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Lists of Abbreviations

ASPP-049	3 <i>R</i>)-1,7-diphenyl-(4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-4,6-heptadien-3-ol
Bcl2	B-cell lymphoma 2
<i>C.comosa</i>	<i>Curcuma comosa</i>
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
E2	estradiol
EGF	epidermal growth factor
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen response element
EtOH	ethanol
hER	human estrogen receptor
ICI	3-(isopropylamino)-1-[(7-methyl-4-indanyl)oxy]butan-2-ol
MTT assay	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay
MYC	myelocytomatosis viral oncogene
PR	progesterone receptor
PVDF	polyvinyl difluoride
RT PCR	Real-time polymerase chain reaction
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TNF	tumor necrotic factor

1. บทนำ : หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

สมุนไพรและสารสกัดจากสมุนไพรในตำรับยาไทย ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาบรรเทาอาการต่างๆ รวมถึงการใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ทั้งนี้เชื่อว่ายาสมุนไพรเป็นผลผลิตจากธรรมชาติที่ใช้กันมาช้านาน มีความปลอดภัย ซึ่งความเชื่อดังกล่าวน่าจะถูกต้องเพียงบางส่วน เนื่องจากสมุนไพรแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีมากมาย สารบางอย่างจากพืชมีประโยชน์ในการรักษาความผิดปกติ อาการเจ็บป่วยได้จริง แต่ก็ยังมีสารเคมีอีกหลายชนิดในพืช ที่ยังไม่ได้ได้รับการศึกษาวิจัยจนทราบผลการออกฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย ประสิทธิภาพของสมุนไพร และความปลอดภัยในการนำมาใช้ในคน ว่านชักมดลูกเป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมอย่างมาก และมีการโฆษณา ประชาสัมพันธ์ จำหน่ายผลิตภัณฑ์จากว่านชักมดลูกอย่างกว้างขวาง เพื่อที่จะรักษาและบรรเทาอาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นทั้งสตรีในวัยเจริญพันธุ์และวัยหมดระดู ได้แก่ อาการปวดประจำเดือน กระชับช่องคลอด รักษาอาการตกขาวผิดปกติ ใช้หลังคลอดเพื่อให้มดลูกเข้าอู่ มดลูกอักเสบ ไปจนถึงบรรเทาอาการที่เกิดจากการหมดระดู เป็นต้น จากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์และเภสัชวิทยามาระยะหนึ่ง พบว่า สารสกัดจากว่านชักมดลูกออกฤทธิ์ได้แบบฮอร์โมนเอสโตรเจน ได้แก่ ทำให้เยื่อบุผนังมดลูกหนาตัว ช่วยป้องกันการสูญเสียมวลของกระดูก ลดระดับไขมันในเลือด และลดการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายด้วยสารพิษ เป็นต้น โรคและความผิดปกติหลายชนิดในสตรีมีความเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเอสโตรเจน กล่าวคือฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจจะกระตุ้นให้เกิดโรค หรือเร่งทำให้โรคหรือความผิดปกติที่มีอยู่กำเริบมากขึ้น โรคหรือความผิดปกติดังกล่าวได้แก่ เนื้องอกมดลูก ภาวะเยื่อบุโพรงมดลูกที่อยู่ผิดที่ ช็อคโกแลตซิสต์ที่รังไข่ ถุงน้ำและมะเร็งเต้านม อาการประจำเดือนผิดปกติและภาวะเยื่อบุโพรงมดลูกหนาตัว (endometrial hyperplasia) มะเร็งโพรงมดลูก (endometrial cancer) และมะเร็งกล้ามเนื้อมดลูก (uterine sarcoma) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาถึงผลของว่านชักมดลูกต่อพยาธิสภาพของโรคต่างๆ ข้างต้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ก่อนที่จะนำว่านชักมดลูกไปใช้จริงทางคลินิก

เนื้องอกมดลูก uterine myoma หรือ fibroid เป็นเนื้องอกที่เกิดในชั้นกล้ามเนื้อมดลูก เป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง ไม่เป็นมะเร็ง (benign tumor) เกิดจากเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) ของกล้ามเนื้อมดลูกเพียงชนิดเดียว (monoclonal) มีการเจริญเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติไป ภายในก้อนเนื้องอกมดลูกมักพบปริมาณ extracellular matrix จำนวนมาก ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน collagen, fibronectin และ proteoglycan โดยที่พบโปรตีน collagen ชนิด I และ III เป็นจำนวนมาก และมีการจัดเรียงตัวของเส้นโปรตีน collagen (collagen fibril) ที่ผิดปกติ (Ferenczy et al., 1971; Stewart et al., 1994) จากข้อมูลในต่างประเทศ พบเนื้องอก Myoma ได้บ่อยถึงร้อยละ 20-50 ของสตรีวัยเจริญพันธุ์ (Verkauf, 1992) และอาจพบได้ถึงร้อยละ 70 เมื่อสตรีเข้าวัยหมดระดู (Baird et al., 2003) myoma เป็นเนื้องอกพบได้บ่อยที่สุดของเนื้องอกในอุ้งเชิงกราน และเนื้องอกของสตรี สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานความชุกของเนื้องอกมดลูก แต่คาดว่าความชุกของการเกิดเนื้องอก ไม่แตกต่างจากสตรีผิวขาวในต่างประเทศมากนัก สตรีที่มีเนื้องอกมดลูกที่มีขนาดใหญ่ หรือเนื้องอกที่บางตำแหน่งของมดลูก มักมีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งคือ ประจำเดือนมามาก หรือมีอาการจากการกดเบียดอวัยวะข้างเคียงของเนื้องอก ได้แก่ ปัสสาวะบ่อย ท้องผูก หรือถ่าย

อุจจาระลำบาก 1 ใน 3 ของสตรีที่ตรวจพบมีเนื้องอกมักจะมีอาการ และจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด ซึ่งก่อให้เกิดเป็นปัญหาสุขภาพหลักในสตรี และเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในขนาดใหญ่

สาเหตุที่แท้จริงของการเกิดเนื้องอกมดลูกนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานจากการวิจัยว่าการเจริญ ขยายขนาดของก้อนถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen dependent) (Bakas et al., 2008) จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ estrogen receptor (ER) ในเนื้องอกมดลูกสูงกว่าในกล้ามเนื้อมดลูก (Sadan et al., 1987; Tamaya et al., 1985) นอกจากนี้หลักฐานทางคลินิกแสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนมีผลต่อการเจริญของเนื้องอก กล่าวคือ ในเด็กผู้หญิงก่อนวัยเจริญพันธุ์ (prepubertal age) มักตรวจไม่พบเนื้องอกมดลูก ในขณะที่สตรีวัยเจริญพันธุ์ (reproductive age) มักพบเนื้องอกมดลูกบ่อยกว่า และเนื้องอกมักหดเล็กลงเมื่อทำการผ่าตัดเอารังไข่ออกไป (oophorectomy) หรือเมื่อเข้าสู่วัยหมดระดู (menopause) หรือได้รับยา gonadotropin releasing hormone agonist

ว่านขมิ้นมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb) เป็นพืชอยู่ในสกุล *Curcuma* ในวงศ์ขิง (Family Zingiberaceae) พวกเดียวกับขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ว่านขมิ้นมดลูกสามารถออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์ทดลอง เช่น สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกชั้นต่างๆให้มีการแบ่งตัว ทำให้เยื่อบุมีความหนาเพิ่มขึ้น มดลูกมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการหนาตัวขึ้นของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เกิด keratinization ของเซลล์ชั้นบนสุดของช่องคลอด และเกิด cornification ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นเป็นลักษณะที่จำเพาะของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Piyachaturawat et al., 1995a, 1995b) นอกจากนี้ว่านขมิ้นมดลูกสามารถกระตุ้นเซลล์ยีสต์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม โดยการจับตัวกับ ER α ของมนุษย์ในเซลล์ยีสต์ (Winuthayanon, Suksen, et al., 2009) รวมทั้งสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมายของเอสโตรเจนซึ่งมีส่วนของ estrogen responsive element (ERE) บน promoter (Suksamrarn et al., 2008; Winuthayanon, Piyachaturawat, et al., 2009) นอกจากนี้จากงานวิจัยพบว่า ว่านขมิ้นมดลูกช่วยป้องกันการสูญเสียมวลของกระดูก (Weerachayaphorn et al., 2011) และลดระดับไขมันในเลือด (Piyachaturawat et al., 1999; Piyachaturawat et al., 1997) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้หากว่าสตรีที่มีเนื้องอกมดลูกได้รับว่านขมิ้นมดลูก ซึ่งอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาสมุนไพรซึ่งออกฤทธิ์เอสโตรเจนได้ ก็อาจจะทำให้เนื้องอกเพิ่มขนาดจนทำให้เกิดอาการผิดปกติขึ้นได้ อย่างไรก็ตามด้วยว่านขมิ้นมดลูกมีฤทธิ์เอสโตรเจนอ่อนกว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนจากรังไข่มาก (ต่ำกว่าประมาณ 1000 เท่า) สารจากว่านขมิ้นมดลูกอาจจะแย่งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีอยู่ในร่างกาย อาจส่งผลลดการเจริญของเนื้องอกมดลูกได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติของสารสกัดและสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากว่านขมิ้นมดลูก *C. comosa* ต่อการแบ่งตัวและการเจริญของเซลล์เนื้องอกมดลูก และต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเป้าหมายของเอสโตรเจนในเซลล์เนื้องอกมดลูก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์ทางยาและความปลอดภัยในการใช้ว่านขมิ้นมดลูกและสารบริสุทธิ์จากว่านต่อไป

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดเป็นการใช้ผงแห้งของว่านร่วมกับพืชสมุนไพรอื่นๆ ในการวิจัยนี้จะได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากว่านด้วย จากการศึกษาการออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจนของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากว่านขมิ้นมดลูก พบว่าสารหลักเป็นสารกลุ่มไดเอริลเฮปทานอยด์ (Diarylheptanoids) สารที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ (3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol (ASPP-049) จากการที่สาร ASPP-049 มีฤทธิ์

คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน และมีศักยภาพในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ และอาจพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ นั้น ทำให้การศึกษาบทบาทของสารสกัดจากว่านและสาร ASPP-049 ต่อเนื้องอกมดลูก myoma ซึ่งเป็นภาวะที่พบได้บ่อยในสตรีวัยเจริญพันธุ์และสตรีวัยหมดระดู จึงเป็นสิ่งจำเป็น

1.1. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาบทบาทของสารสกัดจากว่าน และสาร ASPP-049 ที่แยกได้จากว่านชั้กมดลูกสายพันธุ์ *C. comosa* ซึ่งใช้ในผลิตภัณฑ์ที่บริโภคกันในปัจจุบัน ต่อการเพิ่มจำนวน (proliferation) และกระบวนการ apoptosis ของเซลล์เนื้องอกมดลูก และต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเป้าหมายของเอสโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการแบ่งเซลล์ของเซลล์เนื้องอกมดลูก โดยทำการศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกและเพาะเลี้ยงจากเนื้องอกมดลูก และกล้ามเนื้อมดลูกที่อยู่บริเวณใกล้เคียง

สารบริสุทธิ์จากว่านชั้กมดลูกที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

รายละเอียดของการดำเนินการวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาบทบาทของสารสกัดจากว่านชั้กมดลูก และสาร ASPP-049 สายพันธุ์ *C. comosa* ต่อการแบ่งตัว การเจริญของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากเนื้องอก myoma เทียบกับกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง
2. ศึกษาบทบาทของสารสกัดจากว่านชั้กมดลูก และสาร ASPP-049 สายพันธุ์ *C. comosa* ต่อภาวะ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากเนื้องอก myoma เทียบกับกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง
3. ศึกษาบทบาทของสารสกัดจากว่านชั้กมดลูก และสาร ASPP-049 สายพันธุ์ *C. comosa* ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเป้าหมายของเอสโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว การเจริญของเนื้องอกมดลูก

1.3. ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

สารสกัดว่านชั้กมดลูก และสารสำคัญ ASPP-049 มีฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ในขณะที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทส่งเสริมการเจริญของเนื้องอกมดลูก myoma uteri ดังนั้นการได้รับสารสกัดว่านชั้กมดลูกและสารสำคัญ ASPP-049 อาจจะทำให้เซลล์เนื้องอกแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขยายขนาดเนื้องอกได้ หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าว่านชั้กมดลูกซึ่งมีฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจนที่อ่อนกว่า อาจไปแย่งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนจากรังไข่ ทำให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่ มีผลลดการเจริญของเนื้องอกมดลูก การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ของว่านทั้งทางบวก และทางลบจึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญต่อผู้บริโภคอย่างยิ่ง

1.4. ขอบเขตงานวิจัยและวิธีวิจัย

การศึกษาบัพบาทของสารสกัดจากว่านชักมดลูกจากสายพันธุ์ *C. comosa* และสารสำคัญ ASPP-049 ต่อการเจริญแบ่งเซลล์ของเนื้องอกมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูกในหลอดทดลอง (*in vitro*) และต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ของเนื้องอกมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูก

2. บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่ผลิตจากรังไข่ โดยเฉพาะฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของเนื้องอก myoma ในขณะที่ฮอร์โมนที่มดลูกเองมีผลต่อการเจริญของเนื้องอก (local intrauterine factor) อย่างไรก็ตามระดับฮอร์โมนในกระแสเลือดกลับไม่มีผลต่อการเจริญของเนื้องอก (Blake, 2007) การศึกษาการแสดงออกของยีน ER เปรียบเทียบระหว่างเนื้องอกมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง พบระดับการแสดงออกของยีน ER ในเนื้องอกมดลูกสูงกว่ากล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียงกัน โดยที่เป็น ER ชนิด α มากกว่า β (Soules et al., 1982; Tamaya et al., 1985; Wilson et al., 1980) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอาจจะมีบทบาทในการเจริญของเนื้องอก myoma เนื่องจากการศึกษาพบว่าผลของการเพิ่มขยายเซลล์เนื้องอกมดลูก (mitogenic effect) ของฮอร์โมนเอสโตรเจน ส่วนหนึ่งผ่านทาง การเหนี่ยวนำของตัวรับ progesterone receptor (PR) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สารสังเคราะห์โปรเจสติน และ PR มีผลเพิ่มเซลล์เนื้องอกมดลูก (Rein et al., 1995) นอกจากนี้การศึกษาทั้งทางคลินิกและห้องทดลองพบว่า การให้ mifepristone ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านโปรเจสเตอโรนสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เนื้องอกได้ (Chen et al., 2006; Murphy et al., 1995)

มีรายงานว่า cytokine ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ และโปรตีนที่มีบทบาทในกลไกของ apoptosis มีส่วนในการเจริญของเนื้องอก myoma โปรตีน cytokine Epidermal growth factor (EGF) มีบทบาทควบคุมการเจริญของเนื้องอก โดยจากการศึกษาพบการแสดงออกของยีน EGF ในเนื้องอกมดลูกสูงกว่าในกล้ามเนื้อมดลูก ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออก (up regulation) ของตัวรับ EGF (EGF receptor) และโปรตีนที่คล้าย EGF (EGF-like protein) (Maruo et al., 2004) Tumor necrotic factor (TNF)- β เป็น cytokine ที่มีหลักฐานจากการศึกษาค่อนข้างชัดเจนทั้ง *in vivo* และ *in vitro* ว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงในเนื้องอกมดลูกเทียบกับกล้ามเนื้อมดลูก โดยที่การแสดงออกถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน (Catherino et al., 2004; Sozen et al., 2006) โปรตีน Bcl-2 ทำหน้าที่ต้านกระบวนการตายของเซลล์ (anti-apoptotic protein) ถูกพบว่าการแสดงออกของยีนในเนื้องอกมดลูกในระดับที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับกล้ามเนื้อมดลูก ดังนั้น Bcl-2 เพิ่มการรอดมีชีวิตของเซลล์โดยการป้องกันการตายจาก apoptosis ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีบทบาทส่งเสริมการเจริญของเนื้องอกมดลูกโดยการควบคุมผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน EGF และเพิ่มการแสดงออก (up regulating) ของยีน Bcl-2 (Maruo et al., 2004)

จากการศึกษาการออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากว่านชักมดลูกนั้น พบว่าสารหลักเป็นสารกลุ่มไดเอริลเฮปทานอยด์ (Diarylheptanoids) สารจากว่านที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ (3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol (ASPP-049) พบว่าสาร ASPP-049 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่จำเพาะที่เป็นเป้าหมายของฮอร์โมนเอสโตรเจน ได้แก่ ยีนของ pS2, progesterone receptor, MYC

และ cathepsin D ในเซลล์ที่มีตัวรับของฮอร์โมน โดยยีนดังกล่าวเหล่านั้นมี estrogen responsive elements (ERE) อยู่บน promoter สาร ICI 182,780 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งตัวรับเอสโตรเจนสามารถหักล้างฤทธิ์ของสารไดเอริลเฮปทานอยด์ได้ แสดงว่าการออกฤทธิ์ของสารไดเอริลเฮปทานอยด์นั้น ผ่านตัวรับเอสโตรเจน มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวรับ hER α นอกจากนี้ยังพบว่าสารไดเอริลเฮปทานอยด์มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง activation function-2 (AF2) ของ ER ซึ่งเป็น ligand dependent activation function โดยสารจะออกฤทธิ์กระตุ้นการแสดงออกของยีนได้นั้น ต้องอาศัยตำแหน่ง AF2 ของ ER โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยตำแหน่ง activation function-1 (AF1) ในการออกฤทธิ์ การศึกษาฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจนของสารไดเอริลเฮปทานอยด์ *in vivo* ในหนูทดลอง พบว่าสาร ASPP-049 เพิ่มน้ำหนักของมดลูก และเพิ่มการแสดงออกของ Ki67 ซึ่งบ่งถึงการเพิ่มจำนวนของ epithelial cell ของมดลูก (Winuthayanon, Piyachaturawat, et al., 2009) จากการที่สาร ASPP-049 มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน และฤทธิ์อื่นๆที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมาย จึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้

จิรพลและคณะ ได้มีการศึกษาถึงบทบาทของสารสกัดจากว่านชักมดลูกและสารสำคัญ ASPP-049 จากว่านต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกมนุษย์ *in vitro* โดยการตัดชิ้นส่วนของกล้ามเนื้อมดลูกจากสตรีตั้งครรภ์ ที่มารับการผ่าตัดคลอดบุตร กระตุ้นให้กล้ามเนื้อมดลูกเกิดการหดตัวด้วย oxytocin ในorgan bath chamber จากนั้นให้สารสกัดจากว่านชักมดลูก และ ASPP-049 ที่ขนาดความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่า สารสกัดและสาร ASPP-049 สามารถทำให้กล้ามเนื้อมดลูกคลายตัวตามขนาดของยา (dose dependent) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญคล้ายคลึงกับการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน การศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บ่งชี้ถึงแนวโน้มของการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารจากว่านชักมดลูกกับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมนุษย์

ในการวิจัยนี้จะได้ศึกษาบทบาทของสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ที่แยกได้จากว่านและสารสกัดจากว่านที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่จำหน่าย โดยจะทำการศึกษาถึงบทบาทของสารต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของมดลูก ซึ่งเป็นประเด็นที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อประชาชนผู้บริโภค

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาแบบทดลอง (experimental study) โดยศึกษาบทบาทของสารสกัดจากว่านชักมดลูกจากสายพันธุ์ *C. comosa* และสารสำคัญ ASPP-049 ต่อการเจริญแบ่งเซลล์ของเนื้องอกมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูกในหลอดทดลอง (*in vitro*) และต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ของเนื้องอกมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูก

3.1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านและสารบริสุทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์เนื้องอกมดลูกและประเมินระยะการแบ่งเซลล์เนื้องอกมดลูก

การศึกษานี้ทำการวิจัยในห้องทดลองด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกมดลูก และกล้ามเนื้อมดลูก เพื่อที่จะประเมินบทบาทของสารสกัดจากว่าน *C. comosa* และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ที่แยกได้จากว่านต่อการเจริญและแบ่งเซลล์ โดยทำการตัดชิ้นเนื้อจากเนื้องอกมดลูก myoma และกล้ามเนื้อมดลูกข้างเคียง เพื่อ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (uterine smooth muscle cells) ในห้องทดลอง หลังจากนั้นใส่สารดังต่อไปนี้

- กลุ่มที่ 1 สารสกัดจากว่าน
- กลุ่มที่ 2 สารบริสุทธิ์ ASPP-049
- กลุ่มที่ 3 เอสโตรเจน
- กลุ่มที่ 4 สารต้านเอสโตรเจน (ICI 182780)
- กลุ่มที่ 5 สารต้านเอสโตรเจน (ICI 182780) และสารสกัดจากว่าน
- กลุ่มที่ 6 สารต้านเอสโตรเจน (ICI 182780) และสารบริสุทธิ์ ASPP-049
- กลุ่มที่ 7 ไม่ใส่สารใดๆ เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

หลังจากนั้นประเมินการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยวิธี (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay) ทำการประเมินระยะการแบ่งเซลล์ (cell cycle) โดยการย้อม DNA ของเซลล์ด้วยสี 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) และประเมินด้วย Flow cytometry

3.2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านและสารบริสุทธิ์ต่อภาวะ apoptosis ของเซลล์เนื้องอกมดลูก

การศึกษานี้ทำการวิจัยในห้องทดลองด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกมดลูก และกล้ามเนื้อมดลูก เพื่อที่จะประเมินบทบาทของสารสกัดจากว่าน *C. comosa* และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ที่แยกได้จากว่าน ต่อภาวะ apoptosis ของเซลล์เนื้องอกมดลูก โดยที่ภายหลังจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เพาะเลี้ยงได้และให้ยาทดสอบตามข้อ 1 แล้วทำการย้อม DNA ของเซลล์ด้วย Hoechst dye จากนั้นใช้กล้อง confocal microscope ดูลักษณะนิวเคลียส ลักษณะของการตายแบบ apoptosis ของเซลล์

3.3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านและสารบริสุทธิ์ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนและโปรตีน nuclear receptor-ER α และ PR-B, EGF, TNF- β , Bcl2 และ MYC ในเซลล์เนื้องอกมดลูก

การศึกษานี้ทำการวิจัยด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเช่นเดียวกับ 1 และ 2 เพื่อที่จะประเมินบทบาทของสารสกัดจากว่าน *C. comosa* และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ที่แยกได้จากว่าน ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนและโปรตีน nuclear receptor-ER α และ PR-B, EGF, TNF- β , Bcl2 และ MYC ซึ่งทั้งหมดเป็นยีนเป้าหมายของฮอร์โมนเอสโตรเจน ภายหลังจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เพาะเลี้ยงได้และให้ยาทดสอบตามข้อ 12.1 แล้ว ทำการเก็บเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและโปรตีน

-วิธี การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ER α , PR-B, EGF, TNF- β , Bcl2 และ MYC โดยการสกัด RNA จากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบด้วย QIAGEN RNeasy columns จากนั้นเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้วิธี Reverse transcription นำ cDNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis โดยใช้โปรแกรม ABI PRISM 7500 Sequence Detection System and analysis software โดยยีนที่เป็นยีนควบคุมภายใน (endogenous control gene) ได้แก่ RPLP, GAPDH และ β -actin การศึกษานี้สามารถทำนายถึงกลไกการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของเนื้องอกมดลูกโดย สารสกัดจากว่าน *C.*

comosa และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 และผลของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์กล้ามเนื้อดลูกปกติเป็นเซลล์มะเร็ง

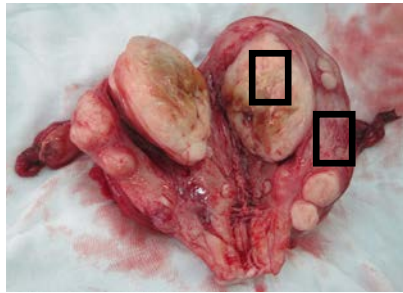
-วิธี การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน ER α , PR-B, EGF, TNF- β , Bcl2 และ MYC ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์โดยการย่อยเซลล์ เก็บ supernatant วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford assay แยกโปรตีนบนเจล SDS PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนบนเจลลงบน PVDF membrane ย้อมและวิเคราะห์โปรตีนด้วย antibody ทำการวิเคราะห์ผล การศึกษานี้ช่วยยืนยันผลการศึกษาที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนข้างต้น

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ทำการวิจัยที่

1. สำนักวิจัยวิชาการและนวัตกรรม คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี
2. ภาควิชาสูติศาสตร์ นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี
3. ภาควิชาสูติวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Flow Chart Research Methods



•

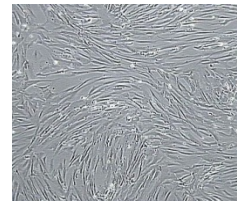
ตัดชิ้นเนื้อจากกล้ามเนื้อมดลูก
และเนื้อเยื่ออกมดลูก



ย่อยชิ้นเนื้อด้วย collagenase enzyme



เพาะเลี้ยง primary cell culture



Treatments (in DMEM/F12 without phenol red and charcoal strip serum)

- กลุ่มที่ 1 สารสกัดจากผงวุ้น
- กลุ่มที่ 2 สารบริสุทธิ์ ASPP-049
- กลุ่มที่ 3 เอสโตรเจน
- กลุ่มที่ 4 สารต้านเอสโตรเจน(ICI 182780)
- กลุ่มที่ 5 สารต้านเอสโตรเจน และ สารสกัดจากผงวุ้น
- กลุ่มที่ 6 สารต้านเอสโตรเจน และสารบริสุทธิ์ ASPP-049
- กลุ่มที่ 7 ไม่ใส่สารใดๆ เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

การเพิ่มจำนวนเซลล์และ
ระยะการแบ่งเซลล์

ภาวะ apoptosis

การแสดงออกของยีนเป้าหมายของเอสโตรเจน

- MTT assay
- ย้อม DNA ของเซลล์ด้วย DAPI
- Flow cytometry

- ย้อมนิวเคลียสด้วย
DAPI + Flow
cytometry

- ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน ER α , PR-B, EGF, TNF- β , Bcl2 และ MYC เปรียบเทียบระหว่าง SMCsc จากเนื้อเยื่ออกมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูก
- ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ Protein expression : ER α , PR-B, EGF, TNF- β , Bcl2 และ MYC

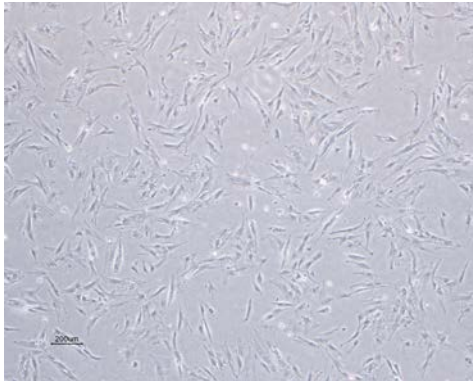
ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ผล

ในการวิจัยนี้ทั้งหมดใช้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกและเพาะเลี้ยงจากเนื้องอกมดลูก และกล้ามเนื้อมดลูกปกติที่อยู่บริเวณใกล้เคียง กล่าวคือเป็น primary cell จาก myometrium และ myoma จากมดลูก ดังรูปที่ 1ก และ 1ข โดยที่ได้เนื้อเยื่อจากผู้ป่วยจำนวนหลายคนมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด และสารบริสุทธิ์จากว่าน

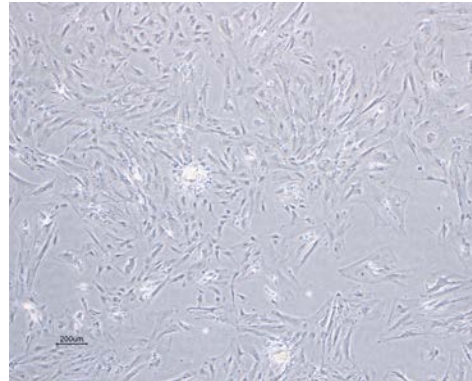
ตารางที่ 1 รายละเอียดข้อมูลทั่วไปของ primary cell line

Primary cell line	อายุของผู้ป่วย	ข้อบ่งชี้ที่ทำการผ่าตัด	ระยะของประจำเดือน (Menstrual Phase)
No. 1 HN4682181	57	Myoma uteri	Menopause
No. 2 HN 4827110	49	Myoma uteri c hypermenorrhea	Secretory phase
No. 3 HN4818036	49	Myoma	Secretory phase
No. 4 HN 4234833	53	Myoma uteri c hypermenorrhea	Secretory phase
No. 5 HN 3565128	48	Myoma	Proliferative phase
No. 6 HN 2604713	39	Myoma uteri c Hypermenorrhea	Proliferative phase
No. 7 HN 4907291	38	Myoma uteri	Atrophic (Hx of oral contraceptive pill use)
No. 8 HN 4964298	40	Myoma	Proliferative phase
No. 9 HN 3988358	39	Intramural myoma	Proliferative phase

รูปที่ 1 ก



รูปที่ 1 ข



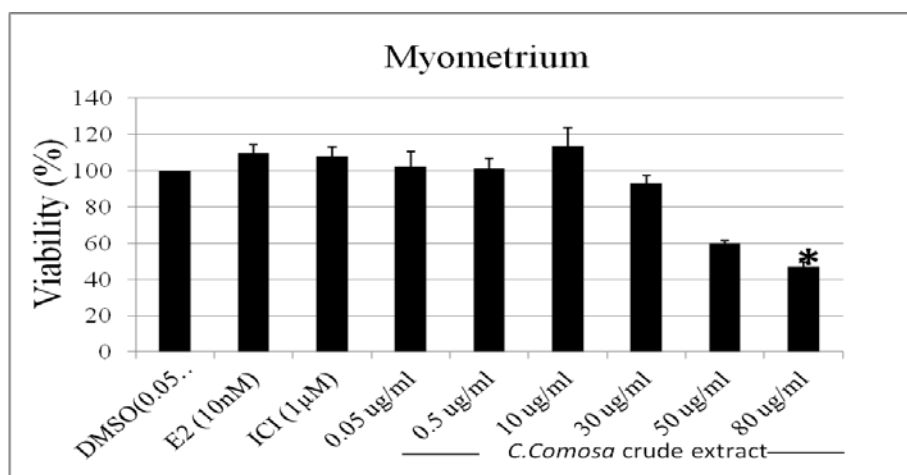
รูปที่ 1. แสดงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เพาะเลี้ยง (ก) จากกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก (ข) จากเนื้อเยื่อของมดลูก

1. การศึกษาฤทธิ์ของ Crude *C. comosa* extract และ ASPP-049 ที่มีผลต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูก

