



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม ภาวะเครียดออก
ซิเดชั่นและการแสดงออกของยีนในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ
ซึมเศร้าโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลา
นาน

โดย ดร.เยาวเรศ ชูลิขิต

มีนาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม ภาวะเครียดออก
ซิเดชั่นและการแสดงออกของยีนในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ
ซึมเศร้าโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลา
นาน

ผู้วิจัย ดร.เยาวเรศ ชูลิขิต

สังกัด คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอกและสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยเรื่อง “ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม ภาวะเครียดออกซิเดชันและการแสดงออกของยีนในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน” ฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนทุนในการทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีพ.ศ. 2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง และงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคำชี้แนะของคณะกรรมการวิชาการของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในการกำกับติดตาม การดำเนินงานตลอดช่วงของการดำเนินการวิจัย และให้การตรวจแก้ไขและให้ข้อเสนอแนะในช่วงนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ และขอขอบคุณ รศ.ดร.โอภา วัชรคุปต์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาการวิจัย และได้ให้คำแนะนำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย และขอขอบคุณคณาจารย์ และบุคลากรของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำงานครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ผู้บริหาร คณะเภสัชศาสตร์ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้โอกาส ทั้งสนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งสถานที่ทำวิจัย ให้เวลาในการทำงานวิจัยครั้งนี้อย่างเต็มที่

เยาวเรศ ชูลิขิต

ผู้วิจัย

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	iii
สารบัญภาพประกอบ	iv
Executive summary	v
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
1 บทนำ	3
2. วิธีการทดลอง	6
3. ผลการทดลอง	16
4. บทสรุปและวิจารณ์	24
5.หนังสืออ้างอิง	27
ภาคผนวก	29
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ.และสกว.	42
บทความสำหรับเผยแพร่	44

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 Stress protocol	9
2 Summary of the primer pair for house keeping gene (β -actin), stress-related genes (BDNF, CREB) and product length.	14

สารบัญภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของเคอร์คูมิน	4
รูปที่ 2 Tail suspension test apparatus	7
รูปที่ 3 The effect of curcumin on immobility time in tail suspension test in normal mice.	16
รูปที่ 4 The effect of curcumin on locomotor activity in Open field test in normal mice.	17
รูปที่ 5 The effect of curcumin on sucrose consumption	18
รูปที่ 6 The effect of curcumin on the forced swimming test in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS)	18
รูปที่ 7 The effect of curcumin on the tail suspension test in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS)	19
รูปที่ 8 The effect of curcumin on locomotor activity in Open field test in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS)	20
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde	20
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin	21
รูปที่ 11 The effect of curcumin on UCMS induced lipid peroxidation in whole brain ICR mice	21
รูปที่ 12 The effect of curcumin on relative BDNF and CREB mRNA expression in hippocampus area	22
รูปที่ 13 The effect of curcumin on relative BDNF and CREB mRNA expression in frontal cortex	23

Executive summary

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คูมินในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูทดลอง โดยแรกเริ่มได้ทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในหนูปกติ ด้วยวิธีทดสอบ tail suspension test (TST) พบว่าเคอร์คูมิน 20 mg/kg สามารถที่จะลดค่า immobility time ในหนูลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity นั่นก็แสดงว่าค่า immobility time ที่ลดลงนั้นในหนูที่ได้รับเคอร์คูมิน 20 mg/kg เป็นผลมาจากการที่เคอร์คูมินออกฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้า โดยให้ผลเช่นเดียวกันกับ ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg ซึ่งสามารถที่จะลด immobility time โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในแบบจำลอง unpredictable chronic mild stress ต่อไป เพื่อดูถึงผลของการให้ยาในระยะยาว และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินผ่านการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้าด้วย โดยหนูทดลองถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า จากนั้นวัด anhedonia behavior ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะซึมเศร้าอันหนึ่ง โดยวิธี sucrose consumption จากการทดลองพบว่าในสัปดาห์ที่ 0 เริ่มทำการทดลองหนูทุกกลุ่มจะมีปริมาณการบริโภคซูโครสเท่าๆกันคือประมาณ 78-79 g/kg body weight หนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการบริโภคซูโครสลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆสัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียดเลย และเมื่อได้รับเคอร์คูมินขนาด 20 mg/kg ติดต่อกันทุกวันในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าการบริโภคน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ผลเช่นเดียวกันกับ ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg และการทดสอบด้วยวิธี forced swimming test (FST) และ TST ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบพฤติกรรมซึมเศร้า ก็พบว่าเคอร์คูมินขนาด 20 mg/kg สามารถที่จะลด immobility time ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพร้อมกับน้ำกระสายยา นอกจากนี้ยังพบว่า ในหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF mRNA ในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และเมื่อได้รับเคอร์คูมินในขนาด 20 mg/kg/day สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้กลับคืนมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการให้ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg/day เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดเป็นเวลานานที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการต้านภาวะซึมเศร้า ส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่เคอร์คูมินสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF mRNA

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5280173

ชื่อโครงการ : ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม ภาวะเครียดออกซิเดชันและการแสดงออกของยีนในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : นางเยาวเรศ ชูลิขิต

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail address : yaosum@kku.ac.th และ yaosum@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 16 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2555

เคอร์คูมินเป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากขมิ้นชัน ในตำรับยาจีนมีการใช้เคอร์คูมินเป็นส่วนประกอบสำคัญในการรักษาภาวะเครียดและโรคซึมเศร้า Unpredictable chronic mild stress (UCMS) เป็นแบบจำลองที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ซึ่งหนูที่ได้รับยาด้านซึมเศร้าสามารถที่มีพฤติกรรมกลับคืนสู่สภาวะปกติได้ การวิจัยครั้งนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าที่เกิดจากการได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์ หนูที่ได้รับเคอร์คูมินจะได้รับยาในขนาด 10 และ 20 mg/kg/day เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ยาด้านซึมเศร้ามาตรฐานที่ใช้ในครั้งนี้คือ Imipramine 20 mg/kg/day เมื่อครบเวลาทำการวัดพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ผลการทดสอบพบว่า หนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานมีการบริโภคซูโครสที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และหนูที่ได้รับเคอร์คูมินหรือ imipramine ขนาด 20 mg/kg/day จะมีการบริโภคซูโครสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดเพียงอย่างเดียว และในแบบทดสอบ forced swimming test (FST) และ tail suspension test (TST) พบว่าหนูที่ได้รับความเครียดจะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อได้รับเคอร์คูมิน หรือ imipramine ขนาด 20 mg/kg/day ค่า immobility time จะลดลง โดยที่ locomotor activity นั้นไม่เปลี่ยนแปลง จากการทดสอบด้วย open field test (OFT) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินนั้น น่าจะมาจากการที่เคอร์คูมินนั้นสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF และ CREB mRNA ในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ได้เช่นเดียวกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการให้ความเครียดต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ในสมอง พบว่า การเกิด lipid peroxidation ในสมองนั้นไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ ความเครียด จากผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า เคอร์คูมินนั้นมีศักยภาพในการรักษาภาวะซึมเศร้าได้ โดยผ่านกลไกในการเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF และ CREB mRNA

คำหลัก : เคอร์คูมิน, โรคซึมเศร้า, พฤติกรรมซึมเศร้า, ภาวะเครียดออกซิเดชัน

Abstract

Project code : MRG5280173

Project Title : The effect of curcumin on chronic mild stress-induced the alteration of behavioral activity, oxidative stress and gene expression in mice model of depression

Investigator : Ms.Yaowared Chulikhit

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khonkaen University

E-mail address : yaosum@kku.ac.th และ yaosum@yahoo.com

Project period : 16 March 2009 – 15 March 2012

Curcumin, a yellow pigment extracted from rhizomes of *Curcuma longa*, is the major constituent of Xiaoyao-san, the traditional Chinese medicine for managing the mental stress and depressive-related disorder. Unpredictable chronic mild stress (UCMS) has long been used as a model of depression. Antidepressant can reverse most effect of UCMS. We hypothesized that curcumin may alleviate stress induced behavioral change. Thus in the present study, we assessed whether curcumin treatment affect behavior alteration in UCMS treated ICR mice. Mice were exposed to UCMS for 5 weeks and anhedonia behavior which is the most commonly behavior used to measure the inability to gain pleasure from enjoyable experiences was evaluated by weekly monitoring of sucrose consumption. Curcumin (10 and 20 mg/kg/day, i.p.) or imipramine (20 mg/kg/day, i.p.) or vehicle were continuously administered the last two weeks of UCMS. Behavioral test were performed over the last week of UCMS. The results showed that UCMS mice decreased the sucrose intake, increased the immobility time in forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST). Long term treatment of curcumin and imipramine reversed the anhedonia behavior and significantly reduced immobility time. In locomotor activity, stress mice did not show significantly difference compared to non-stress mice. Curcumin and imipramine did not alter the locomotor activity. In addition, UCMS procedure did not significantly induced the lipid peroxidation in mice whole brain and curcumin did not show inhibitory effect on lipid peroxidation. The mechanism underlying the antidepressive-like activity of curcumin may be involved in its increasing the BDNF and CREB mRNA expression in hippocampus and frontal cortex of UCMS mice. Thus curcumin may be the effective therapeutic for depression as was seen within these stress models.

Keyword : Curcumin, Depression, Depressive behavior and Oxidative stress

ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม ภาวะเครียดออกซิเดชันและการแสดงออกของยีนในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

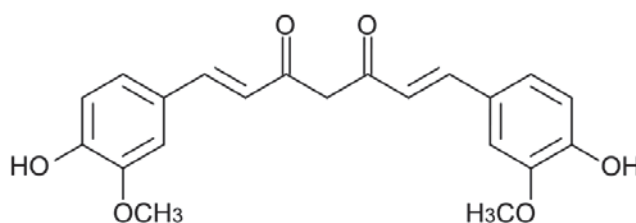
1. บทนำ

โรคซึมเศร้า เป็นความผิดปกติของสมองที่มีผลกระทบต่อความนึกคิด อารมณ์ ความรู้สึก พฤติกรรมและสุขภาพกาย เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ในปัจจุบันโรคซึมเศร้าได้กลายเป็นปัญหาสำคัญ มีผู้ป่วยเป็นโรคซึมเศร้า 17-27% ของประชากรโลก และจะทวีความรุนแรงและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากสภาวะแวดล้อมและสังคมในโลกปัจจุบัน ปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยโรคซึมเศร้าในประเทศไทย 5% ของจำนวนประชากรทั้งหมด หรือกว่า 3 ล้านคน ซึ่งถือว่าค่อนข้างเยอะ และนำไปสู่การสูญเสียสมรรถภาพของบุคคล และเศรษฐกิจทางสังคม ความสูญเสียทางสุขภาพที่เกิดจากโรคซึมเศร้านี้ WHO (2001) ได้จัดลำดับโรคทางจิตเวชอยู่ใน 20 อันดับแรกถึง 3 โรคซึ่งเป็นกลุ่มที่นำไปสู่การมีคุณภาพชีวิตที่แย่ (Disease burden) และได้ประมาณการว่าโรคซึมเศร้ารุนแรงจะเป็นภาระต่อสังคมเศรษฐกิจ จากอันดับ 7 ในปี 1990 เป็นอันดับ 1 เคียงคู่กับโรคหัวใจขาดเลือด ในปี 2020 ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่สังคมเร่งตระหนักว่า ภาวะซึมเศร้าเป็นโรคๆหนึ่ง ซึ่งไม่ใช่นิสัยหรือกิจวัตรปกติของคนๆ หนึ่ง (รณชัย คงสกนธ์ และคณะ, 2548)

การรักษาโรคซึมเศร้า ประกอบด้วยการรักษาหลายแบบ เช่น จิตบำบัด การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม การให้คำแนะนำ และการจัดการกับความเครียดที่เป็นสาเหตุของโรคร่วมกับการให้กำลังใจ ประคับประคองทางจิตใจ ในรายที่เป็นไม่รุนแรง ส่วนในรายที่เป็นรุนแรงอาจต้องมีการได้รับยาอย่างสม่ำเสมอ หรือเข้ารับการรักษาทันทีในโรงพยาบาล ยาด้านภาวะซึมเศร้าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันแบ่งได้เป็นหลายชนิดด้วยกัน ยาที่มีใช้กันอยู่ดั้งเดิมคือยากลุ่ม Tricyclic antidepressant เช่น amitriptyline, imipramine, desipramine และ ยาที่ใช้รักษาโรคจิต เช่น haloperidol และ thioridazine ซึ่งต่อมาพบว่ายาสองกลุ่มนี้ ก่อให้เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ทำหัวใจเต้นผิดจังหวะ ยากลุ่มที่ได้รับการพัฒนาต่อมาคือ ยาด้านการซึมเศร้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการดึงกลับของเซโรโทนินอย่าง เฉพาะเจาะจง ได้แก่ยา fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine เป็นต้น แม้ว่ายากลุ่มนี้ให้ผลการรักษาผู้ป่วยไม่แตกต่างไปจากยากลุ่มดั้งเดิม แต่ก็เป็นที่นิยมอย่างมากในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา ทั้งนี้เนื่องมาจากว่ายากลุ่มนี้มีพิษต่อระบบหัวใจน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม จากการติดตามอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา พบว่าการใช้ยากลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ และคลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติ ในคนไข้ที่ไม่เคยมีประวัติโรคหัวใจมาก่อน ดังนั้น จึงเริ่มมีการทบทวนถึงความปลอดภัยในการใช้ยากลุ่มนี้มากขึ้น (Pacher P and Kecskemeti V., 2004)

ปัจจุบันแนวความคิดค้นและพัฒนาากลุ่มใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาโรคซึมเศร้า จึงมุ่งเน้นไปหาสารจากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากสารจากธรรมชาติ สมุนไพร มีการใช้มานาน และกว้างขวาง มีความปลอดภัยสูง สารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด ถูกนำมาเป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่มากมาย St. John's wort (*Hypericum perforatum*) เป็นพืชสมุนไพรตัวแรกที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ต้านการซึมเศร้าที่ดี และมีผลข้างเคียงน้อย ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา มีการศึกษามากมายที่ยืนยันว่าสารสกัด St. John's wort ให้ผลการรักษาโรคซึมเศร้าในได้ดีพอๆกับยาต้านการซึมเศร้าที่มีอยู่เดิมทั้งในคนยุโรปและสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าสารสกัดนี้มีผลเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายยาต่างๆมากมาย ซึ่งอาจจะส่งผลในคนไข้ที่ได้รับยาหลายตัวร่วมกัน (Schulz V. , 2006; Bilia AR และคณะ, 2002) ดังนั้น การคิดค้นพัฒนายาต้านภาวะซึมเศร้าตัวใหม่จึงยังเป็นที่น่าสนใจศึกษาต่อไป สารสกัด St. John's wort ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมาย หนึ่งในสารประกอบที่น่าสนใจคือสาร ฟลาโวนอยด์ จากการศึกษาของ Butterweck V. และคณะ พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่ม xanthone ที่ได้จาก St. John's wort มีฤทธิ์ต้านการซึมเศร้าในหนูทดลอง (Butterweck V. et al., 2000)

เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารสกัดจากส่วนรากของขมิ้นชัน (*Curcuma Longa L.*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้กันมาแต่ดั้งเดิมในตำรับยาและอาหารของไทย เคอร์คูมินมีโครงสร้างดังรูปที่ 1 จัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมายทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง (Mythri RB และ Bharath MM., 2012; Schaffer M. et al., 2011) มีฤทธิ์ปกป้องสมองจากการถูกทำลายด้วย kainic acid ซึ่งเป็น neurotoxin ที่ทำให้เกิดการชัก และทำลายสมอง (Yaowared et al., 2006) ในประเทศจีน ขมิ้นชันจัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในตำรับยาแผนโบราณที่ใช้มากกว่าพันปีในการรักษาโรคที่มีความผิดปกติทางจิต นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมอีกว่า เคอร์คูมินมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ใน C6 glia cell (Mazzio EA. et al., 1998) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายสารสื่อประสาทจำพวกเซโรโทนิน (serotonin) โดปามีน (dopamine) การทำงานที่ผิดปกติของเอนไซม์ตัวนี้เป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะซึมเศร้า



รูปที่ 1 โครงสร้างของเคอร์คูมิน

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะผลของเคอร์คิวมินที่มีต่อพฤติกรรมซึมเศร้าของหนูเม้าส์ทั้งแบบเฉียบพลันด้วยการคัดกรองฤทธิ์อย่างง่ายด้วยแบบจำลอง tail suspension test และแบบเรื้อรังด้วยแบบจำลองหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (chronic mild stress) จากนั้นทำการทดสอบถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรม และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคซึมเศร้า โดยศึกษาเปรียบเทียบผลของเคอร์คิวมินกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ซึ่งแบบจำลองนี้จะมีประโยชน์ในการศึกษาพฤติกรรมและผลของยาในระยะยาว ซึ่งมีความสอดคล้องกับภาวะซึมเศร้าที่พบได้ในมนุษย์ ซึ่งมีการดำเนินโรคเป็นระยะเวลานาน และต้องรักษาด้วยยาอย่างต่อเนื่อง โดย unpredictable chronic mild stress มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดพฤติกรรม anhedonia behavior ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะซึมเศร้าได้เป็นอย่างดี คือ จากที่เคยชอบอะไรก็จะไม่ชอบ และสามารถวัดพฤติกรรมนี้ผ่านทาง sucrose consumption test (Willner P. et al., 1997) และยังศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองหนูด้วย เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าการที่หนูได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานนั้น ทำให้สมองมีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมาก ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและการทำลายเซลล์ประสาทได้

นอกจากนี้ ยังทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของเคอร์คิวมินที่เกี่ยวข้องกับทฤษฎี neurogenesis ซึ่งกล่าวว่าคนไข้เป็นโรคซึมเศร้านั้นจะมีการเสื่อมของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus และสมองส่วนนี้จะปล่อยกลูตาเมตด้วยกันด้วย นั่นจึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำไมการรักษาด้วยยาด้านซึมเศร้านั้น จะต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาอย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ เพื่อที่จะให้เซลล์ประสาทส่วนที่เกี่ยวข้องนั้นได้รับการฟื้นฟู จึงจะเริ่มเห็นอาการของผู้ป่วยตอบสนองไปในทางที่ดีขึ้น และยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท คือ BDNF และ CREB (Bergström A. et al. 2007) ดังนั้น ยีนที่สนใจศึกษาในครั้งนี้จะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคซึมเศร้า ในทฤษฎีของ neurogenesis คือ cAMP response element-binding (CREB) ซึ่งเป็น cellular transcription factor ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีน Brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Duman R.S. et al., 1997 และ Nair A. et al., 2007) และ BDNF mRNA ด้วย โดย BDNF นี้เป็น neurotrophic growth factor ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเซลล์สมอง ที่เราเรียกว่า neurogenesis ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามพบว่าระดับการแสดงออกของยีน BDNF นี้จะลดลง และพบมีการปล่อยของเซลล์สมอง serotonergic neuron ซึ่งทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกทางด้านพฤติกรรมและอารมณ์ นอกจากนี้ความเครียดยังส่งผลให้การแสดงออกของยีนนี้ลดลงอีกด้วย (Marmigere et al., 2003; Ueyama et al., 1997) และการได้รับยาด้านซึมเศร้า สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF นี้ให้กลับคืนสู่สภาวะปกติได้ (Duman and Monteggia, 2006)

2. วิธีการทดลอง

2.1 ทดสอบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าในหนูปกติ โดยใช้แบบทดสอบ Tail suspension test (Screening for antidepressant activity) (Steru et. Al. 1985)

- 1) เลี้ยงหนูเม้าส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นหนูเม้าส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 35-45 กรัม แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 8-10 ตัว ตามการได้รับยาดังนี้

กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับ 0.5 % carbomethoxy cellulose (CMC)

กลุ่ม 2 กลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมิน ขนาด 10 mg/kg

กลุ่ม 3 กลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมิน ขนาด 20 mg/kg

กลุ่ม 4 กลุ่มที่ได้รับ ยาด้านซึมเศร้า Imipramine ขนาด 20 mg/kg

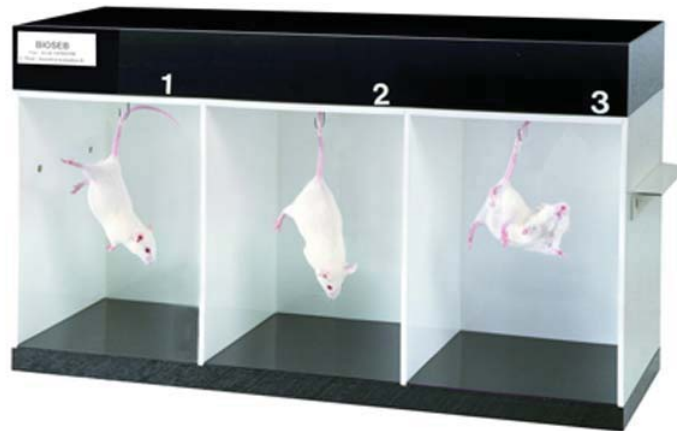
หนูทุกตัวจะต้องถูกชั่งน้ำหนักก่อนได้รับยา หนูทุกตัวจะได้รับน้ำกระสายยา และยาเข้าทางช่องท้อง

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 (กว้างxยาวxสูง) มิลลิเมตร ทั้งหมด 20 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 20 ขวด โดยเลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2) Tail suspension test

หลังจากได้รับยาไปแล้ว 60 นาที หนูแต่ละตัวถูกนำมาทดสอบ tail suspension test ด้วยวิธีของ Steru และคณะ (Steru et. Al. 1985) ซึ่งการทดสอบนี้ จะเป็นแบบทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าของยา โดยภาวะเครียดที่เกิดขึ้นกับหนูเม้าส์ คือการที่หนูถูกแขวนลอยอยู่ในอากาศในท่าทางที่ผิดปกติ คือเอาหัวห้อยลงมา หนูจะพยายามขยับตัว เพื่อหนี หรือให้หลุดพ้นจากการอยู่ในท่าทางแบบนั้น ดังนั้นหนูที่ไม่มีการเคลื่อนไหว หรือไม่พยายามหนี สามารถแปลผลได้จากที่ immobility time ที่สูงว่าหนูตัวนั้นมีพฤติกรรมซึมเศร้า แต่ถ้าในหนูที่ได้รับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน ค่า immobility time จะมีค่าน้อยมาก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว การทดสอบทำได้โดยการนำเทปขาวพันติดที่หางของหนูเม้าส์ ห่างจากปลายหาง

ประมาณ 1 ซม. จากนั้นนำหนูไปแขวนในเครื่องมือ tail suspension apparatus ดังรูป



รูปที่ 2 Tail suspension test apparatus

ทำการจับเวลาทั้งหมด 6 นาที บันทึกค่า Immobility time ในช่วง 4 นาทีสุดท้ายในหนูเมาส์ แต่ละตัว ทำการบันทึกวิดีโอขณะทำการทดลองด้วยทุกครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมช่วยบันทึกเวลา

3) Open field test

Open field test แบบจำลองนี้จะทำการทดสอบ locomotor activity เพื่อดูผลของยาว่ามีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity หรือไม่ โดยทำการวัดจำนวนช่องที่หนูเดิน ในกล่องสี่เหลี่ยม ขนาด 12" x 12" ซึ่งถูกแบ่งพื้นที่เป็นช่องเท่าๆกันจำนวน 16 ช่อง ทำการปล่อยหนูลงไปตรงกลางของกล่องทดสอบ แล้วนับจำนวนช่องที่หนูเดิน ภายในเวลา 5 นาที บันทึกผลเป็นจำนวนช่องที่หนูเดินต่อนาที

2.2 ทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าใน แบบจำลอง Unpredictable chronic mild stress (UCMS model) (Li et al., 2007)

1) เลี้ยงหนูเมาส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็หนูเมาส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 3-4 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 15-20 กรัม แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

- กลุ่มควบคุมปกติ จำนวน 10-12 ตัว

- กลุ่มที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อน ติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จำนวน 48 ตัว

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 (กว้างxยาวxสูง) มิลลิเมตร ทั้งหมด 12 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 12 ขวด โดยได้ทำการเลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุม อุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยทำการเลี้ยง ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ สังเกตและจดบันทึกพฤติกรรมของหนูที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ภาวะความเครียด ความก้าวร้าว ความดุ ความตื่นตระหนก ความสนใจต่อสิ่งต่างๆ รอบตัว เป็นต้น และทำการบันทึกน้ำหนักหนู สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2) Unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures (Willner P. et al., 1987)

ก่อนที่จะแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความเครียด จะต้องนำหนู แม้าส์ ทั้งหมดมาทดสอบการบริโภคสารละลายน้ำตาลซูโครสก่อน (sucrose consumption test) เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับหนูแต่ละตัว การทำ sucrose consumption ทำได้ โดย ให้นำหนูแม้าส์ อุดอาหารและน้ำ ก่อนที่จะทดสอบ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นให้ สารละลายน้ำตาลซูโครส 2% กับหนูแม้าส์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณปริมาณ ซูโครสที่หนูแต่ละตัวได้รับเข้าไปในช่วงเวลาดังกล่าว ทำซ้ำอย่างนี้เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำ ข้อมูลที่ได้มาจัดแบ่งกลุ่มหนูแบบสุ่มให้มีความแปรปรวนของข้อมูลการบริโภคสารละลาย ซูโครส 2% น้อยที่สุดในแต่ละกลุ่ม หนูกลุ่มควบคุมจะไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิด ความเครียด ส่วนหนูกลุ่มที่เป็น UCMS group จะได้รับสิ่งกระตุ้นต่างๆให้เกิดภาวะ ความเครียดสะสม การให้ความเครียดอย่างอ่อนประกอบด้วย การอดอาหารและงดน้ำ, การ ทำกรงเอียง 45°, การจำกัดการเข้าถึงอาหาร, การให้ขวดเปล่าที่ไม่บรรจุน้ำ, การจับหนูอยู่ เป็นคู่, การให้เสียงรบกวน, การทำกรงเปียก, การให้ไฟแสงสว่างตลอดทั้งคืน, การกลับ light/dark cycle โดยทำการกระตุ้นทั้งหมด 5 สัปดาห์ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

Protocol I: Chronic Mild Stress Activity (CMS) schedule

Activity/Days	Thu	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed
- Food and water deprivation (18h)	Thu; 15.00 – Fri; 9.00						
- Sucrose preference (1h)		9.00 – 10.00					
- Tiled cage 45° (12h)	8.00 – 20.00		Sat; 22.00 – Sun; 10.00				
- Restricted access to food 5 micro pellets (1h)		20.00 – 21.00			16.00 – 17.00		
- Exposure to empty bottle (3h)			9.00 – 12.00		19.00 – 22.00		
- Wet cage 200 ml water in 100 g sawdust bedding (21h)						Tue; 13.00 – Wed; 10.00	
- Light exposure (36h)	Thu; 18.00			Sun; 6.00 – Mon; 18.00			Wed; 6.00 –
- Intermittent sound (3h, 5h)			12.00 – 17.00			16.00 – 21.00	
- Paired caging (2h)	20.00 – 22.00	14.00 – 16.00					

3) การให้ยาในหนูเม้าส์

หนูเม้าส์ ถูกแบ่งกลุ่มการให้ยาที่แตกต่างกันดังตาราง

กลุ่มที่	Treatment
1. หนู nonstress	0.5% carboxymethyl cellulose
2. หนู UCMS	0.5% carboxymethyl cellulose
3. หนู UCMS	Curcumin 10 mg/kg
4. หนู UCMS	Curcumin 20 mg/kg
7. หนู UCMS	Imipramine 20 mg/kg

หนูเม้าส์ จะเริ่มได้รับยาตั้งแต่วันที่ 22 ถึงวันที่ 35 ของการทำ Unpredictable chronic mild stress และจะทำการบริหารยาเข้าทางช่องท้องใน ช่วงเวลา 9.00-11.00 น. ในวันสุดท้ายของการให้ยา จะทำการทดสอบการ เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคซูโครส

4) Sucrose consumption test

ก่อนที่จะทดสอบจะต้องให้หนูอดอาหารและน้ำก่อนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวก่อนการบริโภคน้ำตาลทุกครั้ง ให้สารละลายน้ำตาล ซูโครส 2% กับหนูเม้าส์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณปริมาณซูโครสที่ หนูเม้าส์แต่ละตัวได้รับเข้าไปในช่วงเวลาดังกล่าว เปรียบเทียบผลการทดลอง ระหว่างหนู nonstress, หนูที่ได้รับ UCMS และหนูที่ได้รับ UCMS+เคอร์คิวมิน 10 mg/kg และ UCMS+เคอร์คิวมิน 20 mg/kg ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร นอกจากนี้ให้เปรียบเทียบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงการบริโภคสารละลาย ซูโครสเทียบกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg

5) ทดสอบ Forced swimming test ในหนูเม้าส์ที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็น ระยะเวลาานาน (Porsolt R.D. et al., 1979)

แบบจำลอง Forced swimming test เป็นแบบจำลองที่ใช้ทดสอบภาวะ ซึมเศร้าในหนูเม้าส์ โดยการปล่อยหนูเม้าส์ลงว่ายน้ำในถังน้ำแคบๆที่ไม่มีทางหนี หนูเม้าส์ที่ไม่มีความพยายามว่ายน้ำหรือตะเกียกตะกายเพื่อหนีออกจากถังน้ำ จะ

มีค่า Immobility time สูง แต่ถ้าหนูที่ได้รับยาต้านซึมเศร้า จะมีค่า Immobility time ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนทำการทดสอบ forced swimming test 1 วัน จะต้องทำการฝึกหนูเมาส์ให้ว่ายน้ำ ในถังแก้วทรงกระบอกขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 22 ซม. ซึ่งบรรจุน้ำสูงประมาณ 10 ซม. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้หนูเมาส์ ได้รู้สภาวะที่ไม่มีทางหนี หลังการให้ยา ไปแล้ว 30 นาที ทำการทดสอบพฤติกรรมหนู