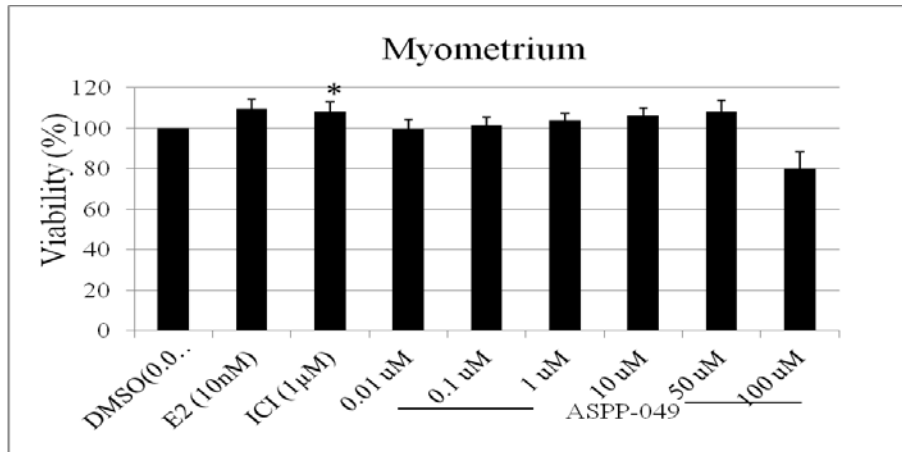
การทดลองนี้ใช้ primary cell line 5 ชุดคือจากผู้ป่วย No. 3, 4, 6, 8 และ 9 และทำการ

ทดสอบฤทธิ์ของสารที่ขนาดต่างๆกัน ประเมินการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยวิธี MTT assay ที่เวลาต่างๆกัน พบว่าช่วงความเข้มข้นของ crude extract ที่ 10 ug/ml มีการเพิ่มการกระตุ้นการแบ่งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.052$) แต่ค่า P value เกือบจะมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นสูงเกินกว่านี้ (80 ug/ml) พบว่าจะทำให้เซลล์ตาย ($P = 0.012$) ดังรูปที่ 2 ก สาร ASPP-049 ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังรูปที่ 2 ข และขนาดที่สูงเท่ากับ 100 uM ทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้น แต่ยังไม่มีความนัยสำคัญทางสถิติ สารต้านเอสโตรเจน (ICI) มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ ($P = 0.036$)

รูปที่ 2 ก



รูปที่ 2 ข

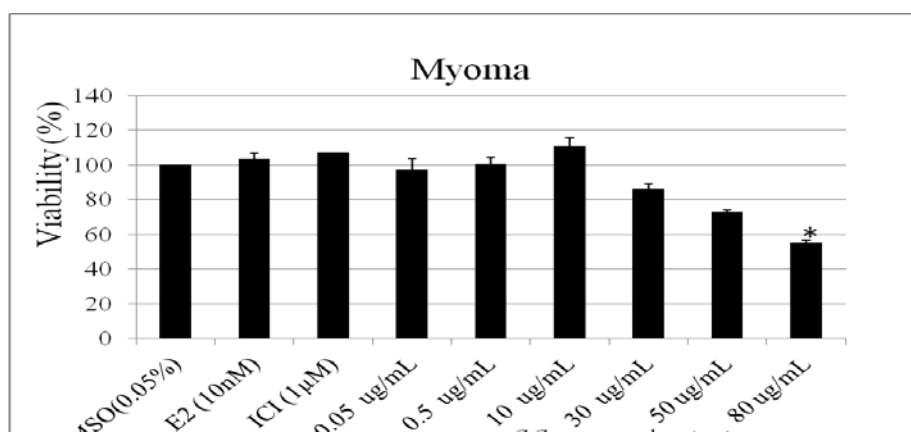


รูปที่ 2. แสดงฤทธิ์ของ(ก) สารสกัดจากวุ้นขี้มดลูก และ (ข) สารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อ บ่มไว้กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูกปกติ เป็นเวลา 24-72 ชม.
* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่ม DMSO)

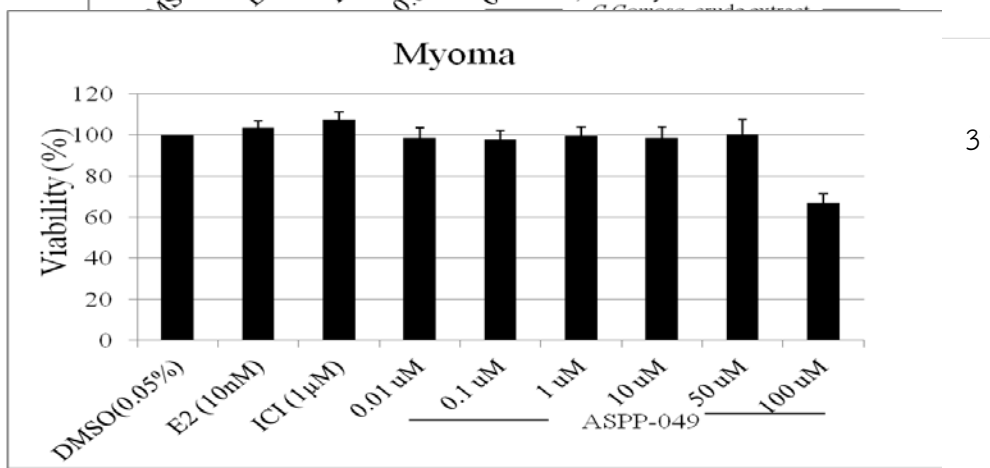
2. การศึกษาฤทธิ์ของ Crude *C. comosa* extract และ ASPP-049 ที่มีผลต่อเซลล์เนื้องอกมดลูก

การทดลองนี้ใช้ primary cell line จากเนื้องอกมดลูกของผู้ป่วย No. 3, 4, 6, 8 และ 9 และทำการทดสอบฤทธิ์ของสารที่ขนาดต่างๆกัน ประเมินการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เนื้องอกมดลูก โดยวิธี MTT assay ที่เวลาต่างๆกัน พบว่าช่วงความเข้มข้นของ crude extract ที่ 10 ug/ml เพิ่มกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้เล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.052$) แต่ค่า P value เกือบจะมีนัยสำคัญทางสถิติ และถ้าหากความเข้มข้นสูงเกินกว่านี้ (80 ug/ml) พบว่าจะทำให้เซลล์ตาย ($P=0.002$) ดังรูปที่ 3 ก ในกลุ่ม ASPP-049 พบว่า ASPP-049 ไม่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเนื้องอกมดลูก หากความเข้มข้นสูงขึ้น ขนาดที่สูงเท่ากับ 100 uM ทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้น แต่ยังไม่มีความนัยสำคัญ ($P=0.079$) ดังรูปที่ 3 ข

รูปที่ 3 ก



รูปที่ 3 ข

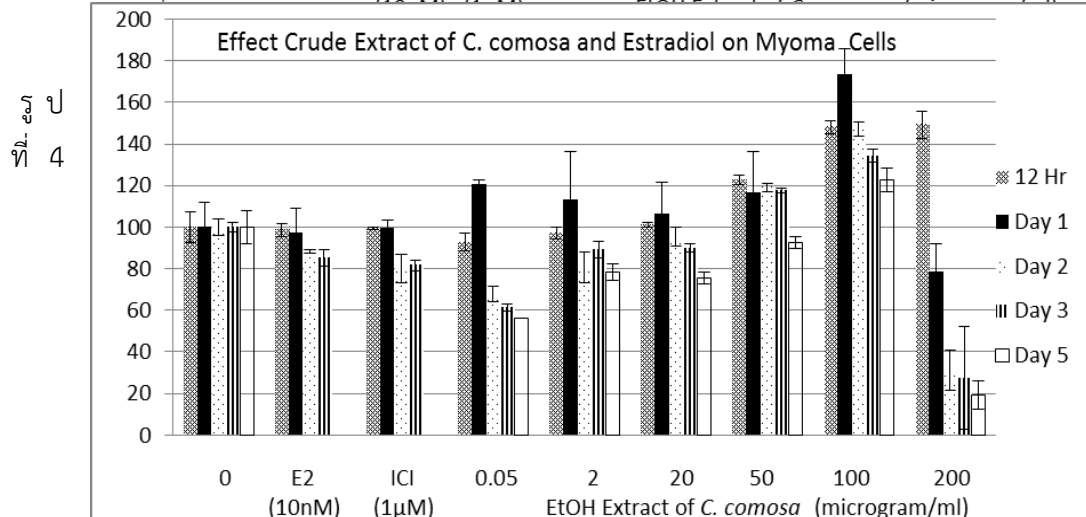
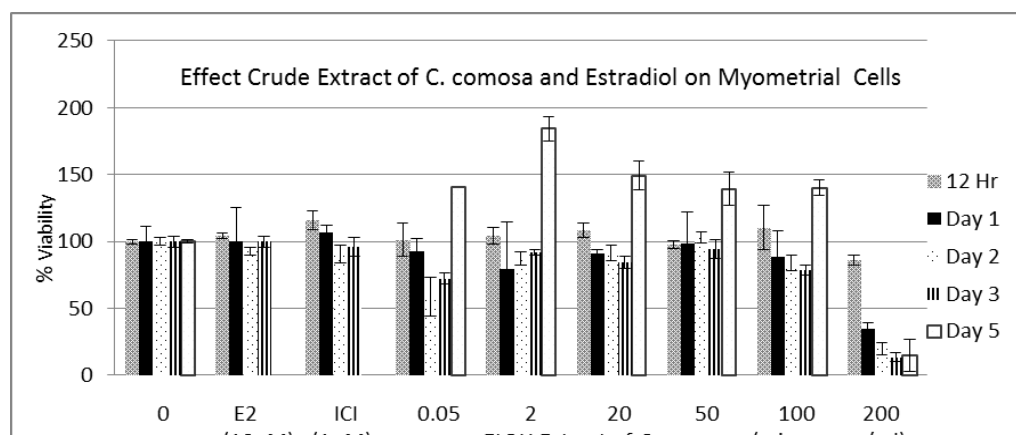


รูปที่ 3. แสดงฤทธิ์ของ(ก) สารสกัดจากว่านชักมดลูก และ(ข) สารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อ บ่มไว้กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกของมดลูกเป็นเวลา 24-72 ชม.
* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่ม DMSO)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ในการออกฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell proliferation) ของสารสกัดจากว่าน และสารสกัดบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกกับ estrogen receptor

ข้อมูลจาก primary cell line ผู้ป่วย no. 4 พบว่าหลังจากการให้ crude *C. comosa* extract และ ASPP-049 เซลล์กล้ามเนื้อเรียบจาก myometrium และ myoma มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีผลกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ดังกล่าวนี้กลับไม่ได้มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ ตามรูปที่ 4