- Forced swimming test โดยวัดเป็นเวลาทีหนูเมาส์ไม่มีการเคลื่อนไหว หลังจากทีปล่อยลงสู่ถังน้ำ เวลาที่หนูอยู่ในถังน้ำ คือ 6 นาที แต่จะจับเวลาในช่วง 4 นาทีสุดท้าย โดยจะทำการการบันทึกภาพวิดีโอตลอดการทดลองเพื่อสังเกต พฤติกรรมหนูแต่ละตัวทีได้รับ treatment ที่ต่างกัน

6) Tail suspension test

หลังจากได้รับยาไปแล้ว 60 นาที หนูแต่ละตัวถูกนำมาทดสอบ tail suspension test ด้วยวิธีของ Steru และคณะ (Steru et. Al. 1985) ซึ่งการทดสอบ นี้ จะเป็นแบบทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือคัดกรองฤทธิ์ในการต้าน ซึมเศร้าของยา โดยภาวะเครียดทีเกิดขึ้นกับหนูเมาส์ คือการทีหนูถูกแขวนลอยอยู่ ในอากาศในท่าทางทีผิดธรรมชาติ คือเอาหัวห้อยลงมา หนูจะพยายามขยับตัว เพื่อ หนี หรือให้หลุดพ้นจากการอยู่ในท่าทางแบบนั้น ดังนั้นหนูทีไม่มีการเคลื่อนไหว หรือไม่พยายามหนี สามารถแปลผลได้จากที immobility time ทีสูงกว่าหนูตัวนั้น มี พฤติกรรมซึมเศร้า แต่ถ้าในหนูทีได้รับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ค่า immobility time จะมีค่าน้อยมาก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูทีได้รับเพียงน้ำกระสาย ยาเพียงอย่างเดียว การทดสอบทำไดโดยการนำเทปกาวพันติดทีหางของหนูเมาส์ ห่างจากปลายหางประมาณ 1 ซม. จากนั้นนำหนูไปแขวนในเครื่องมือ tail suspension apparatus

ทำการจับเวลาทั้งหมด 6 นาที บันทึกค่า Immobility time ในช่วง 4 นาทีสุดท้าย ในหนูเมาส์ แต่ละตัว ทำการบันทึกวิดีโอขณะทำการทดลองด้วยทุกครั้ง และ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมช่วยบันทึกเวลา

7) Open field test

Open field test แบบจำลองนี้จะทำการทดสอบ locomotor activity เพื่อดูผลของ ยาว่ามีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity หรือไม่ โดยทำการวัดจำนวนช่องที หนูเดิน ในกล่องสี่เหลี่ยม ขนาด 12" x 12" ซึ่งถูกแบ่งพื้นที่เป็นช่องเท่าๆกัน

จำนวน 16 ช่อง ทำการปล่อยหนูลงไปตรงกลางของกล่องทดสอบ แล้วนับจำนวนช่องที่หนูเดิน ภายในเวลา 5 นาที บันทึกผลเป็นจำนวนช่องที่หนูเดินต่อนาที

2.3 ศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid assay ในสมองหนูเม้าส์ที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (Okawa et al. 1979)

2.3.1 ความสามารถของสารเคอร์คูมินในการยับยั้งขบวนการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์สมองถูกทดสอบโดยวิธี thiobarbituric acid assay เมื่อทดสอบพฤติกรรมเสร็จแล้ว หลังจากนั้นหนึ่งชั่วโมง หนูเม้าส์จะถูกฆ่า โดยการ perfusion ด้วยน้ำเกลือเข้าที่ตับ หรือหัวใจ เพื่อไล่และล้างเลือดออกจากตัวสัตว์ให้หมดหรือมากที่สุด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสมอง (whole brain exclude cerebellum) และทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80°C ขบวนการเกิด lipid peroxidation จะถูกประเมินโดยการวัดปริมาณของ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการ lipid oxidation ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ได้สารสีม่วงเกิดขึ้น จากนั้นทำการวัดปริมาณโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 nm ปริมาณ malondialdehyde ที่เกิดขึ้นสามารถคำนวณเทียบได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde และจะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford เทียบกับ bovine serum albumin ด้วย ในทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

วิธีการนี้อาศัยหลักการที่สารประกอบโปรตีนในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสาร Coomassie brilliant blue G-250 ในสภาวะที่เป็นกรด แล้วทำให้สารละลายเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 595 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง ของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA สำหรับทำกราฟมาตรฐานดังตาราง

Concentration of BSA (mg/ml)		0	0.2	0.4	0.8
BSA stock solution (2mg/ml)	ul	0	5	10	20
Water	ul	50	45	40	30
Bradford reagent	ml	2.5	2.5	2.5	2.5

และเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ดังตารางข้างล่างนี้

Brain homogenate	4 ul
Water	46 ul
Bradford reagent	2.5 ml

ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง = $[(\text{Abs}_{595} - b)/m] \times (50/4)$

เมื่อสมการของเส้นกราฟมาตรฐานเป็น $y = mx + b$

หมายเหตุ Bradford reagent เตรียมได้จากการเจือจางสารละลาย Concentrate Protein Assay (BioRad®) ในอัตราส่วนดังนี้

Concentrate Protein Assay : water = 1:4

2.4 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of BDNF, และ CREB ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า

เมื่อทดสอบพฤติกรรมเสร็จแล้ว หลังจากนั้น หนึ่งชั่วโมง หนูเมาส์จะถูกฆ่า โดยการ perfusion ด้วยน้ำเกลือเข้าที่ตับ หรือหัวใจ เพื่อไล่และล้างเลือดออกจากตัวสัตว์ให้หมดหรือมากที่สุด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสมอง ส่วน hippocampus และ fronton cortex ของหนูเมาส์ทุกตัว ไว้ที่ -80°C สำหรับการเตรียม total RNA, ทำ PCR product และ run gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า เช่น BDNF และ CREB gene โดยเปรียบเทียบกับแสดงออกของ house keeping gene ; b-actin ในแต่ละตัวอย่าง

2.4.1 Total RNA extraction

ทำการ Homogenize tissue samples ใน TRIZOL reagent ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเติม 0.2 ml ของ chloroform ลงไปและปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที สารละลายผสมจะแยกออกเป็นสองชั้น จากนั้น ปิเปตส่วนใสด้านบนอย่างระมัดระวังใส่ใน tube อันใหม่. เติม 0.5 ml ของ isopropyl alcohol ต่อ 1 ml of TRIZOL Reagent ทำการ Incubate ตัวอย่างที่ $15 - 30^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะได้ตะกอนของ RNA ซึ่งมีลักษณะคล้าย gel-like pellet ตกอยู่ด้านล่างของ tube ค่อยๆเทส่วน supernatant ออกแล้วทำการล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol 1 ml เขย่าผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $7,500 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนซ้ำอีกครั้ง

หนึ่ง ปั่นให้ตะกอน RNA แห้ง แล้วทำการละลาย RNA pellet ด้วย 40 μ l RNase free water เก็บรักษา RNA stock solution ที่ -20 °C

Reverse transcription

Pipette 2 μ l ของ 0.5 μ g/ μ l RNA sample ใส่ใน nuclease-free microcentrifuge tube จากนั้นเติม 1 μ l oligo (dT) 12-18 mers, 4 μ l 10 mM dNTP Mix (10 mM each dATP, dGTP, dCTP and dTTP at neutral pH) และ RNase free water ปรับให้ได้ปริมาตร 10 μ l นำสารผสมที่ได้ส่งไปเครื่อง PCR ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C for 5 min แล้วเก็บใส่ใน ice box จากนั้นเติม 4 μ l 5X First-Strand Buffer, 2 μ l 0.1 M DTT, 0.2 μ l RNase Inhibitor, 0.8 μ l RNase free water และ 1 μ l (200 units) of M-MLV R ผสมให้เข้ากัน นำไป Incubate 50 min at 37 °C และ inactivate the reaction by heating at 70 °C for 15 min.

ตารางที่ 2 Summary of the primer pair for house keeping gene (β -actin), stress-related genes (BDNF, CREB) and product length.

Gene	Primer Sequence	Product length
	Top line : forward primer	
	Bottom line : reverse primer	
β -actin	5'-AAC GGT CTC ACG TCA GTG TA-3' 5'-GTG ACA GCA TTG CTT CTG TG-3'	220 bp
BDNF	5'-GAC AAG GCA ACT TGG CCT AC-3' 5'-CCT GTC ACA CAC GCT CAG CTC-3'	334 bp
CREB	5'-TAC CCA GGG AGG AGC AAT AC-3' 5'-GAG GCA GCT TGA ACA ACA AC-3'	183 bp

Semi-quantitative RT-PCR

The PCR reaction mixture ประกอบด้วย 1 μ l of cDNA, 4 μ l of 5x PCR buffer, 2 μ l of deoxynucleoside triphosphate mixture, 2 μ l of magnesium chloride, 2 μ l of primer pair (Table 2) , 0.4 μ l of Taq polymerase และ 8.6 μ l of distilled water ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 20 μ l. นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วตั้งโปรแกรม preheating cycle at 95 °C เป็นเวลา 2 min, แล้วทำ PCR cycle จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60 °C

เป็นเวลา 1 นาที, elongation 72°C เป็นเวลา 2 นาที และ extension step ต่อที่ 72°C อีกเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ PCR products ไป run acrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำไปวิเคราะห์และถ่ายรูป photographed under UV light and analyzed by GeneSnap and Gene Tools Match Software

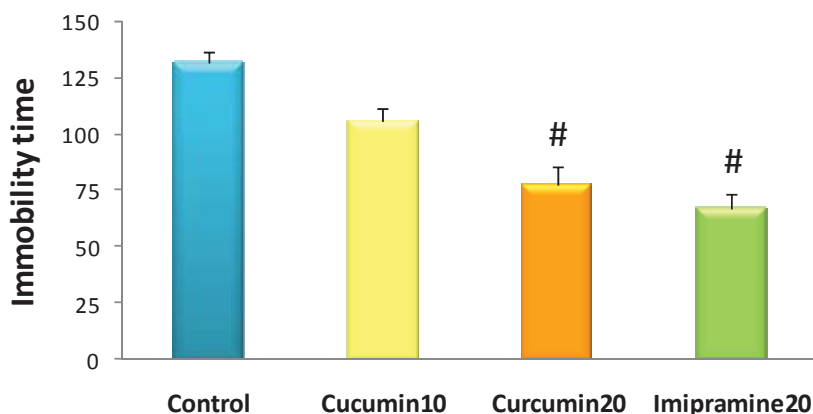
2.5 การวิเคราะห์ด้วยสถิติ

ข้อมูลถูกแสดงเป็น Mean $\pm$ S.E.M. และวิเคราะห์สถิติโดยใช้ t-test ระหว่างกลุ่ม non-stress group และ UCMS group และใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่ม แล้วตามด้วย Student–Newman–Keuls test ถ้าค่า $p < 0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

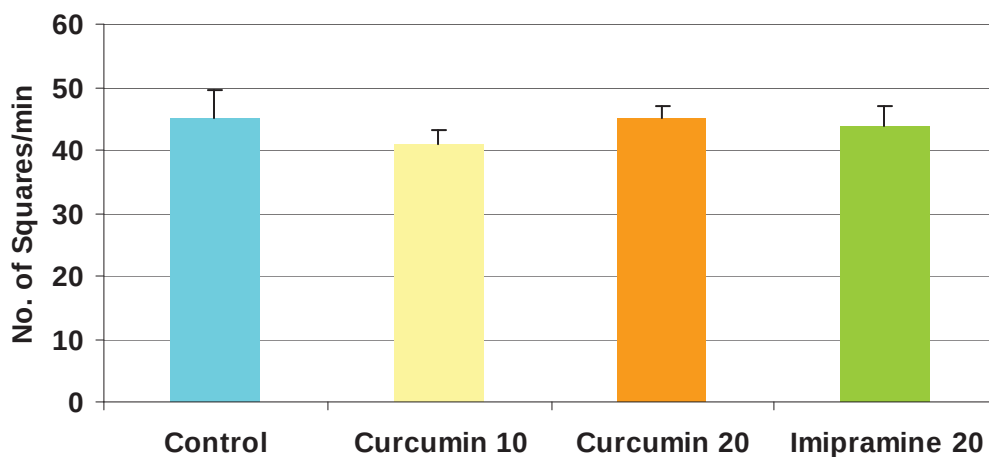
3. ผลการทดลอง

3.1 ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าในหนูปกติ ในแบบทดสอบ Tail suspension test

จากผลการทดลองพบว่าเคอร์คูมินขนาด 20mg/kg สามารถลด immobility time ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และลดได้ไม่แตกต่างกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ขนาด 20mg/kg (รูปที่ 3) และเพื่อต้องการตรวจสอบว่าผลในการลด Immobility time นั้น ไม่ได้มีผลมากจากการที่ยาหรือเคอร์คูมินนั้นไปมีผลต่อ locomotor activity จึงได้ทำการทดสอบ locomotor activity ด้วยวิธี open field test ด้วย พบว่า เคอร์คูมิน และ Imipramine ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity (รูปที่ 4) ดังนั้นสรุปได้ว่า เคอร์คูมินน่าจะมีฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าได้ จึงต้องทำการศึกษาต่อไปในแบบจำลองภาวะซึมเศร้า Unpredictable chronic mild stress (UCMS) ซึ่งแบบจำลองนี้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าใกล้เคียงกับภาวะการเกิดโรคในมนุษย์มากที่สุด และการรักษาก็ต้องใช้การให้ยาอย่างต่อเนื่องด้วย



รูปที่ 3 The effect of curcumin on immobility time in tail suspension test in normal mice. Each column represents mean $\pm$ S.E.M (n=8-12). # $P < 0.05$ vs control.



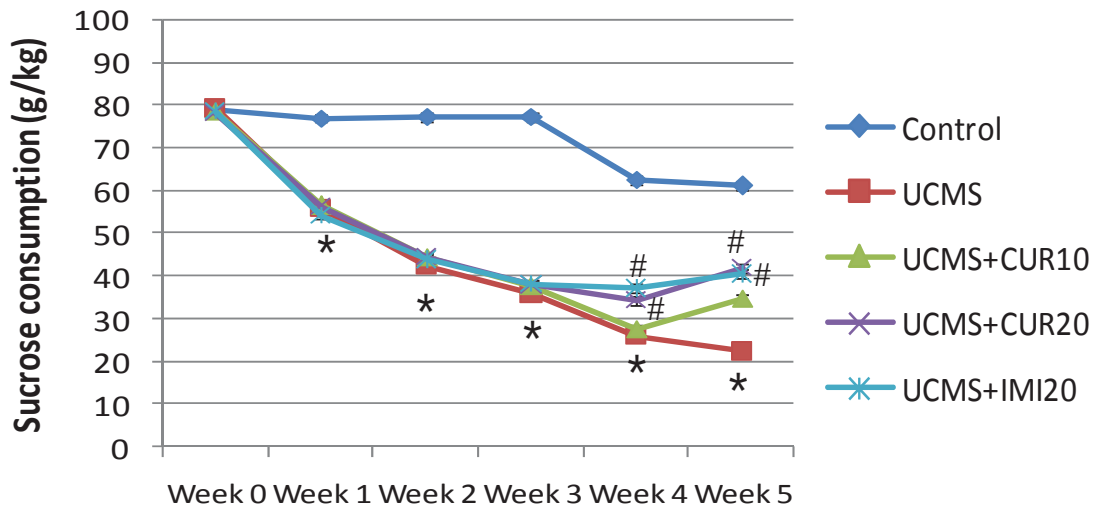
รูปที่ 4 The effect of curcumin on locomotor activity in Open field test in normal mice.

Each column represents mean $\pm$ S.E.M (n=8-12). # $P < 0.05$ vs control.

3.2 ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าใน แบบจำลอง Unpredictable chronic mild stress (UCMS model)

3.2.1 ผลของเคอร์คูมินต่อการบริโภคน้ำตาลซูโครสในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

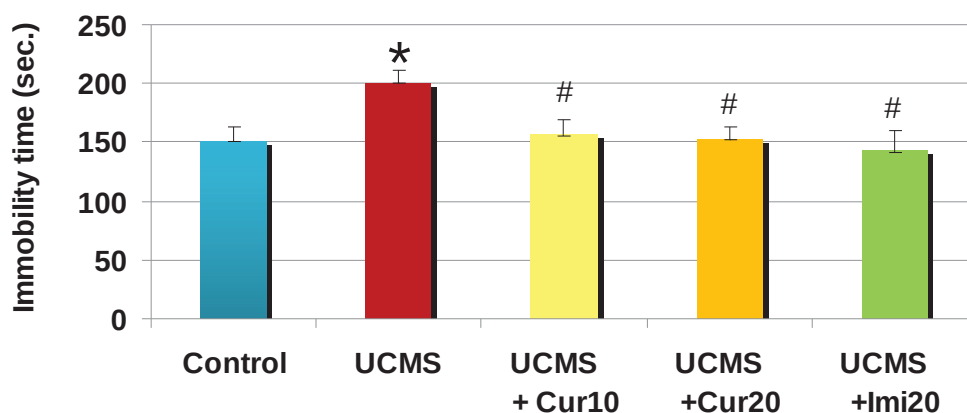
จากกราฟในรูปที่ 5 พบว่าปริมาณการบริโภคซูโครสจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับภาวะความเครียด โดยการบริโภคน้ำตาลจะลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 หลังการได้รับความเครียด และลดลงเรื่อยๆ ในสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 หนูกลุ่มควบคุมบริโภคน้ำตาลได้น้อยลงอาจจะเป็นผลมาจากการที่หนูได้รับความเครียดจากการที่ถูกฉีดยาทุกวันในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จึงอาจจะเกิดภาวะเครียดได้เล็กน้อย และหนูที่ได้รับภาวะเครียดร่วมกับการได้รับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg และ curcumin 20 mg/kg สามารถที่จะบริโภคน้ำตาลได้เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับภาวะเครียดร่วมกับ 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) หลังได้รับยาในสัปดาห์ที่ 4 และ 5



รูปที่ 5 The effect of curcumin on sucrose consumption of mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS). Data expressed as mean $\pm$ S.E.M., n=10-12. Chronic treatment of curcumin (10, 20 mg/kg, i.p.) was given the last 2 weeks of the 5 week unpredictable chronic mild stress procedure. *P<0.001 compared with non-stress control group; #P<0.05 compared with UCMS group.

3.2.2 ผลของเคอร์คูมินต่อการ immobility time ในแบบทดสอบ forced swimming test ในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

จากการทดลองพบว่าหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูที่ได้รับการความเครียดร่วมกับการได้รับเคอร์คูมิน (10 และ 20 mg/kg, i.p.) จะมีค่า immobility time ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียด และเคอร์คูมินสามารถที่จะลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine (20 mg/kg, i.p.) ดังรูปที่ 6

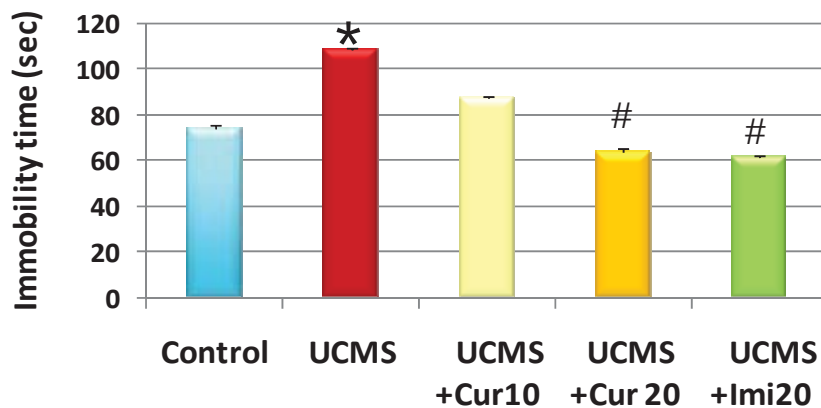


รูปที่ 6 The effect of curcumin on the forced swimming test in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS). Data expressed as mean $\pm$ S.E.M., n=8-

12. * $P < 0.05$ compared with non-stress control group; # $P < 0.05$ compared with UCMS group.

3.2.3 ผลของเคอร์คูมินต่อการ immobility time ในแบบทดสอบ tail suspension test ในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

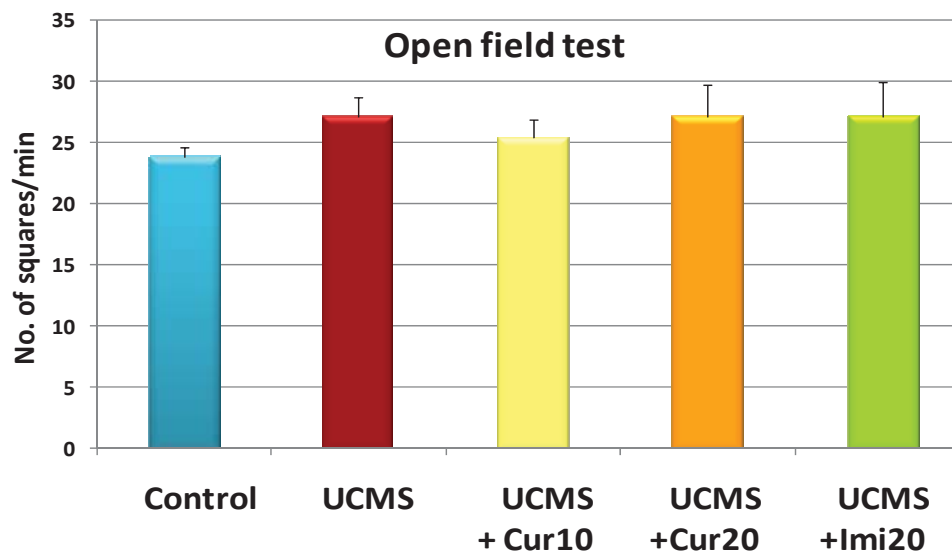
จากการทดลองพบว่าหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการให้เคอร์คูมิน (10 และ 20 mg/kg, i.p.) ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 อาทิตย์ สามารถที่จะลดค่า immobility time ในหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนลงได้ และลดลงแบบ dose dependent ด้วย และเคอร์คูมินสามารถที่จะลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ที่ขนาด 20 mg/kg, i.p. ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 The effect of curcumin on the tail suspension test in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS). Data expressed as mean $\pm$ S.E.M., $n=8-12$. * $P < 0.05$ compared with non-stress control group; # $P < 0.05$ compared with UCMS group.

3.2.4 ผลของเคอร์คูมินต่อการ locomotor activity ในแบบทดสอบ open field test ในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

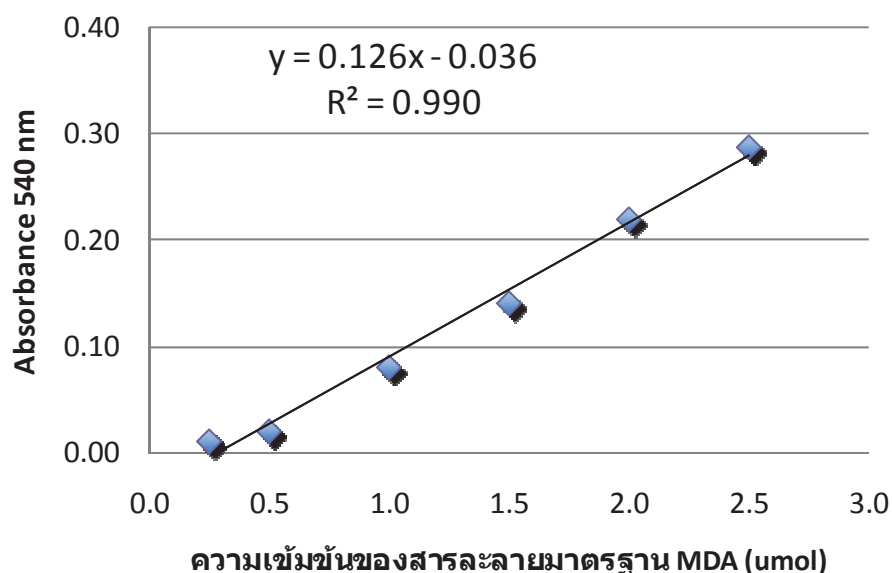
จากการทดลองพบว่า การให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และ curcumin และ imipramine ก็ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 The effect of curcumin on locomotor activity in Open field test in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS). Each column represents mean $\pm$ S.E.M (n=8-12).

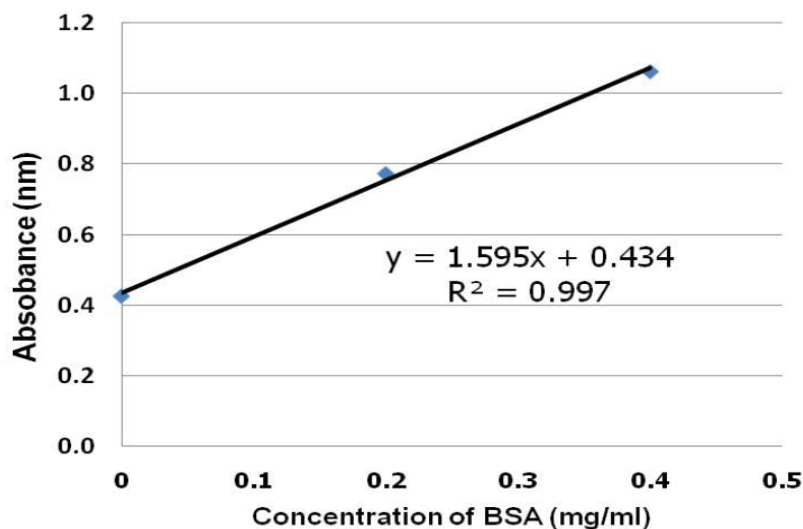
3.3 ผลของเคอร์คูมินในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid assay ในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

3.3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี TBAR method



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde

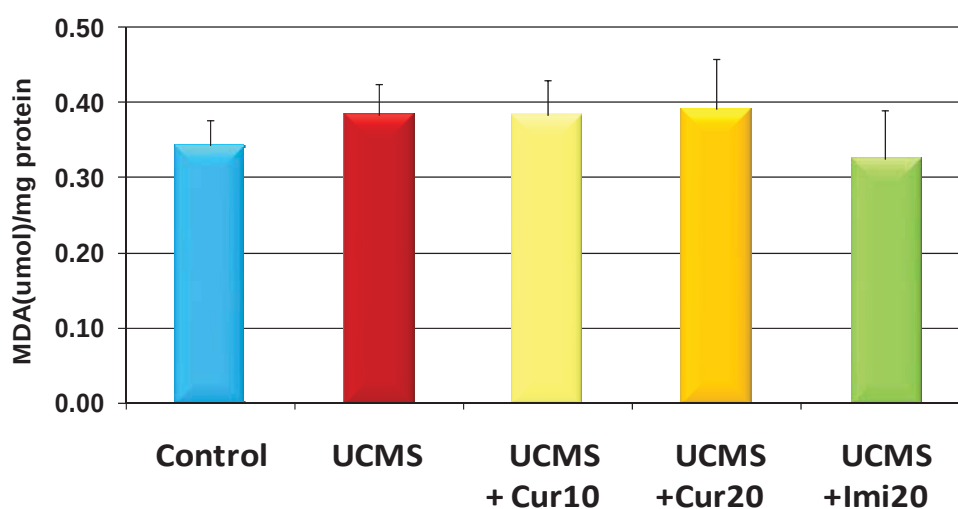
3.3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin

3.3.3 ผลของ UCMS ในการเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation และ ผลของเคอร์คูมินในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับ UCMS

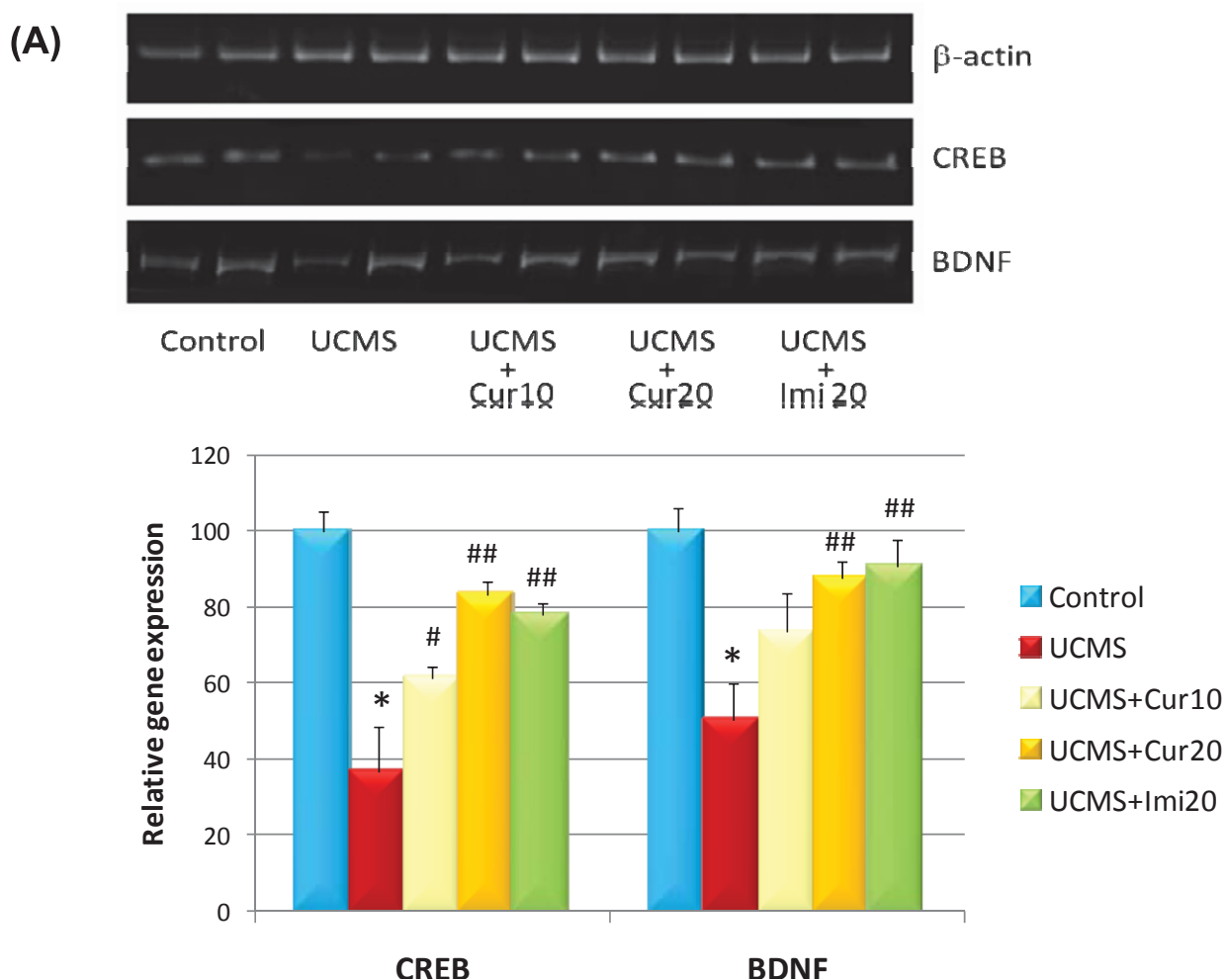
การให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์ ไม่สามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ในสมองมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และการได้รับเคอร์คูมิน หรือ imipramine ติดต่อกัน 2 สัปดาห์ก็ไม่ได้มีผลเปลี่ยนแปลงการเกิด lipid peroxidation ของสมองเลย ดังแสดงในรูปที่ 11