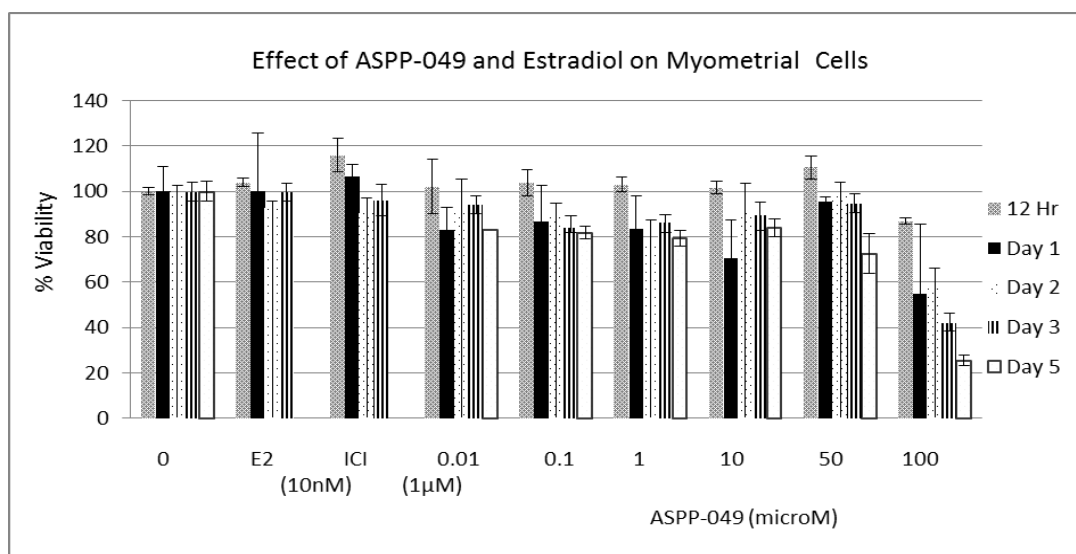
รูปที่ 4 ก



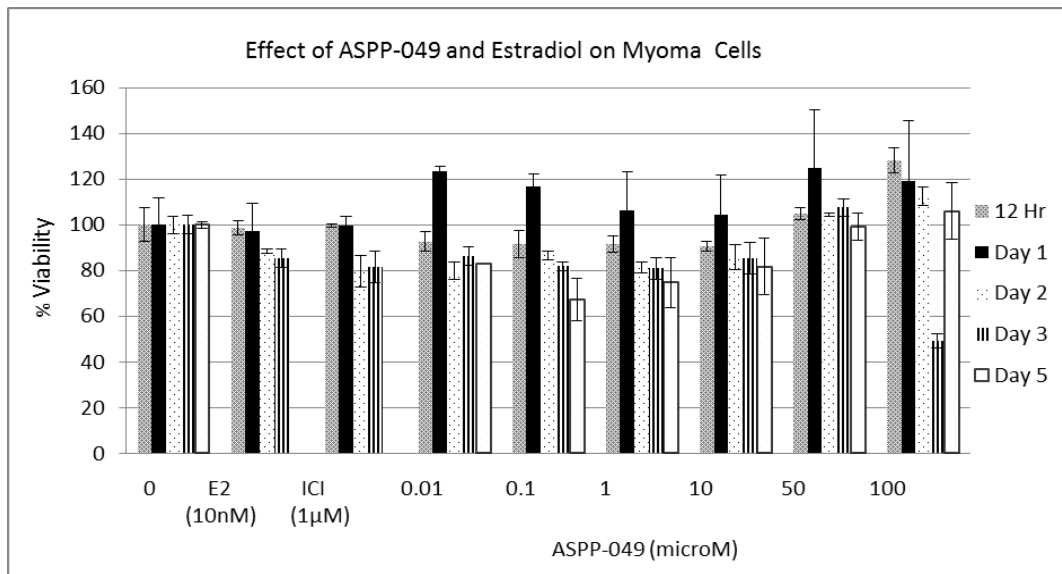
รูปที่ 4 ข

ข

รูปที่ 4 ค



รูปที่ 4 ง



รูป

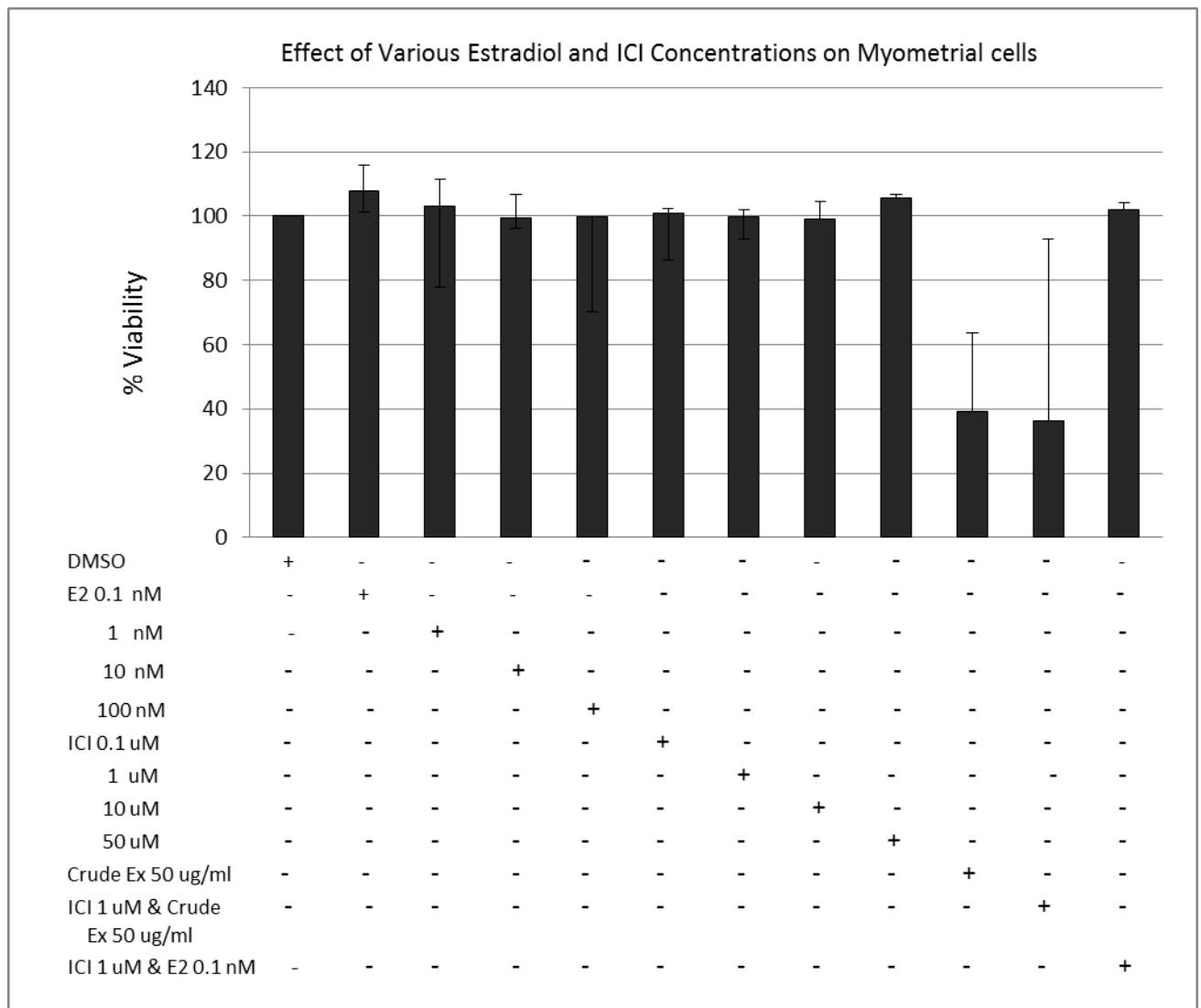
ที่

4 แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจาก วานชักมดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จาก (ก) มดลูกปกติ (ข) เนื้องอกของมดลูก และ สารASPP-049 ต่อการอยู่รอดของเซลล์จาก (ค) มดลูกปกติ (ง) เนื้องอกของมดลูก เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน

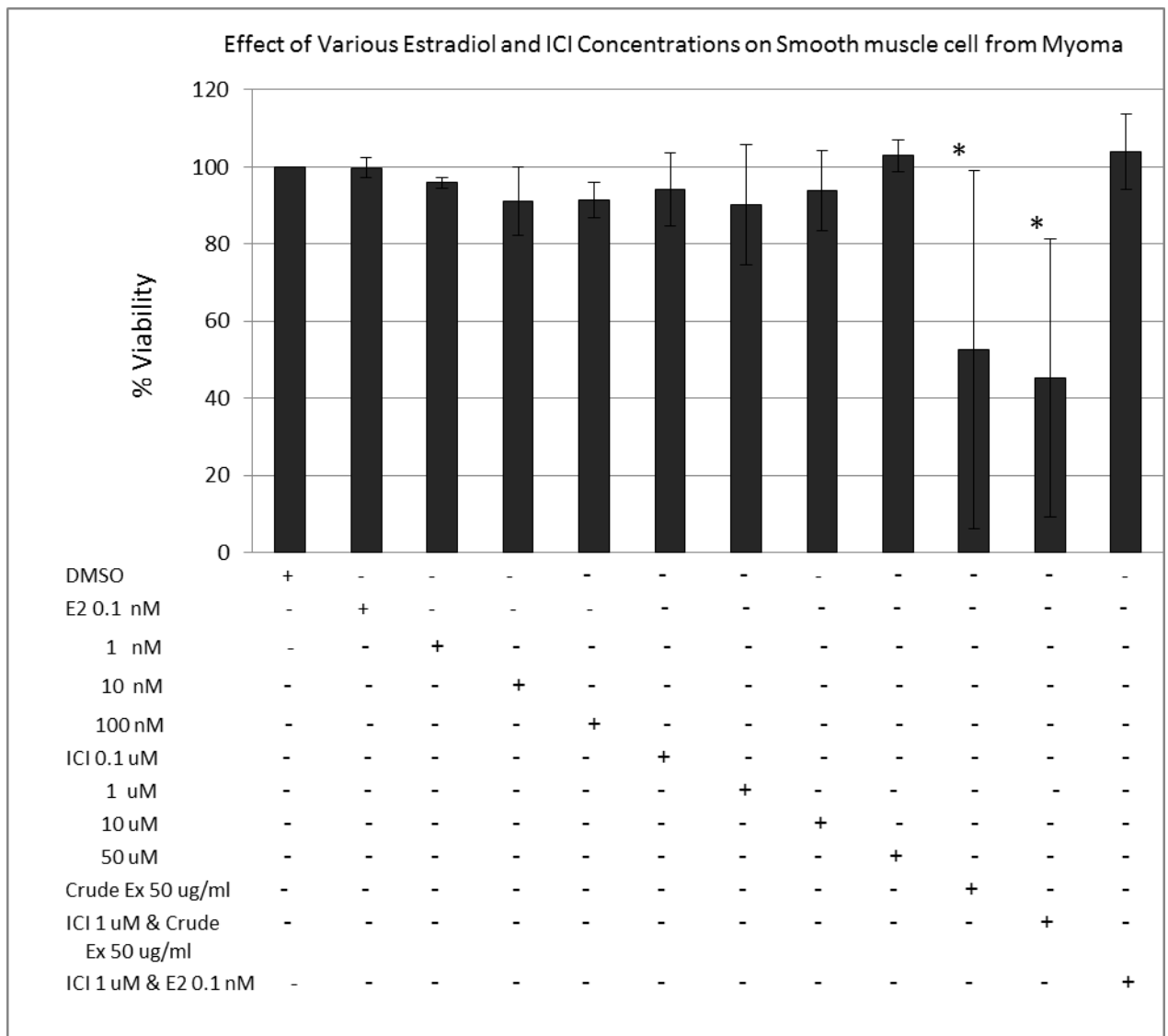
จากการที่ primary cell ของมดลูกที่ศึกษาไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบขนาดของฮอร์โมน estrogen ที่ใช้กระตุ้นและสาร ICI ที่เป็น estrogen antagonist หลายๆขนาดพบว่า ไม่ว่าขนาดและความเข้มข้นฮอร์โมนเอสโตรเจนจะเป็นเท่าไรก็ตาม ไม่มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ หรือลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตามรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของเซลล์วานชักมดลูกทั้ง crude *C. comosa* extract และ ASPP-049 ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ไม่ได้ทำงานผ่านทาง estrogen-estrogen receptor pathway

นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ความเข้มข้น crude extract ที่ 50 ug/ml ต่อ myometrial cell line และ myoma cell line ชุดนี้ (cell line no 5 และ 6) ไม่ได้กระตุ้นการแบ่งเซลล์ แต่ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง ดังนั้นจะเห็นว่า primary cell line ในผู้ป่วยแต่ละราย ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันบ้าง

รูปที่ 5 ก



รูปที่ 5 ข

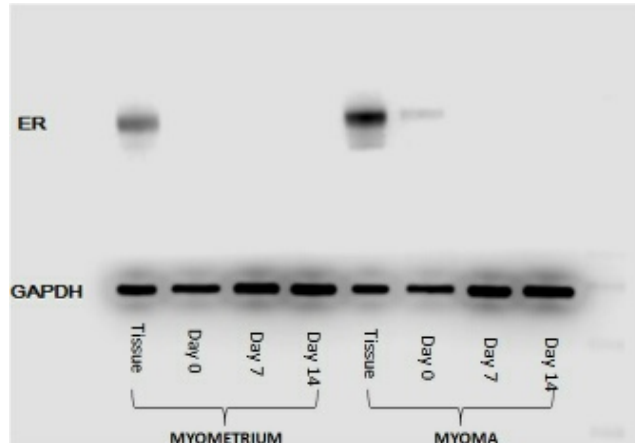


รูปที่ 5 แสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) สารต้านตัวรับ (ICI) สารสกัดจากวุ้นขี้มดลูกต่อการอยู่รอดของเซลล์จาก (ก) มดลูกปกติ (ข) เนื้องอกของมดลูก เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน
* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่ม DMSO)

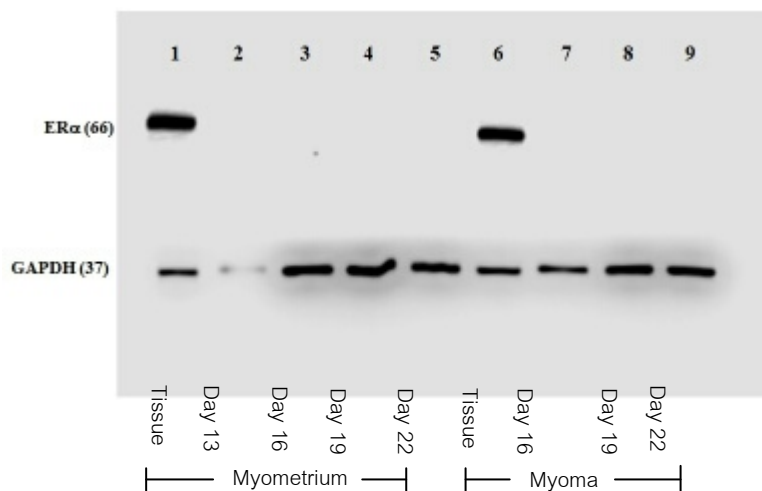
4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ใน primary cell ขณะเพาะเลี้ยงเซลล์

จากการที่ให้เอสโตรเจนแก่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และเซลล์เนื้องอกมดลูก เพื่อหวังผลให้เห็นฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งเป็น positive control ซึ่งคาดว่า เอสโตรเจนจะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกและเซลล์เนื้องอกมดลูก เนื่องจากในเนื้อเยื่อมดลูกมีตัวรับเอสโตรเจนจำนวนมาก แต่ปรากฏว่าไม่พบการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนตามข้อ 3 ผู้วิจัยได้พยายามค้นหาสาเหตุ โดยตั้งสมมติฐานและทำการทดสอบต่างๆหลายครั้ง ได้แก่ การใช้เนื้อเยื่อที่มาจากคนอายุน้อย ปรับเปลี่ยน culture media ใช้ความเข้มข้นของเซรัมต่างๆกันเป็นต้น ไม่พบว่าเทคนิคการเลี้ยงเซลล์มีผลทำให้เกิดความแตกต่าง รูปที่ 5

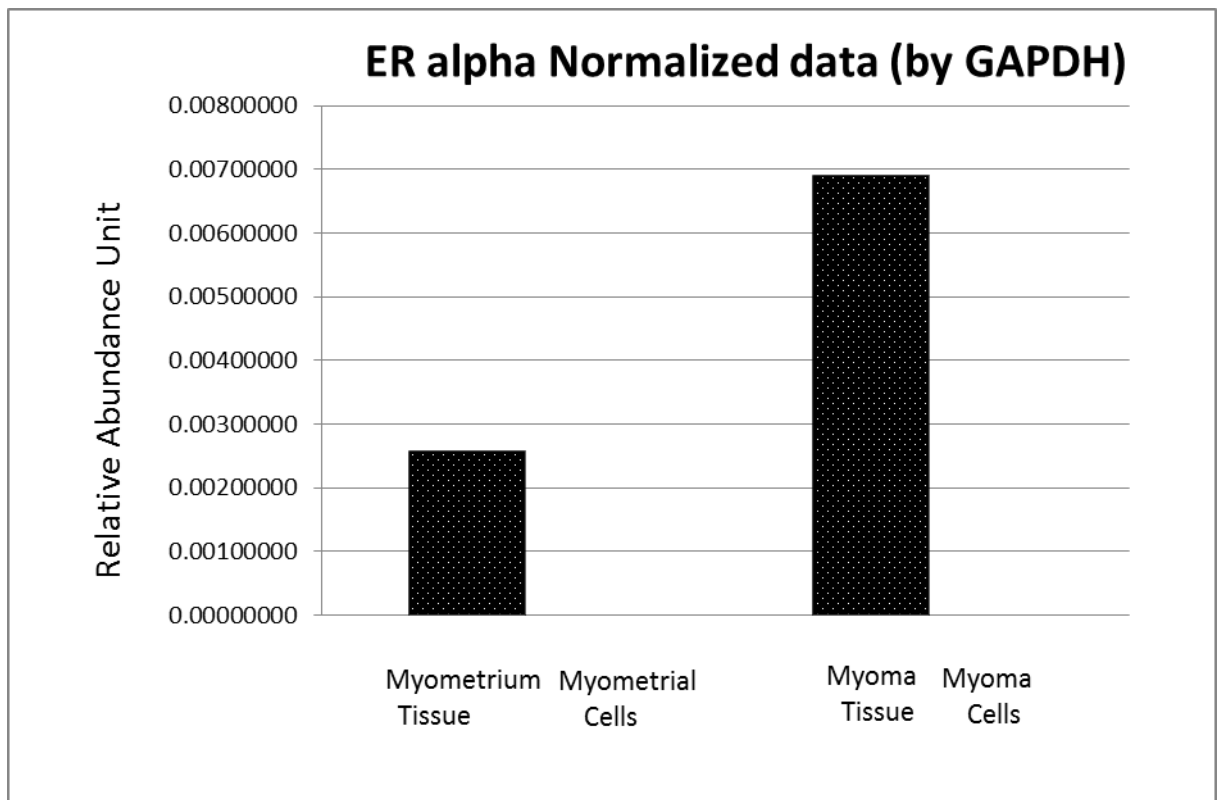
จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่ามีรายงานวิจัยเพียง 1-2 รายงาน ที่แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อ (primary cell culture) ทำให้ตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) สูญหายไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน estrogen receptor โดยทำ Western blot และ Quantitative Real time PCR (QT PCR) โดยได้เปรียบเทียบเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยก่อนการย่อยเพาะเลี้ยง กับเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์เนื้อเยื่ออกมดลูก พบว่า estrogen receptor ในเนื้อเยื่อหายไปตั้งแต่วันที่ทำการย่อยและเพาะเลี้ยง ตามรูปที่ 6, 7 และ 8 (cell line no. 8)



รูปที่ 6 แสดงการแสดงออกของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) โดยการนำเทคนิค Western blot โดยพบการสูญหายไปของตัวรับเอสโตรเจน ตั้งแต่วันที่ทำการย่อยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่ออกมดลูก



รูปที่ 7 แสดงการแสดงออกของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูกและเนื้อเยื่ออกมดลูก passage ที่ 2 โดยการนำเทคนิค Western blot ได้พบการสูญหายไปของตัวรับเอสโตรเจน



รูปที่ 8 แสดงการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และระหว่างเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR โดยพบการสูญหายไปของตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก

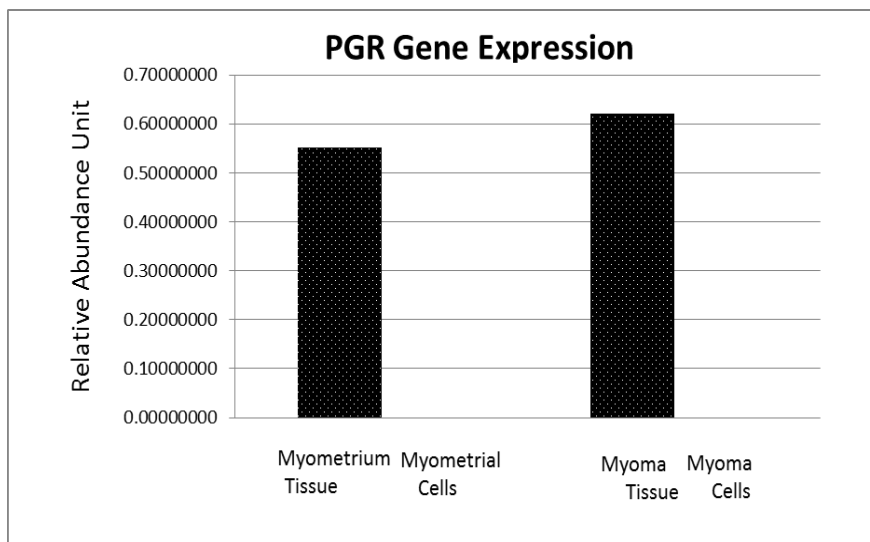
5. พบการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน จากเนื้อเยื่อและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์เนื้องอกมดลูกที่ทำการเพาะเลี้ยง

ยีนที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) ได้แก่ progesterone receptor (PGR), Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (V-MYC) คือยีนสำหรับการสร้าง transcription factor MYC protein ซึ่งจำเป็นในขบวนการ cell cycle, apoptosis เป็นต้น Trefoil factor 1 (TFF1) หรือ Breast Cancer Estrogen-Inducible gene คือยีนที่ทำให้เกิดการสร้าง secretory protein ซึ่งตรวจพบใน gastrointestinal mucosa, Cathepsin D (CTSD) โรคที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์กับโปรตีนนี้ได้แก่ มะเร็งเต้านม และ Rosai Dorfman

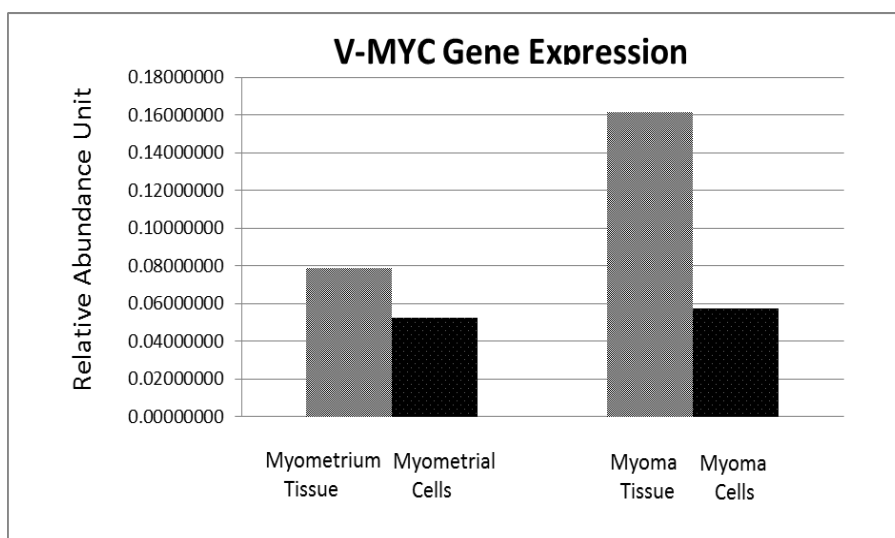
จากการศึกษา QT PCR พบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ทั้งในเนื้อเยื่อ เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์เนื้องอกมดลูก อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน PGR มีระดับต่ำๆ เช่นเดียวกับ estrogen receptor (รูปที่ 9) พบเฉพาะ การแสดงออกของTFF1 มีระดับสูงขึ้นเล็กน้อยทั้งในเซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์เนื้องอกมดลูก ซึ่งจากผลของ QT PCR นี้ จะได้นำ TFF1 และ CTSD มาเป็นเครื่องมือติดตามผลของสารสกัดว่าน และสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์กล้ามเนื้อและเนื้องอกมดลูกต่อไป และแผนงานวิจัยถัดไปจะได้ทำการศึกษาการ

แสดงออกของยีน EGFR และ TNF- β ซึ่งเป็น cytokine และโปรตีนซึ่งพบมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเนื้องอกมดลูก ว่าจะมีการแสดงออกในระดับสูงเพียงพอสำหรับนำมาใช้ในการติดตามในระหว่างการให้สารสกัดจากวุ้นและสารบริสุทธิ์หรือไม่

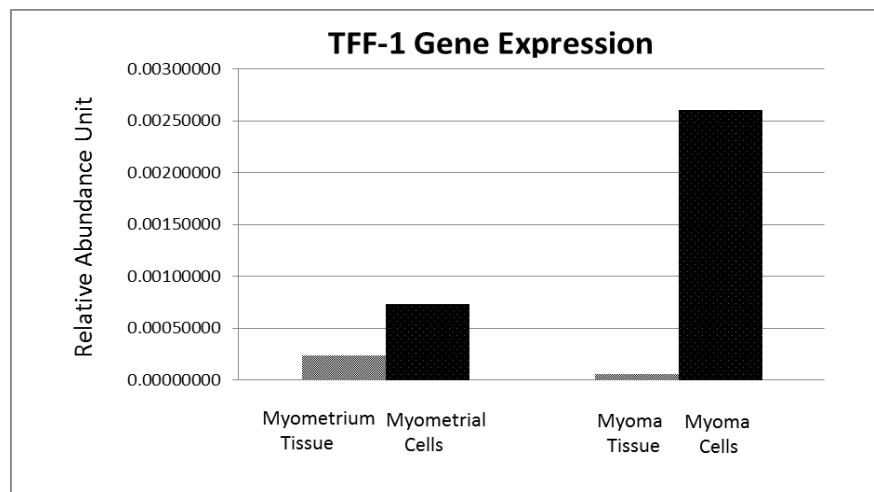
รูปที่ 9 ก



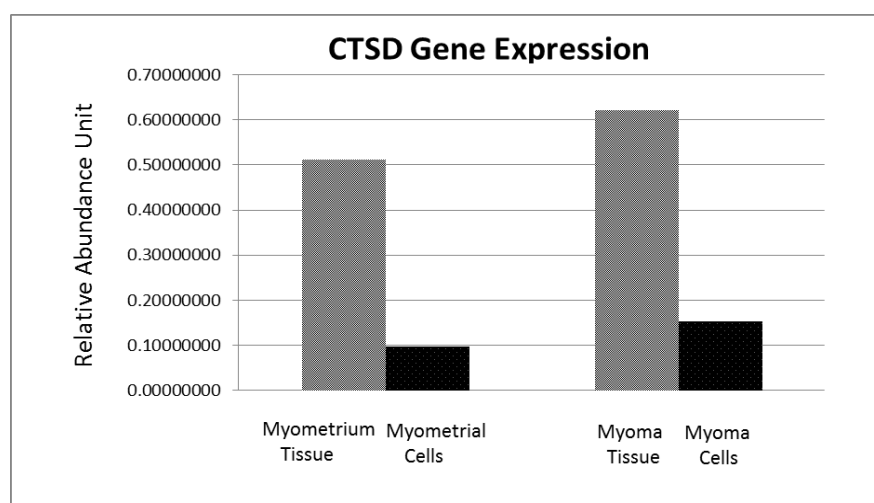
รูปที่ 9 ข



รูปที่ 9.ค



รูปที่ 9. ง

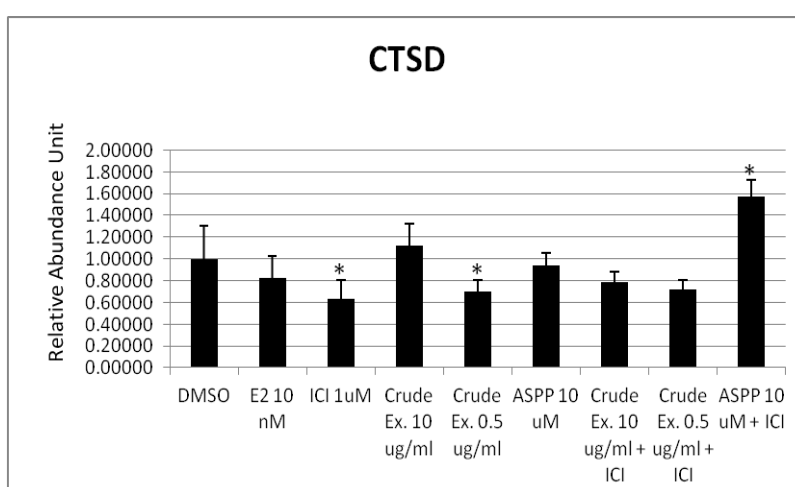


รูปที่ 9 แสดงการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) (ก) PGR (ข) V-MYC (ค) TFF1 (ง) CTSD เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และระหว่างเนื้อเยื่อเนื้องอกมดลูก และเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยการทำเทคนิค Real time PCR

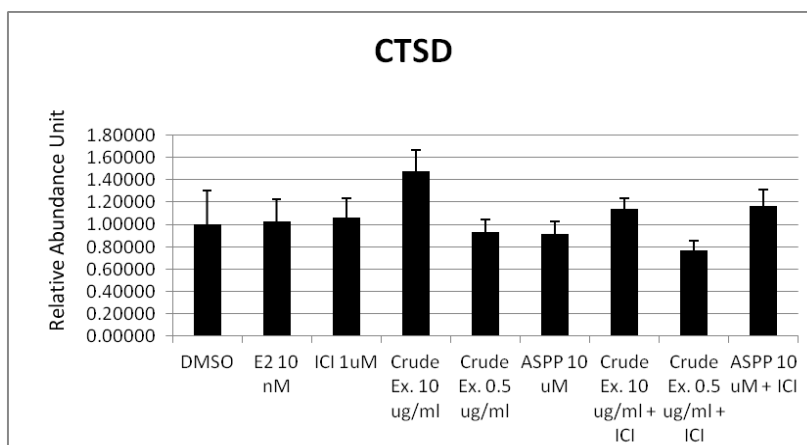
6. ฤทธิ์ของสารสกัดจากวุ้นและสารบริสุทธิ์ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน

6.1 ฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านและสารบริสุทธิ์ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) พบการแสดงออกของยีนจากกล้ามเนื้อดลูกเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ การแสดงออกของยีน CTSD ลดลง เมื่อให้สารต้านเอสโตรเจน (ICI) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการให้เอสโตรเจนไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนนี้ ซึ่งอธิบายได้จากการที่ตัวรับเอสโตรเจนมีการสลายหายไป พบว่าการให้ crude *C. comosa* extract ขนาดต่างๆ ลดการแสดงออกของยีน ในขณะที่การให้ ASPP-049 ร่วมกับสารต้านเอสโตรเจน (ICI) เพิ่มการแสดงออกของยีน CTSD ซึ่งต่างจากการให้สารต้านเอสโตรเจน (ICI) ร่วมกับการให้ crude *C. comosa* extract ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน

10.ก



10.ข

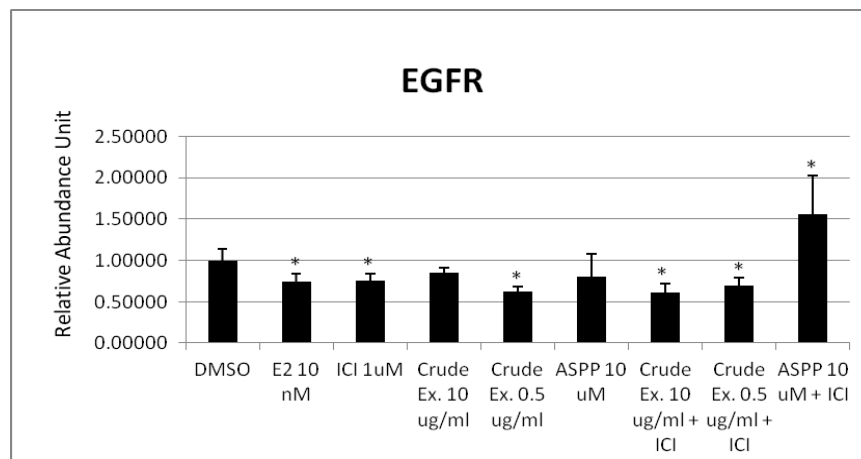


รูปที่ 10 แสดงการแสดงออกของยีน CTSD ที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์จากกล้ามเนื้อดลูก (ก) และเซลล์จากเนื้อเยื่ออกมดลูก (ข)

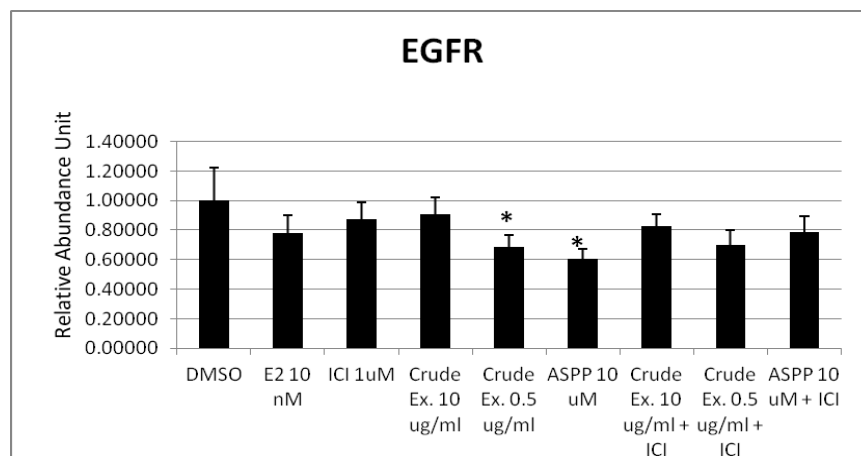
6.2 ฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านและสารบริสุทธิ์ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้อเยื่ออกมดลูก epidermal growth factor (EGFR) และ Tumor necrotic factor

(TNF β) เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ของเนื้องอกมดลูก พบว่าเซลล์จากกล้ามเนื้อเนื้องอกมดลูกมีการตอบสนองต่อสารสกัดจากวุ้นและสารบริสุทธิ์คล้ายคลึงกับเซลล์จากเนื้องอกมดลูก โดยพบว่าการแสดงออกของยีน EGFR ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงยกเว้น การให้ crude *C. comosa* extract และ ASPP-049 ขนาดต่ำๆ ลดการแสดงออกของยีน EGFR ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน TNF β ไม่ว่าจะให้สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ ในขนาดใดๆก็ตาม

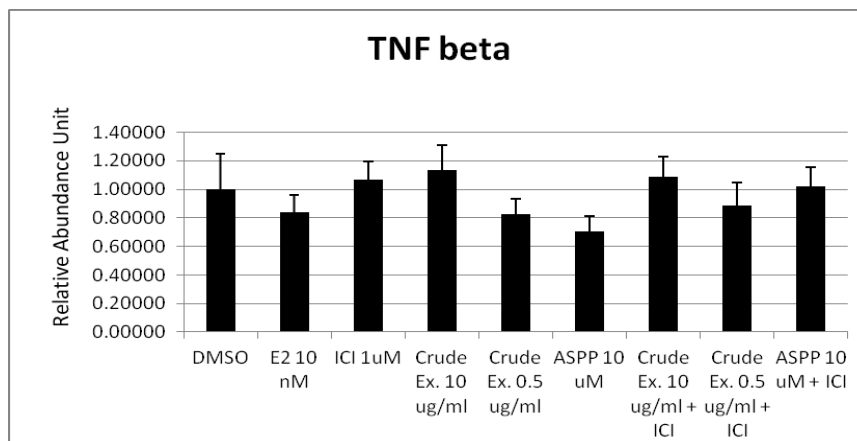
11. ก



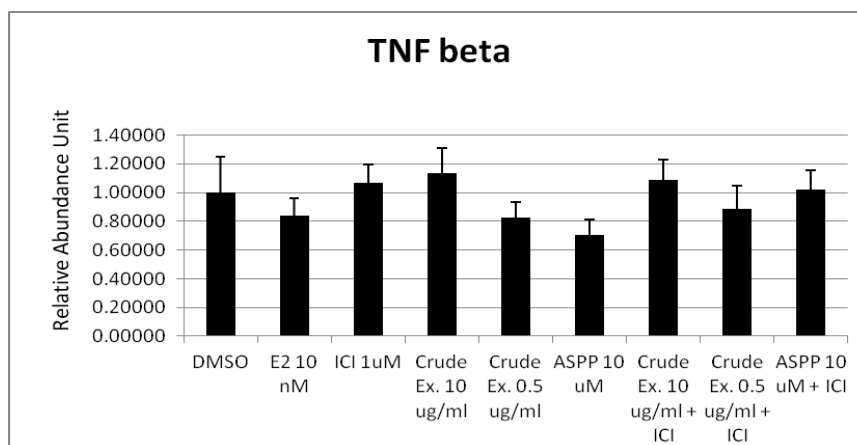
11 ข.