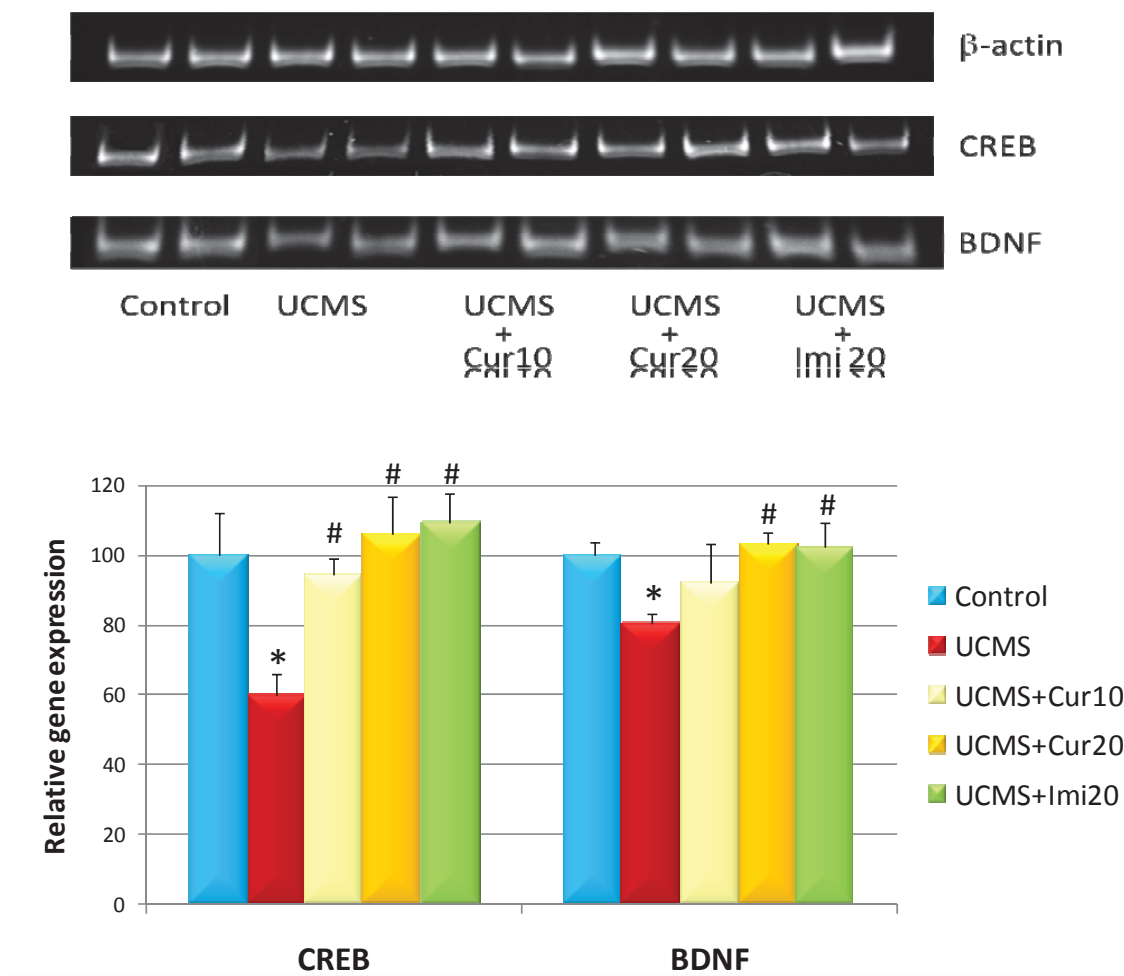
รูปที่ 11 The effect of curcumin on UCMS induced lipid peroxidation in whole brain ICR mice. Data expressed as mean ± SD., n=5.

3.4 ผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน BDNF, และ CREB ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า ในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ของหนูไมซ์ที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

จากการทดลองพบว่าการให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีผลลดการแสดงออกของ BDNF และ CREB mRNA ทั้งในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูได้รับเคอร์คูมินร่วมกับการได้รับความเครียดอย่างอ่อน พบว่าเคอร์คูมินขนาด 10 mg/kg, i.p. ที่สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB mRNA ได้ทั้งสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex แต่ในขนาดยาที่สูงขึ้น เคอร์คูมินสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ได้ทั้งสอง เช่นเดียวกับกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine



รูปที่ 12 The effect of curcumin on relative BDNF and CREB mRNA expression in hippocampus of non-stress and UCMS mice (mean $\pm$ S.E.M, n=3-4), (*P<0.01 vs control group and #P<0.05, ##P<0.01 vs UCMS group)



รูปที่ 13 The effect of curcumin on relative BDNF and CREB mRNA expression in frontal cortex of non-stress and UCMS mice (mean $\pm$ S.E.M, n=3-4), (* $P < 0.05$ vs control group and # $P < 0.05$ vs UCMS group)

4. บทสรุปและวิจารณ์

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คูมินในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูทดลอง โดยแรกเริ่มได้ทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในหนูปกติ ด้วยวิธีทดสอบ tail suspension test (TST) พบว่าเคอร์คูมิน 20 mg/kg สามารถที่จะลดค่า immobility time ในหนูลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity นั่นก็แสดงว่าค่า immobility time ที่ลดลงนั้นในหนูที่ได้รับเคอร์คูมิน 20 mg/kg เป็นผลมาจากการที่เคอร์คูมินออกฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้า โดยให้ผลเช่นเดียวกันกับ ยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg ซึ่งสามารถที่จะลด immobility time โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในแบบจำลอง unpredictable chronic mild stress ต่อไป เพื่อดูถึงผลของการให้ยาในระยะยาว และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินผ่านการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้าด้วย

หนูทดลองถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า จากนั้นวัด anhedonia behavior ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะซึมเศร้าอันหนึ่ง โดยวิธี sucrose consumption จากการทดลองพบว่าในสัปดาห์ที่ 0 เริ่มทำการทดลองหนูทุกกลุ่มจะมีปริมาณการบริโภคซูโครสเท่าๆกันคือประมาณ 78-79 g/kg body weight หนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการบริโภคซูโครสลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆสัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียดเลย และเมื่อได้รับเคอร์คูมินขนาด 20 mg/kg ติดต่อกันทุกวันในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าการบริโภคน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ผลเช่นเดียวกันกับ ยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg และการทดสอบด้วยวิธี FST และ TST ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบพฤติกรรมซึมเศร้า ก็พบว่าเคอร์คูมินขนาด 20 mg/kg สามารถที่จะลด immobility time ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพร้อมกับน้ำกระสายยา ดังนั้นจากการทดสอบทางด้านพฤติกรรม จึงได้ข้อสรุปว่าเคอร์คูมินนั้นมีผลต้านภาวะซึมเศร้าได้ในหนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน โดยกลไกการออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินนั้นส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่เคอร์คูมินมีผลเพิ่มการแสดงออกของ BDNF และ CREB mRNA จากการทดสอบด้วยวิธี reverse transcription และ polymerase chain reaction เนื่องจากผลการศึกษาพบว่า หนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้การแสดงออกของยีนสองตัวนี้ลดลงอย่างมากโดยเฉพาะในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ควบคุมเกี่ยวกับการเรียนรู้และการแสดงออกทางด้านอารมณ์และพฤติกรรม BDNF เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง neurogenesis การสร้างการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ประสาทและ synapses BDNF จะพบมากในสมองส่วน hippocampus, cortex และ basal forebrain ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความจำ การเรียนรู้ และการแสดงออกทางด้านพฤติกรรมและอารมณ์ (Malberg JE et al., 2005) จากหลายรายงานการศึกษา (Xu et al.

2006, 2007) พบว่า การได้รับความเครียดเป็นระยะเวลานาน และในคนไข้ที่เป็น chronic depression จะมีการแสดงออกของยีนตัวนี้ลดลงอย่างมาก ร่วมกับการที่มีสมองส่วน hippocampus และ cortex ที่ฝ่อเล็กลงมากกว่าปกติ และเมื่อได้รับการรักษาด้วยยาต้านซึมเศร้าอย่างต่อเนื่อง ก็สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้ให้กลับสู่ภาวะปกติได้ และยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีน BDNF นี้คือ CREB CREB เป็น cellular transcription factor ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีนหลายๆตัวเช่น BDNF, neuropeptide, tyrosine hydroxylase เป็นต้น CREB protein ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสมองหลายอย่างที่สำคัญ คือกระบวนการสร้าง long term memories และ survival ของเซลล์ประสาท ดังนั้นทั้ง CREB และ BDNF จึงทำงานร่วมกันในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์สมอง การเรียนรู้และการสร้างความจำ การศึกษาครั้งนี้พบว่าในหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และเมื่อได้รับเคอร์คูมินในขนาด 20 mg/kg/day สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้กลับคืนมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการให้ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg/day เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดเป็นระยะเวลานานที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการต้านภาวะซึมเศร้า ส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่เคอร์คูมินสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานการศึกษาว่า เคอร์คูมินนั้นยังมียฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายสารสื่อประสาทจำพวกเอมีน เช่น serotonin, dopamine และ norepinephrine ทำให้ระดับของสารสื่อประสาทนี้เพิ่มมากขึ้นในสมองอีกด้วย (Bhutani MK. et. al. 2009) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินผ่านกลไกด้านอื่นๆยังจำเป็นที่จะต้องทำต่อไปเพื่อ ยืนยันการออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมิน

นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ ยังได้ศึกษาผลของการได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานต่อการเกิด lipid peroxidation ในสมองด้วย โดยศึกษาใน whole brain ด้วยวิธี Thiobarbituric acid method และใช้ malondialdehyde เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบการเกิด lipid peroxidation ผลการศึกษาพบว่า การได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ไม่ได้มีผลเพิ่มการเกิด lipid peroxidation ในสมอง ผลการศึกษานี้อาจไม่เป็นไปในทางเดียวกันกับสมมุติฐานที่ว่าความเครียดสามารถที่จะเหนี่ยวนำการเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากในสมอง อาจเนื่องมาจากสมองส่วนที่ได้รับผลกระทบโดยตรงภายใต้แบบจำลอง UCMS นั้น อาจจะเป็นสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ถ้าทำการทดลองโดยการแยกเฉพาะส่วนนี้มาทำการทดสอบ lipid peroxidation อาจจะเห็นความแตกต่างที่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้ แต่ในการทดลองครั้งครั้งใช้ส่วน whole brain จึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นความแตกต่างได้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า เคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าได้ทั้งในหนูปกติ และหนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ในแบบจำลอง UCMS โดยกลไกการออกฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของเคอร์คูมินนั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่เคอร์คูมินสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ neurogenesis และ survival ของ neuron ในสมอง โดยเฉพาะส่วน hippocampus และ frontal cortex ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ การแสดงออกทางด้านพฤติกรรมและอารมณ์ โดยผลของเคอร์คูมินนั้น ให้ผลเช่นเดียวกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ทั้งในด้านการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า

5. หนังสืออ้างอิง

- รณชัย คงสกนธ์, วีระเดช วีระพงศ์เศรษฐ์ และ อัญชลี เตมียะประดิษฐ์. ปัจจัยเสี่ยงของโรคซึมเศร้า การประชุมวิชาการสุขภาพจิตนานาชาติ, ครั้งที่ 4, เรื่องสุขภาพจิตกับภัยพิบัติ, วันที่ 6-8 กรกฎาคม 2548 ณ โรงแรมปรีณซ์พาเลซ, กรุงเทพมหานคร, หน้า 176.
- Bergström A, Jayatissa MN, Thykjaer T, Wiborg O. Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study. *J Mol Neurosci*. 2007; 33(2): 201-15.
- Bhutani MK, Bishnoi M, Kulkarni SK. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 ;92(1): 39-43.
- Bilia AR, Gallori S and Vincieri FF. St. John's wort and depression, Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sci* 2002; 70: 3077-96
- Butterweck V, Jurgenliemk G, Nahrstedt A and Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 2000; 66(1): 3-6.
- Duman R.S., Heninger G.R., Nestler E.J. A molecular and cellular theory of depression *Arch. Gen. Psychiatry*, 54 (1997), pp. 597–606
- Duman R.S., Monteggia L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders *Biol. Psychiatry*, 59 (2006), pp. 1116–112
- Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci*. 2008 Apr 23;82(17-18):934-42.
- Malberg JE, Blendy JA. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; Dec;26(12):631-8
- Marmigere F., Givalois L., Rage F., Arancibia S., Tapia-Arancibia L. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*, 2003; 13, pp. 646–65
- Mazzio EA, Harris N, Soliman KF. Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. *Planta Med*. 1998 Oct;64(7):603-6.
- Mythri RB, Bharath MM. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*. 2012;18(1):91-9.
- Nair A., Vadodaria K.C., Banerjee S.B., Benekareddy M., Dias B.G., Duman R.S., Vaidya V.A. Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the

- postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 32 (2007), pp. 1504–1519
- Pacher P and Kecskemeti V. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics : new drugs, old concern? *Curr Pharm Des* 2004; 10(20): 2463-75
- Porsolt RD, Deniel M, Jalfre M. Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* 1979 Aug 15;57(4):431-6.
- Schulz V. Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants. *Phytomed* 2006; 13: 199-204
- Schaffer M, Schaffer PM, Zidan J, Bar Sela G. Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(6):588-97.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;85(3):367-70.
- Sumanont Y, Murakami Y, Tohda M, Vajragupta O, Watanabe H, Matsumoto K.. Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin. *Life Sci.* 2006; 78(16):1884-91
- Ueyama T., Kawai Y., Nemoto K., Sekimoto M., Toné S., Senba E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain *Neurosci. Res.*, 28 (1997), pp. 103–110
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S and Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl).* 1987; 93(3):358-64.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Dec;134(4):319-29.
- Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Research.* 2007 Aug 8;11629-18.
- Xu Y, Ku B, Tie L, Yao H, Jiang W, Ma X, Li X.,. Curcumin reverse the effect of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Res.* 2006; 1122, 56-64.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงผลของเคอร์คูมินในแบบทดสอบ Tail suspension test (TST) ในหนูปกติ

treatment	immobolity time (sec.)	ค่าเฉลี่ย	SD	SEM
0.5%CMC	105.043 112.14 131.197 156.14 134.227 148.98 122.93 146.81 136.47 117.44	131.1377	16.75	5.30
Curcumin10	70.824 99.024 100.23 120.498 113.229 81.09 106.72 115.25 117.91 132.91	105.7685	18.72	5.92
Curcumin20	97.255 55.212 54.59 57.968 90.289 54.59 100.2 55.36 98.11 112.8	77.6374	23.94	7.57
Imipramine20	103.711 31.094 64.978 58.847 61.33 101.16 67.43 46.49 66.79 65.29	66.712	21.93	6.94

ตารางที่ 2 แสดงผลของเคอร์คูมินต่อ locomotor activity ในแบบทดสอบ Open field test (OFT)
ในหนูปกติ

Treatment	Body weight	No.of squares/5min	No.of squares/min	ค่าเฉลี่ย	SD.	S.E.M
0.5%CMC	0.04	354	70.8	45.1	12.82	4.53
	0.04	236	47.2			
	0.04	169	33.8			
	0.04	192	38.4			
	0.035	176	35.2			
	0.038	225	45			
	0.035	174	34.8			
	0.032	278	55.6			
Curcumin 10	0.03	160	32	41	6.06	2.14
	0.032	183	36.6			
	0.034	232	46.4			
	0.03	196	39.2			
	0.03	187	37.4			
	0.035	242	48.4			
	0.035	198	39.6			
	0.037	242	48.4			
Curcumin 20	0.028	238	47.6	45	5.70	2.01
	0.035	248	49.6			
	0.033	260	52			
	0.04	191	38.2			
	0.03	188	37.6			
	0.035	220	44			
	0.035	203	40.6			
	0.038	252	50.4			
Imipramine 20	0.03	142	28.4	43.725	9.12	3.22
	0.033	268	53.6			
	0.035	204	40.8			
	0.03	233	46.6			
	0.03	246	49.2			
	0.035	165	33			
	0.038	226	45.2			
	0.035	265	53			

ตารางที่ 3 แสดงผลของเคอร์คูมินต่อการบริโภคน้ำตาลซูโครส ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซีสมีเศร้า โดยการเลี้ยงภายใต้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

Week	ปริมาณการบริโภคน้ำตาล (g/kg body weight)									
	Nonstress	SEM	UCMS	SEM	UCMS+CUR10	SEM	UCMS+CUR20	SEM	UCMS+IMI20	SEM
Week 0	78.74	5.51	79.14	6.63	78.45	5.94	78.19	5.73	78.52	5.63
Week 1	76.95	8.57	55.73	5.18	56.48	5.28	56.27	6.21	54.24	5.72
Week 2	77.26	5.00	42.34	4.75	44.34	4.96	44.56	5.92	43.85	5.36
Week 3	77.20	2.15	35.83	4.59	37.79	4.15	37.88	2.83	38.13	5.17
Week 4	62.39	4.94	25.90	2.54	27.73	4.41	34.31	3.84	37.06	3.79
Week 5	61.07	2.63	22.28	1.99	34.85	4.65	41.99	4.28	40.45	2.74

ตารางที่ 4 แสดงผลของเคอร์คูมินในแบบทดสอบ Forced swimming test (FST) ในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

Group	Immobility Time (sec.)	ค่าเฉลี่ย	SD.	S.E.M
Nonstress	86.34 183.963 173.538 172.726 113.741 121.796 169.117 167.838 170.457	151.05733	34.421743	11.473914
UCMS	213.942 157.304 174.005 204.832 145.857 226.789 171.431 225.849 250.667 270.876 183.981 181.317	200.57083	38.188759	11.024145
UCMS+Cur10	141.113 199.036 117.712 107.357 104.125 176.344 221.759 164.494 139.623 196.761	156.8324	41.271266	13.05112

Group	Immobility Time (sec.)	ค่าเฉลี่ย	SD.	S.E.M
UCMS+Cur20	152.549			
	185.262			
	149.077			
	140.756			
	160.087			
	169.96			
	87.681			
	130.887			
	197.823	152.67578	32.22562	10.741873
UCMS+Imi20	122.907			
	161.307			
	62.75			
	186.743			
	133.875			
	162.798			
	193.577			
	204.184			
	52.44	142.28678	54.847133	18.282378

ตารางที่ 5 แสดงผลของเคอร์คูมินในแบบทดสอบ Tail suspension test (TST) ในหนูที่ถูกเลี้ยง
ภายใต้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

Treatment	Immobility time	ค่าเฉลี่ย	SD	S.E.M
Control	127.412 85.882 67.197 104.211 44.355 57.793 90.602 46.927 70.804 42.881 81.259	74.48	26.71	8.05
UCMS	112.679 110.399 79.152 90.665 96.562 129.997 149.056 152.529 136.592 67.057 85.086 95.306	108.76	27.99	8.08
UCMS+Cur10	40.475 103.338 68.238 140.946 126.12 35.948 95.936 31.334 126.726 103.729	87.28	40.64	12.85
UCMS+CUR20	112.121 89.757 33.522 62.342 45.069 39.161 66.732 65.506	64.28	26.44	9.35

Treatment	Immobility time	ค่าเฉลี่ย	SD	S.E.M
UCMS+IMI20	15.519 60.785 67.132 75.742 117.167 143.241 20.928 20.163 38.272 57.116	61.61	42.22	13.35

ตารางที่ 6 แสดงผลของการให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลง locomotor activity ในหนู ด้วยการทดสอบแบบ Open field test (OFT) และผลของเคอร์คูมิน ต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม

Treatment	OFT (No. of squares/5min)	No. of squares/minute	Average	SD.	S.E.M
Nonstress	174	34.80			
	109	21.80			
	112	22.40			
	166	33.20			
	84	16.80			
	124	24.80			
	110	22.00			
	132	26.40			
	107	21.40			
	125	25.00			
	135	27.00	25.05	5.25	1.58
UCMS	164	32.80			
	136	27.20			
	100	20.00			
	140	28.00			
	132	26.40			
	174	34.80			
	111	22.20			
	112	22.40			
	123	24.60			
	182	36.40			
	147	29.40			
	107	21.40	27.13	5.39	1.56
UCMS+Cur10	153	30.60			
	112	22.40			
	141	28.20			
	67	13.40			
	121	24.20			

Treatment	OFT (No. of squares/5min)	No. of squares/minute	Average	SD.	S.E.M
UCMS+Cur10	156	31.20	25.38	5.23	1.51
	97	19.40			
	150	30.00			
	132	26.40			
	148	29.60			
	125	25.00			
	121	24.20			
UCMS+Cur20	203	40.60	27.12	9.21	2.66
	69	13.80			
	85	17.00			
	218	43.60			
	120	24.00			
	179	35.80			
	122	24.40			
	140	28.00			
	120	24.00			
	153	30.60			
	128	25.60			
	90	18.00			
UCMS+Imi20	190	38.00	27.16	9.22	2.78
	222	44.40			
	172	34.40			
	85	17.00			
	152	30.40			
	107	21.40			
	100	20.00			
	155	31.00			
	76	15.20			
	118	23.60			
	117	23.40			

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน malondialdehyde (MDA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

ความเข้มข้นของ MDA (μmol)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm
0.25	0.012
0.5	0.021
1	0.081
1.5	0.142
2	0.22
2.5	0.288

ตารางที่ 8 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin และค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

ความเข้มข้นของ BSA (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm
0	0.425
0.2	0.773
0.4	1.063
0.8	1.415

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณของ MDA (umol) ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยคำนวณเทียบกับกราฟ
มาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde

Treatment	Abs-1	Abs-2	Average	Concentration of MDA (umol)	Average	SD.
Non-stress	0.131	0.109	0.120	1.24		
	0.136	0.115	0.126	1.28		
	0.089	0.125	0.107	1.13		
	0.13	0.127	0.129	1.31		
	0.136	0.105	0.121	1.24		
	0.108	0.086	0.097	1.06		
	0.106	0.115	0.111	1.16	1.20	0.09
UCMS	0.126	0.138	0.132	1.33		
	0.133	0.109	0.121	1.25		
	0.122	0.109	0.116	1.20		
	0.14	0.101	0.121	1.24		
	0.114	0.117	0.116	1.20	1.25	0.05
UCMS+Cur10	0.131	0.137	0.134	1.35		
	0.119	0.105	0.112	1.17		
	0.098	0.11	0.104	1.11		
	0.09	0.107	0.099	1.07		
	0.112	0.126	0.119	1.23	1.19	0.11
CMS+Cur20	0.134	0.144	0.139	1.39		
	0.125	0.144	0.135	1.35		
	0.113	0.135	0.124	1.27		
	0.131	0.124	0.128	1.30		
	0.156	0.154	0.155	1.52	1.37	0.10
UCMS+Imi20	0.122	0.126	0.124	1.27		
	0.088	0.076	0.082	0.94		
	0.081	0.085	0.083	0.94		
	0.087	0.081	0.084	0.95		
	0.083	0.094	0.089	0.99	1.02	0.14

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณโปรตีน ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารละลายBSA (mg/ml)

Treatment	Abs-1	Abs-2	Average	BSA (mg/ml)	Average	SD.
Nonstress	0.92	0.87	0.89	3.603		
	0.91	0.87	0.89	3.537		
	0.80	0.83	0.82	2.987		
	0.94	0.91	0.92	3.837		
	0.86	0.81	0.84	3.137	0.27	0.03
UCMS	0.78	0.85	0.81	2.963		
	0.87	0.86	0.86	3.363		
	0.88	0.85	0.86	3.225		
	0.90	0.89	0.90	3.625		
	0.79	0.85	0.82	3.025	0.26	0.02
UCMS+Cur10	0.85	0.83	0.84	3.175		
	0.87	0.94	0.90	3.663		
	0.84	0.82	0.83	3.125		
	0.95	0.91	0.93	3.863		
	0.94	0.89	0.92	3.775	0.28	0.03
UCMS+Cur20	0.91	0.91	0.91	3.75		
	0.85	0.75	0.80	2.837		
	0.97	1.02	0.99	4.387		
	0.83	0.84	0.84	3.15		
	0.85	0.82	0.83	3.1	0.28	0.05
UCMS+Imi20	0.85	0.82	0.83	3.125		
	0.96	0.86	0.91	3.725		
	0.86	0.85	0.86	3.3		
	0.98	0.92	0.95	4.037		
	0.82	0.78	0.80	2.875	0.27	0.04

ตารางที่ 11 แสดงผลของการให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานต่อการเกิด lipid peroxidation ในสมองหนู และผลของเคอร์คูมินต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation

Treatment	MDA (umol)	BSA (mg)	MDA/mg protein	Average	SD
Nonstress	1.24	3.60	0.344		
	1.28	3.54	0.363		
	1.14	2.99	0.379		
	1.31	3.84	0.340		
	1.24	3.14	0.289	0.34	0.02
UCMS	1.33	2.96	0.449		
	1.25	3.36	0.371		
	1.20	3.23	0.359		
	1.24	3.63	0.342		
	1.20	3.03	0.398	0.38	0.04
UCMS+Cur10	1.35	3.18	0.425		
	1.18	3.66	0.440		
	1.11	3.13	0.356		
	1.07	3.86	0.368		
	1.23	3.78	0.326	0.38	0.05
UCMS+Cur20	1.39	3.75	0.370		
	1.35	2.84	0.417		
	1.27	4.39	0.290		
	1.30	3.15	0.412		
	1.52	3.10	0.467	0.39	0.08
UCMS+Imi20	1.27	3.13	0.406		
	0.94	3.73	0.291		
	0.94	3.30	0.286		
	0.95	4.04	0.260		
	0.99	2.88	0.382	0.33	0.07

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ.และสกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

กำลังอยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงสาธารณะ

ทำให้เกิดเครือข่ายความร่วมมือในการทำวิจัยศึกษาฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมิน โดยใช้แบบจำลองอื่นๆที่แตกต่างออกไปเพื่อช่วยยืนยันการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมิน และประเมินศักยภาพของเคอร์คูมินในการวิจัยเพื่อเป็นยาต้านซึมเศร้า โดยผู้วิจัยได้รับทุน GRANT-IN-AID FOR GENERAL RESEARCH II ซึ่งเป็นทุนที่ได้รับการสนับสนุนจาก Institute of Natural Medicine, University of Toyama ประเทศญี่ปุ่น โดยได้เดินทางไปทำวิจัยระยะสั้น ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2553-14 พฤศจิกายน 2553 โดยได้ไปศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในแบบจำลอง Learned Helplessness ซึ่งเป็นแบบจำลองโรคซึมเศร้าในหนูไม่ช้ออีกแบบจำลองหนึ่งที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของยาหลายๆตัว และยังได้ศึกษาถึงกลไกของเคอร์คูมินในการปกป้องเซลล์สมองจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร N-methyl-D-aspartate (NMDA) ในแบบจำลอง organotypic hippocampal slice cultures (OHSC) อีกด้วย (เอกสารแนบหมายเลข 1)

เชิงวิชาการ

- มีการพัฒนาการเรียนการสอน โดยนำผลจากการศึกษาที่ได้ไปบูรณาการในรายวิชา การวิเคราะห์เชิงเภสัชศาสตร์ขั้นสูง และ การคัดสรรฤทธิ์ทางยา สำหรับนักศึกษาเภสัชศาสตร์ชั้นปีที่ 5 และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาตามลำดับ และรายละเอียดในหัวข้อนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ของยาต้านซึมเศร้าโดยศึกษาทางด้านพฤติกรรมในหนูไม่ช้อ

- มีการสร้างนักวิจัยใหม่ โดยได้ส่งนักศึกษาระดับปริญญาตรีที่ลงทะเบียนรายวิชาฝึกปฏิบัติทางด้านวิชาชีพเภสัชศาสตร์ ชื่อนายพันธุ์ คงประพันธ์ ไปฝึกปฏิบัติงานวิจัยที่ ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้การดูแลของ Professor Matsumoto KINZO, Division of Medicinal Pharmacology, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama, JAPAN โดยได้รับเงินสนับสนุนการฝึกปฏิบัติวิชาชีพ บางส่วนจากทางมหาวิทยาลัยขอนแก่น หัวข้อวิจัยที่ทำการศึกษาร่วมกัน และมีหัวหน้าโครงการเป็นที่ปรึกษาาร่วมคือ การศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการรักษาภาวะซึมเศร้า โดยใช้แบบจำลอง unpredictable chronic mild stress ในการศึกษา