11 ค.



11 ง.



รูปที่ 11 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้องอกมดลูก (ก) การแสดงออกของยีน EGFR ในเซลล์จากกล้ามเนื้อมดลูก (ข) การแสดงออกของยีน EGFR ในเซลล์จากเนื้องอกมดลูก (ค) การแสดงออกของยีน TNF beta ในเซลล์จากกล้ามเนื้อมดลูก (ง) การแสดงออกของยีน TNF beta ในเซลล์จากเนื้องอกมดลูก

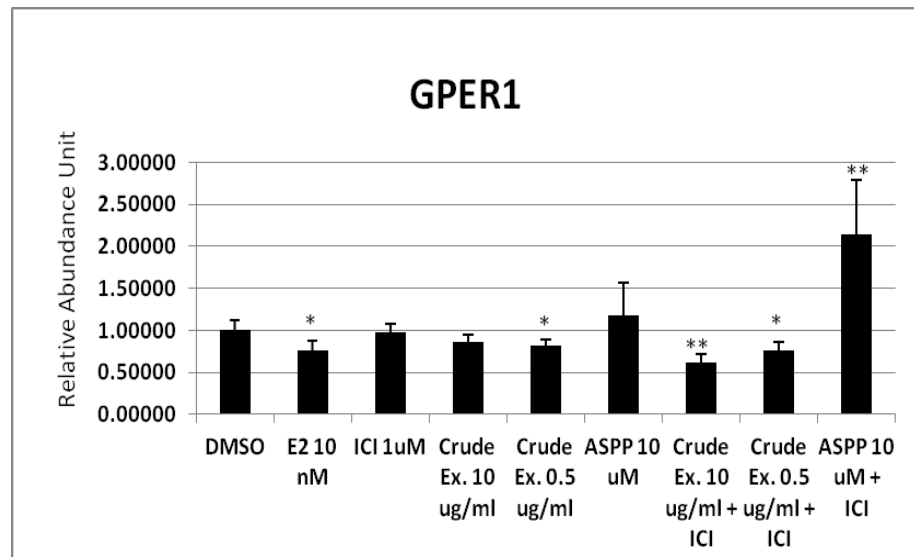
6.1 ฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านและสารบริสุทธิ์ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ผิวเซลล์

จากการศึกษาพบการแสดงออกของยีนตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ผิวเซลล์ (G protein estrogen receptor, GPER) ในเซลล์ที่มาจากกล้ามเนื้อเรียบและเนื้องอกมดลูก ซึ่งแตกต่างจากตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear estrogen receptor) ซึ่งสูญหายไประหว่างการย่อยเนื้อเยื่อ

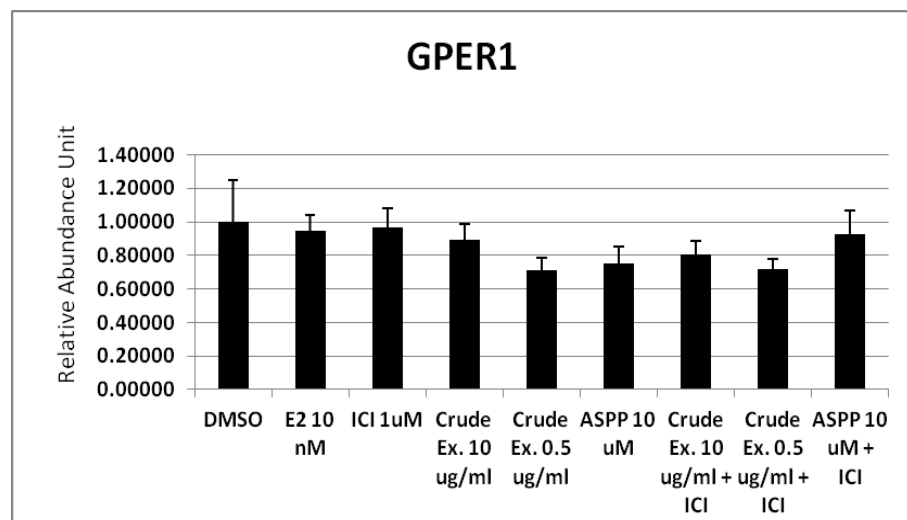
การให้ crude *C. comosa* extract, ASPP-049, ICI และ estradiol (E2) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน GPER ในเซลล์ที่มาจากเนื้องอกมดลูก (รูป 12 ข) อย่างไรก็ตาม crude *C. comosa*

extract ขนาดต่างๆ และ crude *C. comosa* extract ร่วมกับ ICI ลดการแสดงออกของยีน GPER (รูป 12 ก)

12 ก.



12. ข



รูปที่ 12 การแสดงออกของยีนตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่มิวเซลล์เกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้องอกมดลูก (G protein estrogen receptor, GPER) (ก) การแสดงออกของยีน GPER ในเซลล์จากกล้ามเนื้อมดลูก (ข) การแสดงออกของยีน GPER ในเซลล์จากเนื้องอกมดลูก

7. การศึกษาสารสกัดจากว่านชักมดลูกและสาร ASPP-049 ต่อ ภาวะ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากเนื้องอก myoma และกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง

ได้ทำการศึกษาโดยนำเซลล์ที่ได้รับสารต่างๆ ทุกกลุ่มมาย้อมสาร Propidium iodide ซึ่งเป็นสารที่สามารถย้อม DNA ได้ และย้อมสาร Annexin V ซึ่งติดสารเรืองแสง fluorescence และตรวจสอบโดยใช้ flow cytometer Annexin V เป็นสารที่ใช้ทดสอบการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเซลล์ซึ่งมักพบบนเซลล์ตาย (apoptosis cells)

ผลการศึกษาพบว่า

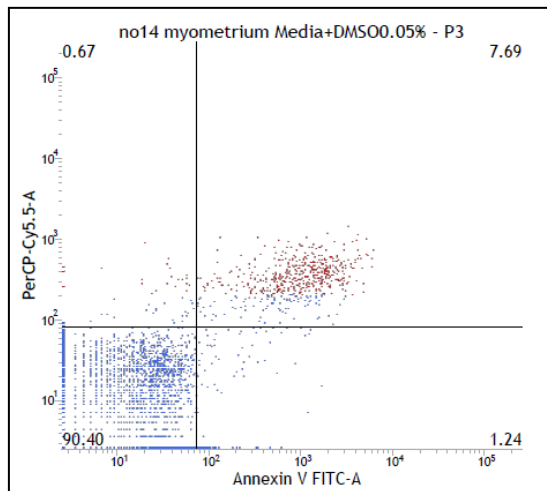
1. เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ พบร้อยละของเซลล์ที่อยู่ในระยะมีชีวิต (live) เซลล์ตาย (necrotic) และเซลล์เริ่มตาย (early apoptosis) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าในกลุ่มที่ได้ ASPP049 ความเข้มข้น 50 uM และกลุ่ม ASPP049 ความเข้มข้น 50 uM และ ICI มีร้อยละของเซลล์ที่อยู่ในระยะเริ่มตายสูงขึ้นก็ตาม (รูป 13 ก)

2. เซลล์จากเนื้องอกมดลูก พบร้อยละของเซลล์ที่อยู่ในระยะมีชีวิต (live) เซลล์ตาย (necrotic) และเซลล์เริ่มตาย (early apoptosis) ในแต่ละกลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (รูป 13 ข)

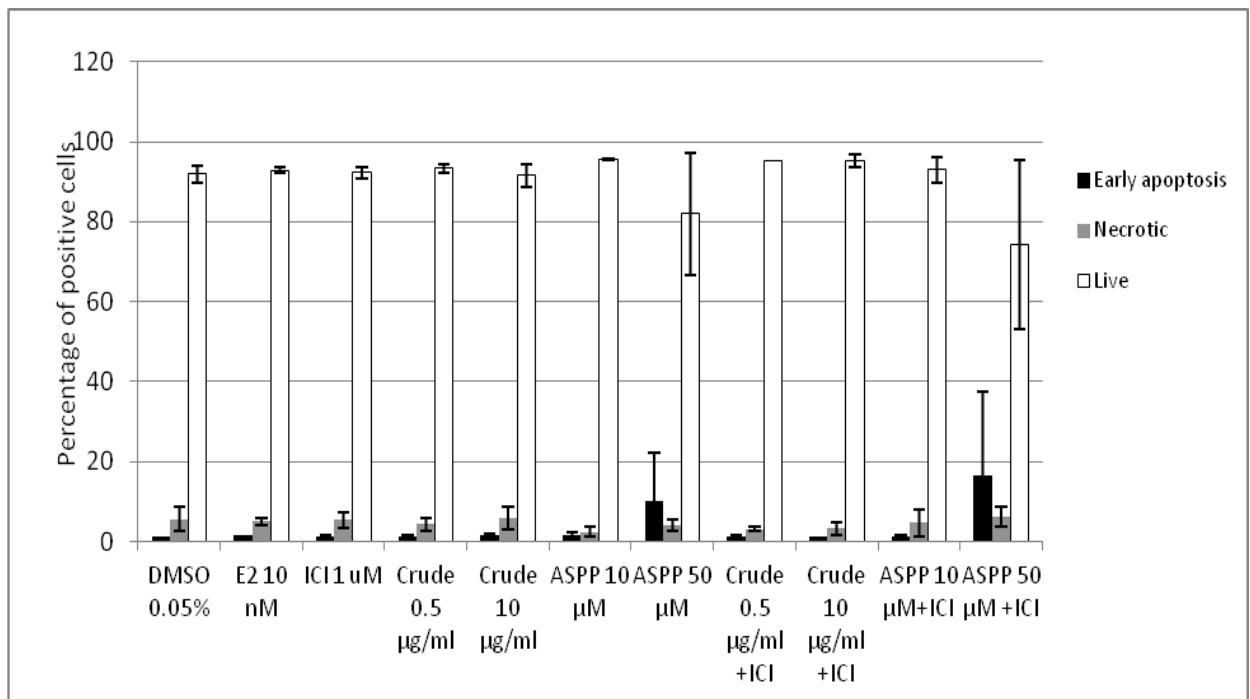
หมายเหตุ เซลล์ที่อยู่ในระยะมีชีวิต (live) คือเซลล์ที่ย้อมไม่ติดทั้งสี่ Annexin V และ Propidium iodide เซลล์ตาย (necrotic) คือเซลล์ที่ย้อมติดสี่ทั้ง Annexin V และ Propidium iodide และเซลล์เริ่มตาย (early apoptosis) คือเซลล์ที่ย้อมติดสี่ทั้ง Annexin V แต่ไม่ติดสี่ Propidium iodide

Myometrium

13 ก



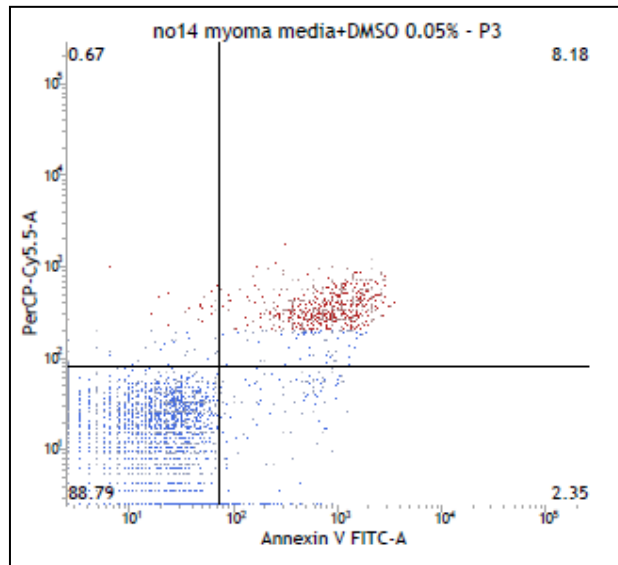
13 ข



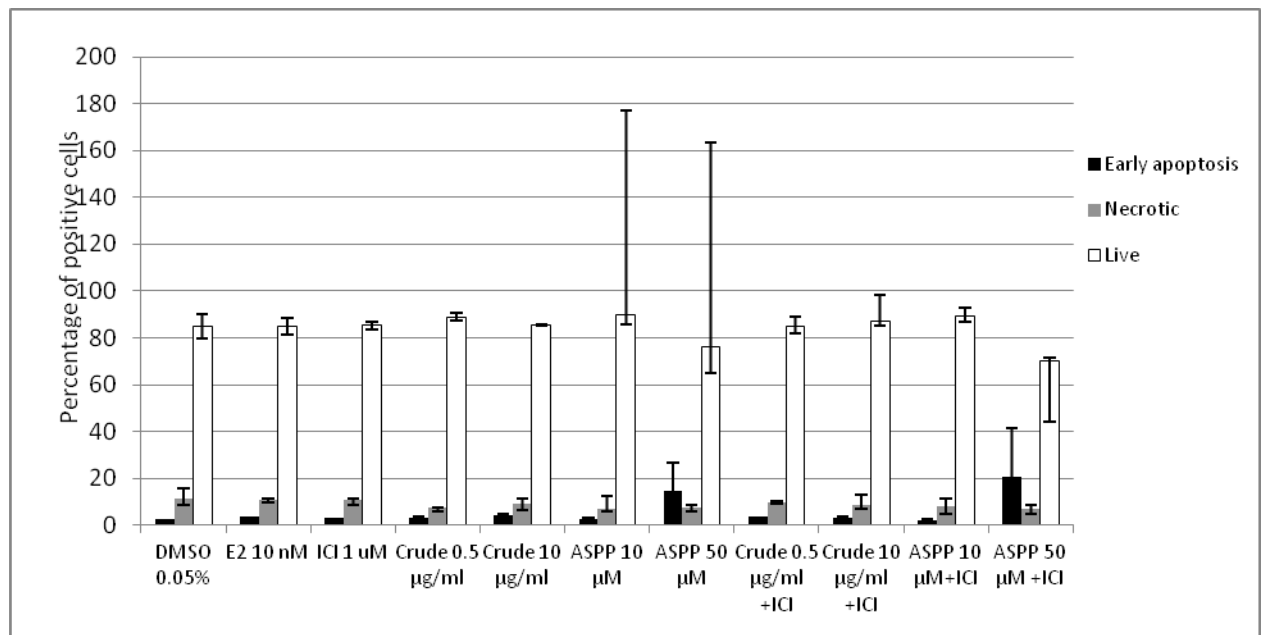
รูปที่ 13 ภาพ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก (ก) ภาพการตรวจวิเคราะห์ Flow cytometry ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก โดยย้อม Annexin V และ Propidium iodide (ข) ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (live) เซลล์ตาย (necrotic) และเซลล์ที่เริ่มตายแบบ apoptosis (early apoptosis)

Myoma

13 ค



13 ง

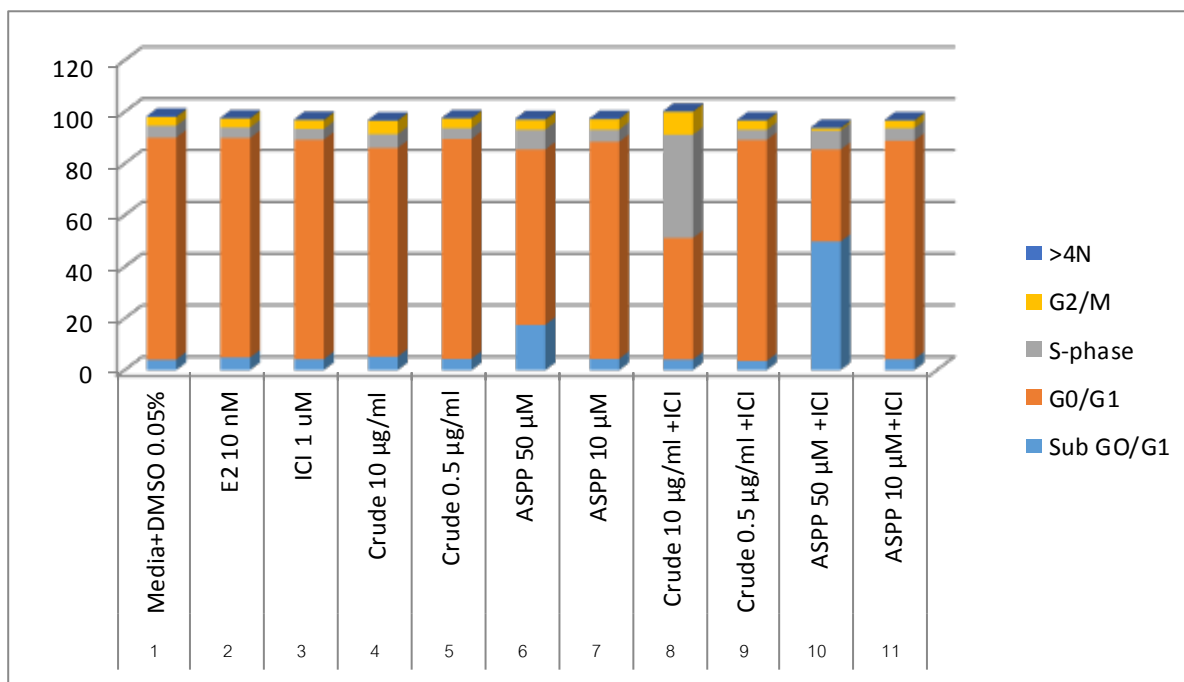


รูปที่ 13 ภาพ apoptosis ของเซลล์เนื้องอกมดลูก (ค) ภาพการตรวจวิเคราะห์ Flow cytometry ของเซลล์เนื้องอกมดลูก โดยย้อม Annexin V และ Propidium iodide (ง) ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (live) เซลล์ตาย (necrotic) และเซลล์ที่เริ่มตายแบบ apoptosis (early apoptosis)

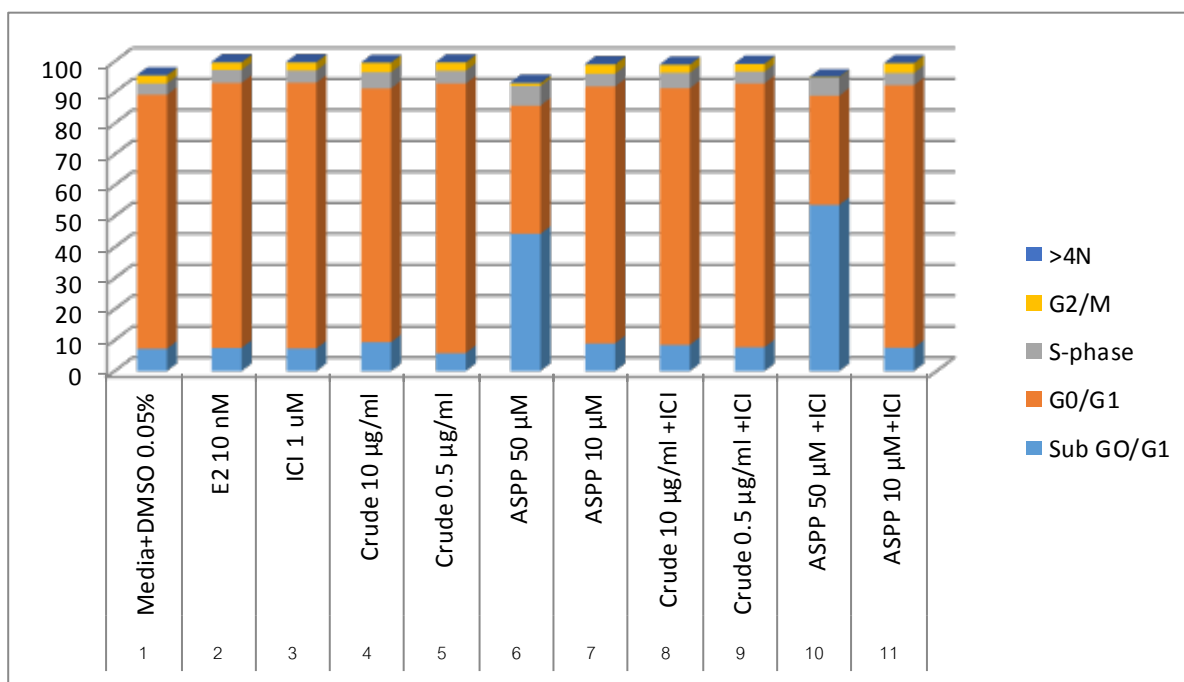
8. การศึกษาสารสกัดจากवानิชิมดลูกและสาร ASPP-049 ต่อวงจรเซลล์ (cell cycle) ของเซลล์ myoma และกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง

Cell cycle ของเซลล์ทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะพัก (G0) หรือระยะแรก (G1) เซลล์จำนวนน้อยที่เหลืออยู่ในระยะกำลังแบ่งเซลล์ เช่น เซลล์ในระยะ S และ G2/M เซลล์กลุ่มที่ได้รับ ASPP ความเข้มข้น 50 uM และได้กลุ่มที่ได้รับ ASPP ความเข้มข้น 50 uM ร่วมกับ ICI มีเซลล์ในระยะตายเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาสอดคล้องกับการการศึกษา apoptosis โดยการทำ Flow cytometer ในหัวข้อ 7

รูปที่ 14 ก



รูปที่ 14 ข



รูปที่ 14 แสดงวงจรเซลล์ (cell cycle) ที่ระยะต่างๆ เมื่อได้รับสารต่างๆ (ก) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูก (ข) เซลล์เนื้องอกมดลูก

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

5.1 Crude *C. comosa* extract และสารสกัดบริสุทธิ์ ASPP049 ไม่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อดลูก และเซลล์เนื้องอกมดลูก และ Crude *C. comosa* extract ในขนาดความเข้มข้นสูง (80 ug/ml) มีผลลดการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูก และเซลล์เนื้องอกมดลูก

จากผลการศึกษาตามหัวข้อ 4.1 และ 4.2 พบว่าสารสกัดว่านชักมดลูก Crude *C. comosa* extract และสารบริสุทธิ์ ASPP049 ไม่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของทั้งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์เนื้องอกมดลูก ถึงแม้ว่า Crude *C. comosa* extract ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml เพิ่มจำนวนเซลล์ของทั้งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์เนื้องอกมดลูก อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาที่ได้ดังกล่าว น่าจะเนื่องมาจากการที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบและเซลล์กล้ามเนื้อเนื้องอกมดลูกสูญเสียตัวรับเอสโตรเจนซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 5.2 Crude *C. comosa* extract ในขนาดสูง มีฤทธิ์กดการแบ่งเซลล์กล้ามเนื้อดลูก และเซลล์เนื้องอกมดลูก ซึ่งฤทธิ์ที่กดการแบ่งเซลล์นี้อาจจะเป็น toxicity ของยาต่อเซลล์ หรืออาจจะกดเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ หรือเนื้องอกมดลูก ซึ่งหากเป็นฤทธิ์เฉพาะเซลล์ ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ต่อไป อย่างไรก็ตามการแยกว่าเป็นฤทธิ์ชนิดใด ก็อาจจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในเซลล์หลายๆชนิด

สารสกัดว่านชักมดลูกมีการออกฤทธิ์ต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูก และเซลล์เนื้องอกมดลูก คล้ายคลึงกัน เช่นเดียวกับสารบริสุทธิ์ ASPP049 โดยที่ฤทธิ์การกระตุ้นของสารสกัดว่านชักมดลูกดูเหมือนมีฤทธิ์ดีกว่า สารสกัดบริสุทธิ์ ASPP049 ซึ่งตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย ศ.ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์

5.2 ฤทธิ์กระตุ้นและกดการแบ่งเซลล์ (cell proliferation and inhibition) ของสารสกัดจากว่าน และสารสกัดบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกจากการศึกษานี้ ไม่ได้กระทำผ่านทาง nuclear estrogen receptor- α

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า ว่านชักมดลูกมีฤทธิ์เอสโตรเจน ดังนั้นสมมติฐานการทำงานวิจัยครั้งนี้ จึงคาดว่าฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์กล้ามเนื้อดลูก และเซลล์เนื้องอกมดลูก ของว่านชักมดลูกน่าจะชักนำผ่านตัวรับเอสโตรเจน ดังนั้นในการออกแบบการศึกษาตามหัวข้อ 4.3 จึงได้ให้เอสโตรเจน เพื่อเป็น positive control อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ ไม่พบการกระตุ้นเซลล์เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง culture condition

ซึ่งผู้วิจัยพยายามทดลองหาสาเหตุ โดยการเปลี่ยนความเข้มข้น สารที่เลี้ยงเซลล์ แต่ไม่พบความแตกต่างใดๆ อย่างไรก็ตามภายหลังจากค้นคว้า พบว่าเคยมีรายงานการศึกษา 1-2 บทความ ที่พบว่าเป็นจากตัวรับเอสโตรเจนหายไปขณะทำการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นได้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ พบว่า estrogen receptor มีการสูญหายไประหว่างการเตรียม primary cell culture ดังนั้นเมื่อทำการทดลองตามหัวข้อ 4.3 จึงไม่พบการเพิ่มจำนวนเซลล์ จากการพบการสูญหายของตัวรับเอสโตรเจน สอดคล้องกับการศึกษาของ (Sadovsky et al., 1992; Sampath et al., 2001; Severino et al., 1996)

ดังนั้น การที่วุ้นซึกมดลูกไม่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกและเนื้องอกมดลูกได้อย่างชัดเจนอาจจะเป็นเนื่องจากสูญเสียตัวรับเอสโตรเจน ยังไม่สามารถสรุปได้จากการศึกษาว่าวุ้นซึกมดลูกมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกและเนื้องอกมดลูกโดยทำงานผ่านเอสโตรเจน ดังนั้น primary cell culture ของเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกและเนื้องอกมดลูก ไม่น่าจะเหมาะสมในการเป็น model ศึกษาสารที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาก่อนหน้านี้ใน human uterine cell lines (Ishikawa) และมดลูกของสัตว์ทดลอง ซึ่งเนื้อเยื่อทั้งสองมี estrogen receptor พบว่าสาร ASPP-049 จากวุ้นซึกมดลูกมีกลไกการทำงานเหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจนทุกประการ (Winuthayanon et al., 2013) โดยสารมีปฏิสัมพันธ์กับตัวรับ ER α จับกับ ER α pocket และสามารถกระตุ้นการเคลื่อนย้ายของตัวรับเอสโตรเจนแอลฟา (ER α) เข้าสู่นิวเคลียสไปกระตุ้น estrogen responsive element (ERE) ซึ่งทำการศึกษาด้วย luciferase reporter gene assay จำลองการทำงานระดับโมเลกุลของตัวรับเอสโตรเจน นอกจากนี้ในสัตว์ทดลองหนูถีบจักรที่รังไข่ถูกตัดออกไป การให้สาร ASPP-049 ทำให้เกิดการตอบสนองได้หลายอย่างแบบฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่ไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักน้ำหนักของมดลูกหลังการให้สารไปแล้ว 24 ชั่วโมง การให้สาร ASPP-049 พร้อมกับ E2 ไม่พบฤทธิ์ของสารในการเสริมหรือลดฤทธิ์ของกันและกัน โดยสรุปได้ว่าสาร ASPP-049 มีฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจนแบบอ่อนๆ สารสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูกแบบฤทธิ์เอสโตรเจนที่เป็น ER α -dependent แต่ไม่มีผลทำให้น้ำหนักของมดลูกเพิ่มขึ้น รวมทั้งไม่ได้เสริมหรือลดฤทธิ์ของเอสโตรเจนแต่อย่างใด

5.3 มีการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมได้ด้วยเอสโตรเจน (estrogen regulated genes) แต่ไม่พบการแสดงออกของ estrogen และ progesterone receptor

จากการทำ real time PCR พบการแสดงออกของ V-MYC, TFF1 และ CTSD ซึ่งจะช่วยให้สามารถนำมาใช้ในการติดตาม เมื่อทำการทดลองโดยการให้สารสกัดวุ้นซึกมดลูก และ ASPP049

เนื้องอกมดลูก (myoma or uterine fibroid) เป็นเนื้องอกมดลูกชนิดไม่เป็นมะเร็ง (benign tumor) ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน แต่มีการพยายามศึกษาหาสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และปัจจัยที่เพิ่มขยายขนาดของเนื้องอกมดลูก ซึ่งได้แก่ growth factors หลายชนิด อาทิ เช่น transforming growth factor- β (TGF- β) , epidermal growth factor (EGF) และตัวรับ นอกจากนี้ยังมี gene ที่ทำหน้าที่ใน cell cycle เป็นตัวควบคุม อาทิ เช่น Bcl2 โปรตีนต้าน apoptosis และ tumor necrosis factor- α (TNF α) เป็นต้น (Blake, 2007) ในการศึกษาต่อไปจะติดตามการแสดงออกของยีนเหล่านี้