และต่อยอดผลของเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมวิตกกังวลในหนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (เอกสารแนบหมายเลข 2)

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

3.1 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Keerakul T, Kongraphan P, **Chulikhit Y.** Effects of curcumin on depression and anxiety-like behavior in unpredictable chronic mild stress treated mice. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009. Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Japan, October 15-18, 2009. **(The AFPS Nagai-Sukri Pre-doctoral Poster Presentation Award)** (เอกสารแนบหมายเลข 3)

2. Kongraphan P, Keerakul T. Boonyarat C, and **Chulikhit Y.** Effects of Curcumin on Depression and Anxiety-Like Behavior in Unpredictable Chronic Mild Stress Treated Mice. The 2nd Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research 2010, Mahasarakham, Thailand, February 13-14, 2010 **(Distinction Poster Presentation Award)** (เอกสารแนบหมายเลข 4)

- 3.2 มีการเผยแพร่ผลรายงานการศึกษาฤทธิ์ด้านซึมเศร้าและความวิตกกังวลของเคอร์คูมินในแบบจำลองหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ในหนังสือรายงานการสัมมนาทางวิชาการประจำปี 2010 ของ Institute of Natural medicine, University of Toyama ซึ่งผู้วิจัยได้ไปทำการศึกษาวิจัยในช่วงระยะเวลาสั้นๆ และได้ใส่ผลการศึกษาในรายงานฉบับสมบูรณ์นี้ด้วย (เอกสารแนบหมายเลข 5)

บทความสำหรับการเผยแพร่

ศักยภาพของเคอร์คูมินในการรักษาภาวะซึมเศร้า

ดร.เยาวเรศ ชูลิขิต

โรคซึมเศร้า เป็นความผิดปกติของสมองที่มีผลกระทบต่อความนึกคิด อารมณ์ความรู้สึก พฤติกรรมและสุขภาพกาย เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ในปัจจุบันโรคซึมเศร้าได้กลายเป็นปัญหาสำคัญ มีผู้ป่วยเป็นโรคซึมเศร้า 17-27% ของประชากรโลก และจะทวีความรุนแรงและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากสภาวะแวดล้อมและสังคมในโลกปัจจุบัน ปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยโรคซึมเศร้าในประเทศไทย 5% ของจำนวนประชากรทั้งหมด หรือกว่า 3 ล้านคน ซึ่งถือว่าค่อนข้างเยอะ และนำไปสู่การสูญเสียสมรรถภาพของบุคคล และเศรษฐกิจทางสังคม

การรักษาโรคซึมเศร้า ประกอบด้วยการรักษาหลายแบบ เช่น จิตบำบัด การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม การให้คำแนะนำ และการจัดการกับความเครียดที่เป็นสาเหตุของโรค ร่วมกับการให้กำลังใจ ประคับประคองทางจิตใจ ในรายที่เป็นไม่รุนแรง ส่วนในรายที่เป็นรุนแรงอาจต้องมีการได้รับยาอย่างสม่ำเสมอ หรือเข้ารับการรักษาดูแลในโรงพยาบาล ยาด้านภาวะซึมเศร้าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันแบ่งได้เป็นหลายชนิดด้วยกัน ยาที่มีใช้กันอยู่ดั้งเดิมคือยาในกลุ่ม Tricyclic antidepressant เช่น amitriptyline, imipramine, desipramine และ ยาที่ใช้รักษาโรคจิต เช่น haloperidol และ thioridazine ซึ่งต่อมาพบว่ายาสองกลุ่มนี้ ก่อให้เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ทำให้หัวใจเต้นผิดจังหวะ ยาในกลุ่มที่ได้รับการพัฒนาต่อมาคือ ยาด้านการซึมเศร้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการดึงกลับของเซโรโทนินอย่าง เฉพาะเจาะจง ได้แก่ยา fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine เป็นต้น แม้ว่ายากลุ่มนี้ให้ผลการรักษาผู้ป่วยไม่แตกต่างไปจากยาในกลุ่มดั้งเดิม แต่ก็เป็นที่นิยมน้อยมากในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา ทั้งนี้เนื่องมาจากว่ายากลุ่มนี้มีพิษต่อระบบหัวใจน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม จากการติดตามอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา พบว่าการใช้ยาในกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ และคลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติ ในคนไข้ที่ไม่เคยมีประวัติโรคหัวใจมาก่อน ดังนั้น จึงเริ่มมีการทบทวนถึงความปลอดภัยในการใช้ยาในกลุ่มนี้มากขึ้น ปัจจุบันแนวทางการคิดค้นและพัฒนาายากลุ่มใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาโรคซึมเศร้าจึงมุ่งเน้นไปหาสารจากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากสารจากธรรมชาติ สมุนไพร มีการใช้มานาน และกว้างขวาง มีความปลอดภัยสูง

เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารสกัดจากส่วนรากของขมิ้นชัน (*Curcuma Longa L.*) ซึ่งถือเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้กันมาแต่ดั้งเดิมในตำรับยาและอาหารของไทย เคอร์คูมินจัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมายทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง มีฤทธิ์ปกป้องสมองจากการถูกทำลายด้วย kainic acid ซึ่ง

เป็น neurotoxin ที่ทำให้เกิดการชัก และทำลายสมอง ในประเทศจีน ขมิ้นชันจัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในตำรับยาแผนโบราณที่ใช้มากกว่าพันปีในการรักษาโรคที่มีความผิดปกติทางจิต

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของเคอร์คูมินในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูทดลอง โดยแรกเริ่มได้ทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในหนูปกติ ด้วยวิธีทดสอบ tail suspension test (TST) พบว่าเคอร์คูมิน 20 mg/kg สามารถที่จะลดค่า immobility time ในหนูลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity นั่นก็แสดงว่าค่า immobility time ที่ลดลงนั้นในหนูที่ได้รับเคอร์คูมิน 20 mg/kg เป็นผลมาจากการที่เคอร์คูมินออกฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้า โดยให้ผลเช่นเดียวกับ ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg ซึ่งสามารถที่จะลด immobility time โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินในแบบจำลอง unpredictable chronic mild stress ต่อไป เพื่อดูถึงผลของการให้ยาในระยะยาว และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินผ่านการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า ด้วย โดยหนูทดลองถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า จากนั้นวัด anhedonia behavior ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะซึมเศร้าอันหนึ่ง โดยวิธี sucrose consumption จากการทดลองพบว่าในสัปดาห์ที่ 0 เริ่มทำการทดลองหนูทุกกลุ่มจะมีปริมาณการบริโภคซูโครสเท่าๆกันคือประมาณ 78-79 g/kg body weight หนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการบริโภคซูโครสลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆสัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียดเลย และเมื่อได้รับเคอร์คูมินขนาด 20 mg/kg ติดต่อกันทุกวันในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าการบริโภคน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ผลเช่นเดียวกับ ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg และการทดสอบด้วยวิธี FST และ TST ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบพฤติกรรมซึมเศร้า ก็พบว่าเคอร์คูมินขนาด 20 mg/kg สามารถที่จะลด immobility time ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพร้อมกับน้ำกระสายยา ดังนั้นจากการทดสอบทางด้านพฤติกรรม จึงได้ข้อสรุปว่าเคอร์คูมินนั้นมีผลต้านภาวะซึมเศร้าได้ในหนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน โดยกลไกการออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของเคอร์คูมินนั้นส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่เคอร์คูมินมีผลเพิ่มการแสดงออกของ BDNF และ CREB mRNA จากการทดสอบด้วยวิธี reverse transcription และ polymerase chain reaction เนื่องจากผลการศึกษาพบว่า หนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้การแสดงออกของยีนสองตัวนี้ลดลงอย่างมากโดยเฉพาะในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ควบคุมเกี่ยวกับการเรียนรู้และการแสดงออกทางด้านอารมณ์และพฤติกรรม BDNF เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการ neurogenesis การสร้างการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ประสาทและ synapses BDNF จะพบมากในสมองส่วน hippocampus, cortex และ basal forebrain ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความจำ การเรียนรู้ และการแสดงออกทางด้านพฤติกรรมและอารมณ์ จาก

หลายรายงานการศึกษา พบว่าการได้รับความเครียดเป็นระยะเวลานาน และในคนไข้ที่เป็น chronic depression จะมีการแสดงออกของยีนตัวนี้ลดลงอย่างมาก ร่วมกับการที่มีสมองส่วน hippocampus และ cortex ที่ฝ่อเล็กลงมากกว่าปกติ และเมื่อได้รับการรักษาด้วยยาต้านซึมเศร้าอย่างต่อเนื่อง ก็สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้ให้กลับสู่ภาวะปกติได้ และยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีน BDNF นี้คือ CREB CREB เป็น cellular transcription factor ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีนหลายๆตัวเช่น BDNF, neuropeptide, tyrosine hydroxylase เป็นต้น CREB protein ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสมองหลายอย่างที่สำคัญคือกระบวนการสร้าง long term memories และ survival ของเซลล์ประสาท ดังนั้นทั้ง CREB และ BDNF จึงทำงานร่วมกันในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์สมอง การเรียนรู้และการสร้างความจำ การศึกษาครั้งนี้พบว่าในหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และเมื่อได้รับเคอร์คูมินในขนาด 20 mg/kg/day สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้กลับคืนมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการให้ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 20 mg/kg/day เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดเป็นเวลานานที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการต้านภาวะซึมเศร้า ส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่เคอร์คูมินสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF

กล่าวโดยสรุปแล้ว เคอร์คูมินนั้นเป็นสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการรักษาภาวะซึมเศร้า โดยสามารถที่จะปรับพฤติกรรมซึมเศร้าให้กลับคืนมาสู่ระดับที่ปกติได้ ผ่านทั้งกลไกการเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF และ CREB ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาททั้งในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex

The effects of curcumin on unpredictable chronic mild stress-induced behavioral alteration and gene expression in hippocampus of ICR mice

Yaowared Chulikhit^{1*}, Phanthun Kongprapan¹, Keerakul Tingsa¹, Opa Vajragupta² and Kinzo Matsumoto³

¹*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand,* ²*Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand,* ³*Division of Medicinal Pharmacology, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama, Japan*

Abstract

Curcumin, a yellow pigment extracted from rhizomes of the plant *Curcuma longa*, has been widely used as food additive and also as herbal medicine throughout Asia. It has been used to effectively manage mental stress and depression-related disorder. Unpredictable chronic mild stress (UCMS) has long been used as a model of depression. Antidepressant agents can reverse most effects of UCMS. We hypothesized that curcumin may alleviate stress induced depression. Thus in present study we assessed whether curcumin treatment affect behavior in UCMS treated ICR mice. Mice were exposed to UCMS for 5 weeks and anhedonia was evaluated by weekly monitoring of sucrose consumption. curcumin (10 and 20 mg/kg/day, i.p.) or imipramine (20 mg/kg/day, i.p.) or vehicle were continuously administered the last two weeks of UCMS. Behavioral tests were performed over the last week of UCMS. We found that subjecting animals to the UCMS protocol resulted in decreasing sucrose intake and increasing immobility time in tail suspension test (TST), the tests have been used to detect helpless behavior. The results showed that curcumin 20 mg/kg and imipramine 20 mg/kg significantly decrease the immobility time in both test. No significant different observed in locomotor activity in open field test between each group. In addition, the anxiety test was performed in this study to determine the effect of curcumin in anxiolytic activity. In light/dark preferences test, the percentage of time reduction in dark zone and induction time in light zone of mice were treated with curcumin and imipramine compared to the stressed-control mice. Curcumin and imipramine treatment increased the spending time in open arm and decreased the spending time in close arm in elevated plus maze test. Moreover, we also found that UCMS procedure decreased the BDNF mRNA expression in the frontal cortex when compare with non stress mice and curcumin and imipramine treatment significantly reverse the effect of UCMS by increasing the BDNF mRNA expression. There are many studies reported that antidepressant treatment can block the UCMS-induced down

regulate BDNF mRNA expression. These results provide compelling evidence that the behavioral effects of curcumin in chronically stressed animals may be related to their modulating effects on other organ. In addition some evidence has hypothesis that, curcumin has an property of MAO inhibitor that was effect on Catecholamine neurotransmitter(6) such as Serotonin, Epinephrine, Dopamine etc. these are regulate the function of mood. Furthermore, curcumin treatment exhibited the antidepressant activity via increasing the BDNF mRNA expression in frontal cortex similar to imipramine, a reference antidepressant. Although BDNF gene we have selected in this study but many gene are relevant on the depression not only BDNF gene and also should be study further gene expression on the other organs.

Keyword : Curcumin, chronic mild stress, depression, BDNF

*

Corresponding author

E-mail: yaosum@kku.ac.th

Introduction

A Major Depression disorder (MDD) manifests with the symptoms at the psychological, behavioral and physiological levels. An episode requires the presence for at least 2 weeks of one or two core symptoms: dysphoric mood and anhedonia (a loss of interest or pleasure in activities that usually would be enjoyed). In addition, four of the following symptoms must be present (three if both core symptoms are present): disturbances of sleep, feelings of worthlessness or guilt, inability to concentrate or think, increased or decreased psychomotor activity, decreased sexual drive, appetite disturbance or weight change and suicidal thoughts.

A Major Depression disorder prevalence is increasing. The World Health Organization estimated that in year 2020 this disorder will become the second largest health problem in human inferior to heart disease. There are three groups of antidepressant that are tricyclic antidepressants (TCAs), Monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), both of TCA and MAOI are the first of antidepressant shown their ability facilitated to noradrenergic and/or serotonergic neurotransmission, which correlated with behavioral excitation. But in the mid-1970s, the third group of antidepressant was found by related to serotonin, serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). Despite the last group is commonly prescribed in the present, there are many undesirable adverse effects of the antidepressants. Some of the various side effect from the different antidepressants are dry mouth, urinary retention, blurred vision, constipation, sedation (can interfere with driving or operating machinery), sleep disruption, weight gain, headache, nausea, gastrointestinal disturbance/diarrhea, abdominal pain, inability to achieve an erection, inability to achieve an orgasm (men and women), loss of libido, agitation, anxiety etc^{Woelk, H. (2000).}

Thus the herbal medicine is the major sources of drug, which may relate to depression therapy.



Figure 1: The yellow pigments of curcumin that extracted from *Curcuma longa*

Curcumin, a yellow pigment extracted from rhizomes of the plant *Curcuma longa*, has been widely used as food additive and also as herbal medicine throughout Asia. In China, curcumin is a major constituent of Xiaoyao-san, the traditional Chinese medicine. This

regimen has been used to effectively manage mental stress and depression-related disorder.