Cathepsin D (CTSD) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนอื่น (proteolysis) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) ความสมดุลของเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) การตายและการเกิดใหม่ (renew) ของเนื้อเยื่อ (Koike et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า CTSD กระตุ้น apoptosis (Benes et al., 2008) Epidermal growth factor receptor (EGFR) เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor) ที่ผิวเซลล์ Epidermal growth factor (EGFR) เป็นโปรตีนสำคัญในกระบวนการการแบ่งเซลล์ (cellular proliferation) การเปลี่ยนแปลงลักษณะ phenotype ของเซลล์ (differentiation) และการอยู่รอดของเซลล์

5.4 การแสดงออก (gene expression) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ แบ่งเซลล์ของเนื้องอกมดลูก ได้แก่ CTSD, EGFR และ TNF beta เป็นต้น ไม่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่มีรูปแบบแน่นอน ระหว่าง ยีน หรือระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์เนื้องอกมดลูก และไม่สัมพันธ์กับการเพิ่ม ลดจำนวนของ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเนื้องอกมดลูก ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่านชักมดลูก และสาร ASPP-049 ไม่ได้มีผลให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงใดต่อเซลล์อย่างชัดเจน

มีข้อน่าสังเกตว่า มีการแสดงออกของยีนตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ผิวเซลล์ (G protein estrogen receptor, GPER) ในเซลล์ที่มาจากกล้ามเนื้อเรียบและเนื้องอกมดลูก ซึ่งแตกต่างจากตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear estrogen receptor) ซึ่งสูญหายไประหว่างการย่อยเนื้อเยื่อ แสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจน ที่ให้ในกลุ่มควบคุมไม่ได้มีการทำงานผ่านตัวรับเอสโตรเจนชนิดที่อยู่ผิวเซลล์นี้

อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน GPER ที่สัมพันธ์กับการให้ฮอร์โมนและ สารว่านชักมดลูก

5.5 การศึกษาสารสกัดจากว่านชักมดลูกและสาร ASPP-049 ต่อ ภาวะ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อ เรียบที่แยกจากเนื้องอก myoma และกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เป็น เซลล์มีชีวิต (live cells) ร้อยละ 3-7 ที่เป็นเซลล์ตาย (apoptosis) และเพียงร้อยละ 1-3 เท่านั้นที่อยู่ในระยะเริ่มตาย (early apoptosis) ร้อยละของเซลล์ในระยะมีชีวิต ระยะตาย และระยะเริ่มตายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และกล้ามเนื้อมดลูกที่ได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูก เอสโตรเจนและสารต้านเอสโตรเจนไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ใช้ในการศึกษานี้คือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีข้อขัดข้องในการเลี้ยงเซลล์ทำให้มีจำนวนเซลล์ไม่พอสำหรับการทดลองอีก 1-2 ความเข้มข้น

ร้อยละของเซลล์มีชีวิต ตาย เริ่มตายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และกล้ามเนื้อมดลูกที่ได้รับสาร ASPP-049 เอสโตรเจนและสารต้านเอสโตรเจนไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเซลล์ที่ได้รับ ASPP-049 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งพบร้อยละของจำนวนเซลล์เริ่มตายสูงขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ก็สอดคล้องกับการ ทดลอง วัดการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวิธี MTT ข้อ 4.1 และ 4.2

5.6 การศึกษาสารสกัดจากว่านชักมดลูกและสาร ASPP-049 ต่อวงจรเซลล์ (cell cycle) ของเซลล์ myoma และกล้ามเนื้อมดลูกบริเวณใกล้เคียง

เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะพัก (G0) หรือระยะแรก (G1) เซลล์จำนวนน้อยที่เหลืออยู่ในระยะกำลัง แบ่งเซลล์ เช่น เซลล์ในระยะ S และ G2/M และเซลล์มีจำนวนไม่มากเช่นเดียวกันที่อยู่ในระยะตาย ยกเว้น เซลล์กลุ่มที่ได้รับ ASPP ความเข้มข้น 50 uM ทั้งไม่ได้และได้ ICI ร่วมด้วย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผล การศึกษาสอดคล้องกับการการศึกษา apoptosis โดยการทำ Flow cytometer ในหัวข้อ 5.5

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 ได้ข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารสกัดว่านชักมดลูก Crude extract *C. comosa* และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 โดยที่ไม่พบการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกมดลูก

5.2 ได้ข้อมูลการออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากมดลูก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากเนื้องอกมดลูก โดยที่ที่ความเข้มข้นสูงทั้งว่านสกัด Crude extract *C. comosa* และ ASPP-049 (มากกว่าหรือเท่ากับ 50 ug/ml และ 50 μ M ตามลำดับ จะให้ผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์

5.3 การที่สารสกัดว่านชักมดลูก Crude extract *C. comosa* และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ไม่ได้ออกกระตุ้นเซลล์อย่างชัดเจนอาจจะเนื่องจาก สารทั้งสองไม่ได้ทำงานผ่าน estrogen receptor ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า เอสโตรเจนไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ (positive control) ประกอบกับข้อมูลการตรวจโปรตีน estrogen receptor โดยเทคนิค Western blot และ การตรวจการแสดงออกของยีนโดย QT PCR พบการหายไปของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ภายหลังการย่อยเนื้อเยื่อ

5.4 Primary cell culture ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากมดลูกปกติ และจากเนื้องอกมดลูก ไม่เหมาะสมที่จะเป็น model เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เนื่องจากตัวรับเอสโตรเจนสูญหายไป จากการเพาะเลี้ยง และย่อยสลายเนื้อเยื่อ

5.5 เอสโตรเจน สารสกัดว่านชักมดลูก Crude extract *C. comosa* และสารบริสุทธิ์ ASPP-049 ไม่ได้ทำงานผ่าน ตัวรับเอสโตรเจนที่ผิวเซลล์ (GPER) ทั้งนี้เนื่องจากตัวรับยังคงมีการแสดงออกตลอด แต่ไม่พบการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการให้เอสโตรเจน

5.6 เพื่อที่จะศึกษาฤทธิ์ของ *C. comosa* ต่อเนื้องอกมดลูก ให้ชัดเจนเพิ่มขึ้น อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อ ได้แก่ การใช้ immortalized cell line ที่ทำจากเนื้องอกมดลูก หรือการใช้การศึกษารูปแบบอื่น อาทิ เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (organotypic culture) ตลอดจนการศึกษาทางคลินิกเป็นต้น

อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยใช้ immortalized cell line นั้น ไม่พบว่ามีเซลล์จัดจำหน่ายทั้งภายในและภายนอกประเทศ ผู้วิจัยได้ลองพยายามสืบค้น และพบว่า มีนักวิทยาศาสตร์ในต่างประเทศหนึ่งท่าน ที่เคยทำ immortalized cell line ไว้ศึกษาวิจัย ผู้วิจัยได้พยายามติดต่อเพื่อขอเซลล์มาทำการศึกษา แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นในการศึกษาในอนาคต จะเปลี่ยนรูปแบบการศึกษา เช่นใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และให้สารต่างๆ ดูการตอบสนองของเนื้อเยื่อแทนเซลล์ เป็นต้น

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D., & Schectman, J. M. (2003). High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol*, 188(1), 100-107.
- Bakas, P., Liapis, A., Vlahopoulos, S., Giner, M., Logotheti, S., Creatsas, G., et al. (2008). Estrogen receptor alpha and beta in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. *Fertil Steril*, 90(5), 1878-1885. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.019
- Benes, P., Vetvicka, V., & Fusek, M. (2008). Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol*, 68(1), 12-28. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.02.008
- Blake, R. E. (2007). Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth. *J Natl Med Assoc*, 99(10), 1170-1184.
- Catherino, W. H., Leppert, P. C., Stenmark, M. H., Payson, M., Potlog-Nahari, C., Nieman, L. K., et al. (2004). Reduced dermatopontin expression is a molecular link between uterine leiomyomas and keloids. *Genes Chromosomes Cancer*, 40(3), 204-217. doi: 10.1002/gcc.20035
- Chen, W., Ohara, N., Wang, J., Xu, Q., Liu, J., Morikawa, A., et al. (2006). A novel selective progesterone receptor modulator asoprisnil (J867) inhibits proliferation and induces apoptosis in cultured human uterine leiomyoma cells in the absence of comparable effects on myometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(4), 1296-1304. doi: 10.1210/jc.2005-2379
- Ferenczy, A., Richart, R. M., & Okagaki, T. (1971). A comparative ultrastructural study of leiomyosarcoma, cellular leiomyoma, and leiomyoma of the uterus. *Cancer*, 28(4), 1004-1018.
- Koike, M., Shibata, M., Ohsawa, Y., Nakanishi, H., Koga, T., Kametaka, S., et al. (2003). Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol Cell Neurosci*, 22(2), 146-161.
- Maruo, T., Ohara, N., Wang, J., & Matsuo, H. (2004). Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update*, 10(3), 207-220. doi: 10.1093/humupd/dmh019
- Murphy, A. A., Morales, A. J., Kettel, L. M., & Yen, S. S. (1995). Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestosterone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril*, 64(1), 187-190.
- Piyachaturawat, P., Ercharuporn, S., & Suksamrarn, A. (1995a). Estrogenic activity of *Curcuma Comosa* in rats. *Asia Pacific J Pharmacol*, 10, 121-126.
- Piyachaturawat, P., Ercharuporn, S., & Suksamrarn, A. (1995b). Uterotrophic effect of *Curcuma Comosa* in rats. *Int J Pharmacognosy*, 33, 334-338.

- Piyachaturawat, P., Charoenpiboonsin, J., Toskulkao, C., & Suksamrarn, A. (1999). Reduction of plasma cholesterol by Curcuma comosa extract in hypercholesterolaemic hamsters. *J Ethnopharmacol*, 66(2), 199-204.
- Piyachaturawat, P., Teeratagolpissal, N., Toskulkao, C., & Suksamrarn, A. (1997). Hypolipidemic effect of Curcuma comosa in mice. *Artery*, 22(5), 233-241.
- Rein, M. S., Barbieri, R. L., & Friedman, A. J. (1995). Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol*, 172(1 Pt 1), 14-18.
- Sadan, O., van Iddekinge, B., van Gelderen, C. J., Savage, N., Becker, P. J., van der Walt, L. A., et al. (1987). Oestrogen and progesterone receptor concentrations in leiomyoma and normal myometrium. *Ann Clin Biochem*, 24 (Pt 3), 263-267.
- Sadovsky, Y., Riemer, R. K., & Roberts, J. M. (1992). The concentration of estrogen receptors in rabbit uterine myocytes decreases in culture. *Am J Obstet Gynecol*, 167(6), 1631-1635.
- Sampath, D., Zhu, Y., Winneker, R. C., & Zhang, Z. (2001). Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(4), 1707-1715. doi: 10.1210/jcem.86.4.7423
- Severino, M. F., Murray, M. J., Brandon, D. D., Clinton, G. M., Burry, K. A., & Novy, M. J. (1996). Rapid loss of oestrogen and progesterone receptors in human leiomyoma and myometrial explant cultures. *Mol Hum Reprod*, 2(11), 823-828.
- Soules, M. R., & McCarty, K. S., Jr. (1982). Leiomyomas: steroid receptor content. Variation within normal menstrual cycles. *Am J Obstet Gynecol*, 143(1), 6-11.
- Sozen, I., & Arici, A. (2006). Cellular biology of myomas: interaction of sex steroids with cytokines and growth factors. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 33(1), 41-58. doi: 10.1016/j.ogc.2005.12.005
- Stewart, E. A., Friedman, A. J., Peck, K., & Nowak, R. A. (1994). Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 79(3), 900-906.
- Suksamrarn, A., Ponglikitmongkol, M., Wongkrajang, K., Chindaduang, A., Kittidanairak, S., Jankam, A., et al. (2008). Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of Curcuma comosa: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorg Med Chem*, 16(14), 6891-6902.
- Tamaya, T., Fujimoto, J., & Okada, H. (1985). Comparison of cellular levels of steroid receptors in uterine leiomyoma and myometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 64(4), 307-309.
- Verkauf, B. S. (1992). Myomectomy for fertility enhancement and preservation. *Fertil Steril*, 58(1), 1-15.

- Weerachayaphorn, J., Chuncharunee, A., Mahagita, C., Lewchalermwongse, B., Suksamrarn, A., & Piyachaturawat, P. (2011). A protective effect of *Curcuma comosa* Roxb. on bone loss in estrogen deficient mice. *J Ethnopharmacol*, 137(2), 956-962.
- Wilson, E. A., Yang, F., & Rees, E. D. (1980). Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues. *Obstet Gynecol*, 55(1), 20-24.
- Winuthayanon, W., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., Burns, K. A., Arao, Y., Hewitt, S. C., et al. (2013). The natural estrogenic compound diarylheptanoid (D3): in vitro mechanisms of action and in vivo uterine responses via estrogen receptor alpha. *Environ Health Perspect*, 121(4), 433-439. doi: 10.1289/ehp.1206122
- Winuthayanon, W., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., Ponglikitmongkol, M., Arao, Y., Hewitt, S. C., 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), 1155-1161.
- Winuthayanon, W., Suksen, K., Boonchird, C., Chuncharunee, A., Ponglikitmongkol, M., Suksamrarn, A., et al. (2009). Estrogenic activity of diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. Requires metabolic activation. *J Agric Food Chem*, 57(3), 840-845.

ผู้รับผิดชอบงานวิจัย ประกอบด้วย

1. หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. พญ. อารีย์พรรณ โสภณสฤษฏ์สุข (Areepan Sophonsritsuk)

หมายเลขบัตรประชาชน 3 1015 00215 34 5

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ภาควิชา สติศาสตร์ นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนน พระราม 6 เขตราชเทวี กทม. 10400

โทรศัพท์ 02-2011412, 02-2012185 โทรสาร 02-2011416

Email: areepan.sop@mahidol.ac.th

ลักษณะของงาน: ออกแบบการทดลอง ดำเนินการทดลอง วิเคราะห์ผล สรุปผล และเขียน
รายงาน

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย = 30 %

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

2.1 รศ. พญ. มยุรี จิรภิญโญ

หมายเลขบัตรประชาชน 3 1015 02005 275

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ภาควิชา สติศาสตร์ นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail: mayuree.jir@mahidol.ac.th

ลักษณะของงาน: ออกแบบการทดลอง

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย = 10 %

2.2 นางสาวเสาวณีย์ กาญจนชุมพล

หมายเลขบัตรประชาชน 3869900020739

ตำแหน่งปัจจุบัน เทคนิคการแพทย์ ชำนาญการพิเศษ

สำนักงานวิจัยวิชาการและนวัตกรรม โรงพยาบาลรามคำแหง

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ลักษณะของงาน: ดำเนินการทดลอง วิเคราะห์ผล สรุปผล

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย = 20 %

2.3 นางสาววรรณวิสา ไวยพุด

หมายเลขบัตรประชาชน 11014 00922 221

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยวิจัย

ภาควิชา มหาวิทยาลัยมหิดล

ลักษณะของงาน: ดำเนินการทดลอง วิเคราะห์ผล สรุปผล
สัดส่วนทำงานวิจัย = 15 %

2.4 ศ. ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์

หมายเลขบัตรประชาชน 3 1014 00145 442

ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ ระดับ 10

ภาควิชา สรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail: pawinee.pia@mahidol.ac.th

ลักษณะของงาน: วิเคราะห์ผล สรุปผล และเขียนรายงาน
สัดส่วนทำงานวิจัย = 25 %