Unpredictable chronic mild stress (UCMS) has long been used as a model of depression. In the UCMS model, rats or mice are exposed sequentially, over a period of weeks, to a variety of mild stressors, and the measure most commonly used to track the effects is a decrease in consumption of a palatable sweet solution. The model has good predictive validity (behavioral changes are reversed by chronic treatment with a wide variety of antidepressants), face validity (almost all demonstrable symptoms of depression have been demonstrated), and construct validity (UCMS causes a generalized decrease in responsiveness to rewards, comparable to anhedonia, the core symptom of the melancholic subtype of major depressive disorder)^(Willner,1997). Animal models are indispensable in clarifying the pathophysiology that underlies depression, depression–cognition interactions, and in searching for new antidepressants. Several animal models have been established, such as forced swimming test (FST), tail suspension test (TST), learned helplessness (LH) and chronic mild stress (CMS). These models have been used as reliable research tools to screen effective antidepressants and to further research into pathophysiology of depression. However, the value of these animal models in defining the impact of depression producing stressors on spatial learning and memory remains uncertain.^(L. Song et al,2006). The UCMS animal model has been also used to evaluate anxiety-like behaviors which is an important element in the development of depression by some behavioral assay such as the elevated plus maze and light/dark paradigm as the evaluation of anxiety-like effects.^(Yann S. M.,2006). And Genetic level may involve with depression, from our review literature shown that Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin important for neuronal development and synaptic plasticity. However, it has also been recently implicated in the etiology and treatment of psychiatric disorders, including depression^(F Angelucci et al, 2005). And a number of findings suggest that BDNF action could be impaired in depression and stress-related affective disorders, and that BDNF is involved in the etiology of these illnesses. Chronic administration of several antidepressants, including selective serotonin reuptake inhibitors, increases BDNF expression in the hippocampus. Another study demonstrated that centrally administered BDNF produces antidepressant-like activity in learned helplessness paradigms and the forced swim test. Therefore, up regulation of BDNF in response to antidepressant treatment could have similar behavioral effects. This is further supported by an animal study demonstrating that environmental stressors, such as immobilization, decreased

central BDNF mRNA. Indeed, chronic stress down regulates neurotrophin synthesis causing atrophy.

Materials and Methods

Animals

Male ICR mice, weight about 20 – 25 g, were obtained at the age of 3 weeks. They were housed in groups of 6 – 7 per cage. Housing conditions were thermostatically maintained at ambient temperature (22 ± 1 °C) and 12 hours light/dark cycle. They were fed with standard diet and water *ad libitum* and were allowed to acclimate 7 days before they were used. In case of sucrose preference, animals were fasted for 18 hours before they were tested. They were randomly divided into 5 groups, which are non-stressed control group and the other 4 groups of stressed mice with unpredictable chronic mild stress.

Drugs and drug administration

After 21 days of continuous to the UCMS sequence of the below-described, mildly stressful situation, when sucrose consumption was reduced significantly in stressed animals to levels not significantly different among them, the four groups of stressed animals were assigned randomly to one of the following treatment: (1) vehicle control, carboxymethylcellulose solution, (2) curcumin (MP Biomedicals), 10 mg/kg body wt.; (3) curcumin, 20 mg/kg body wt.; (4) Imipramine (Nacalaitesque), 20 mg/kg body wt. All drugs were administered intraperitoneally (i.p.) once daily for last two weeks of UCMS.

Unpredictable chronic mild stress

At the start of the experiment, the animal were first trained to consume a 2% sucrose solution for a 48-h period in their cages with no food or water following food and water deprivation for 18 h. They were given sucrose for 1 h per day on the five consecutive days at the end of training in order to group the mice. The mice in the experimental groups were then subjected to UCMS for 5 weeks. The UCMS procedure consisted of a variety of unpredictable mild stressors including two periods of tilted cage 45° (12h), two periods of 1 h restricted access to food (5 micropellets), two periods of exposure to empty bottle (3h), one period of 21 h wet cage (200 ml water in 100 g sawdust bedding), two periods of light exposure (36h), two periods of intermittent sound (3h, 5h), two periods of paired caging (2h) and food and water deprivation for 18 h before

2% sucrose solution consumption. These stressors were randomly scheduled over a one-week period and repeated throughout the 5-week experiment.

Sucrose consumption

Sucrose intake were measured once weekly after the end of UCMS, 18 h of food and water deprivation. Consumption was measure by weighing the pre-weighed bottle at the end of the test. Baseline was measured at the week 0 before started of UCMS.

Tail suspension test

The tail suspension test allows fast evaluation of drugs psychotropic effects. The animals were subjected to the short-term, inescapable stress of being suspended by their tail and develop an immobile posture. Animals were suspended 50 cm above the floor by means of an adhesive tape, placed approximately 1 cm from the top of the tail. The time during which mice remained immobile was measured during a test period of 6 min. Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. Immobility time is defined as the activity of stressed mice.

Forced swimming test

The mice were individual to swum for 15 min in glass cylinder (height: 27 cm, diameter: 20 cm) containing 10 cm of water at 25°C for pretest. A 24-h after pretest, mice were placed in glass cylinder again for 6 min test and was recorded the last 4 min of testing period. A mouse was judged to be immobile when it discontinued struggling and remained floating motionless in the water, making only a small movement necessary to keep its head above water.

Open field analysis

In the last week of UCMS and drug exposure, the open field analysis was performed. The open field consist of a black walls and base divided into 16 (4 × 4) identical sectors by white stripes. The animals were placed in the central sector and measured the movement of mice for 5 min manually. The open field arena was thoroughly cleaned between each test. Motility was scored when animals crossed a sector border with both its hind limbs or rearing and grooming. This test can determine the effect of drug on motor function.

Light/Dark preference

The light dark (LD) test is used to evaluate the relative anxiety status of mice. The light dark paradigm in mice is based on a conflict between the innate aversion to brightly illuminated areas and the spontaneous exploratory activity. If given a choice between a large brightly compartment versus a small dark compartment, mice spontaneously prefer the dark. Anxiolytic compounds have been found to increase the total duration of time spent there. Anxiogenic compounds are observed to work in the opposite way.

Elevated plus-maze

The elevated plus-maze was constructed from black acrylic plate and elevated to a height of 50 cm. It consisted of two open arms (50 x 10 cm) and two enclosed arms (30 x 5 x 15 cm). Each mouse was placed in the central square facing an open arm, and allowed to explore the maze for 5 min. The maze was cleaned thoroughly before each test. The percentage of time spent on the open arms ($\text{time on open arms} / (\text{time on open arms} + \text{time on closed arms}) \times 100$), the percentage open arm entries ($\text{open arm entries} / \text{total entries} \times 100$), and total number of entries were determined. An entry was defined as three of the four paws being on the arm.

Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA extraction

Homogenize tissue samples in 1 ml of TRIZOL reagent. Add 0.2 ml of chloroform per 1 ml of TRIZOL Reagent. Cap sample tubes securely. Vortex samples vigorously for 15 seconds and incubate them at room temperature for 2 to 3 minutes. Centrifuge the samples at no more than 12,000 x g for 15 minutes at 4 °C. Following centrifugation, the mixture separates into lower red, phenol-chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. RNA remains exclusively in the aqueous phase. Transfer upper aqueous phase carefully without disturbing the interphase into fresh tube. Measure the volume of the aqueous phase (The volume of the aqueous phase is about 60% of the volume of TRIZOL Reagent used for homogenization). Precipitate the RNA from the aqueous phase by mixing with isopropyl alcohol. Use 0.5 ml of isopropyl alcohol per 1 ml of TRIZOL Reagent used for the initial homogenization. Incubate samples at 15 to 30 °C for 10 minutes and centrifuge at not more than 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C. The

RNA precipitate, often invisible before centrifugation, forms a gel-like pellet on the side and bottom of the tube. Remove the supernatant completely. Wash the RNA pellet once with 75% ethanol, adding at least 1 ml of 75% ethanol per 1 ml of TRIZOL Reagent used for the initial homogenization. Mix the samples by vortexing and centrifuge at no more than 7,500 x g for 5 minutes at 4 °C. Repeat above washing procedure once. Remove all leftover ethanol. Air-dry or vacuum dry RNA pellet for 5-10 minutes. Do not dry the RNA pellet by centrifuge under vacuum. It is important not to let the RNA pellet dry completely as this will greatly decrease its solubility. Dissolve RNA in 40 µl RNase free water by passing solution a few times through a pipette tip, keep in -20 °C refrigerator as stock RNA.

Reverse transcription

Pipette 2 µl of 0.5 µg/µl RNA sample to nuclease-free microcentrifuge tube. Add 10 µl master mix1 [1 µl oligo (dT) 12-18, 4 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM each dATP, dGTP, dCTP and dTTP at neutral pH) and RNase free water adjust to 10 µl] Heat mixture to 65 °C for 5 min and quick chill on ice. Add 7 µl master mix2 [4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT, 0.2 µl RNase Inhibitor, 0.8 µl RNase free water] Mix contents of the tube gently and incubate at 37 °C for 2 min. Add 1 µl (200 units) of M-MLV RT, and mix by pipetting gently up and down. Incubate 50 min at 37 °C and inactivate the reaction by heating at 70 °C for 15 min.

Table 2 Summary of the primer pair for house keeping gene (β -actin), stress-related genes (BDNF, CREB) and product length.

Gene	Primer Sequence	Product length
	Top line : forward primer Bottom line : reverse primer	
β -actin	5'-AAC GGT CTC ACG TCA GTG TA-3' 5'-GTG ACA GCA TTG CTT CTG TG-3'	220 bp
BDNF	5'-GAC AAG GCA ACT TGG CCT AC-3' 5'-CCT GTC ACA CAC GCT CAG CTC-3'	334 bp
CREB	5' -TAC CCA GGG AGG AGC AAT AC-3 ' 5' -GAG GCA GCT TGA ACA ACA AC-3 '	183 bp

Semi-quantitative RT-PCR

The PCR reaction mixture; 1 μ l of cDNA, 4 μ l of 5x PCR buffer, 2 μ l of deoxynucleoside triphosphate mixture, 2 μ l of magnesium chloride, 2 μ l of primer pair (Table 2) , 0.4 μ l of Taq polymerase and 8.6 μ l of distilled water to give final volume 20 μ l. In general, PCR was performed with a preheating cycle at 95 °C for 2 min, denaturation, annealing, elongation and reaction cycles were carried out follow Table 3. Aliquots of PCR products were analyzed by gel electrophoresis with 10% polyacrylamide gel stained in ethidium bromide, photographed under UV light and analyzed by GeneSnap and Gene ToolsMatch Software

Statistic Analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by t-test between non-stress group and UCMS group and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls test for multiple comparisons among different groups. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Sucrose consumption

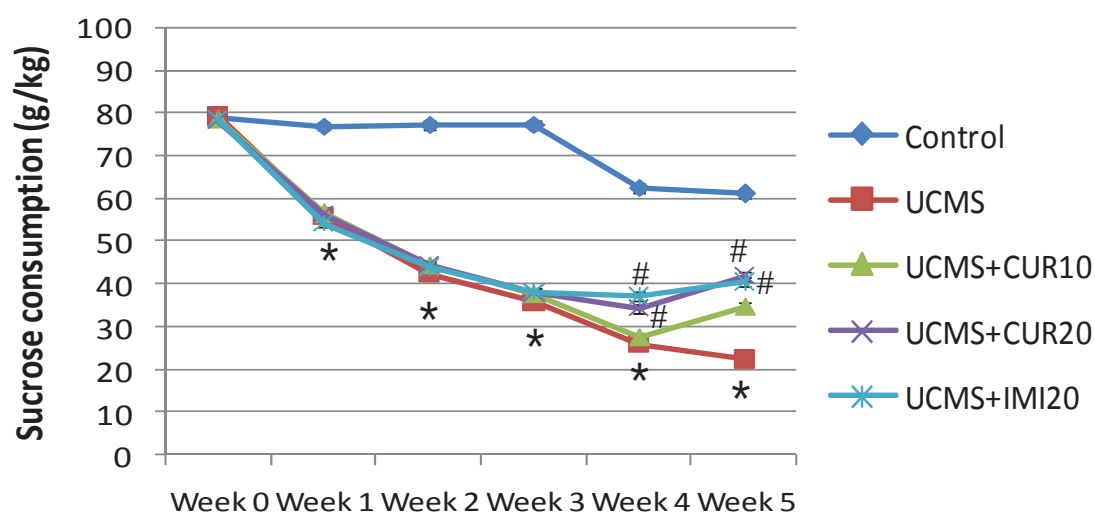


Figure 2 The effect of curcumin on sucrose consumption of mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS). Data expressed as mean $\pm$ S.E.M., n=10-12. Chronic treatment of curcumin (10, 20 mg/kg, i.p.) was given the last 2 week of the 5 weeks unpredictable chronic mild stress procedure. *P<0.001 compared with non-stress control group; #P<0.05 compared with UCMS group.

In the sucrose solution-training phase (base line phase, week 0), sucrose consumption did not differ significantly among the group. The UCMS significantly decreased the consumption of the 2% sucrose solution from 79.14 mg/kg in the base line week to 22.28 mg/kg in the last week of UCMS procedure. Treatment with curcumin and imipramine caused a gradual recovery of the sucrose intake. The decreasing of sucrose preference in all groups of in the last 2 weeks, which is drug treatment period, may cause from the injection of drug. Despite the injection of drug was made them like exposed to stress condition, the mice showed recovery of sucrose intake in the last week of UCMS procedure. At last week of experiment, the amount of sucrose preference taken by the stressed mice receiving curcumin 20 mg/kg and imipramine 20 mg/kg were significantly increase when compare with the vehicle-treated stressed mice.

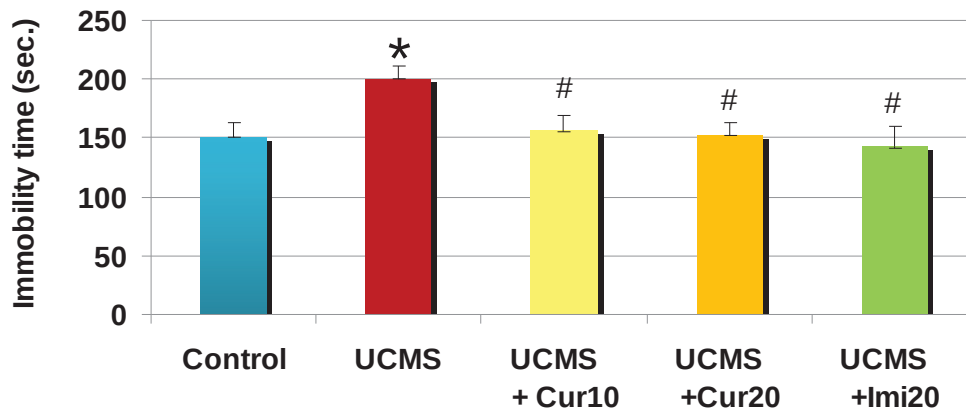


Figure 3: Effect of Curcumin on the forced swimming test of UCMS stressed mice (mean $\pm$ S.E.M., $n = 8 - 12$). The mice were administered vehicle, Curcumin (10, 20 mg/kg, i.p.) or Imipramine (20 mg/kg, i.p.). The mean immobility time of stressed-control mice was 200.57 ± 11.02 s. The respective percent reduction in immobility time was 21.81%, 23.88% and 14.15% for Curcumin 10 mg/kg, 20 mg/kg and Imipramine 20 mg/kg. $\#P < 0.05$ vs. the stressed-control mice and showed the significantly different between non-stressed control and stressed-control mice ($*P = 0.006$, t -test).

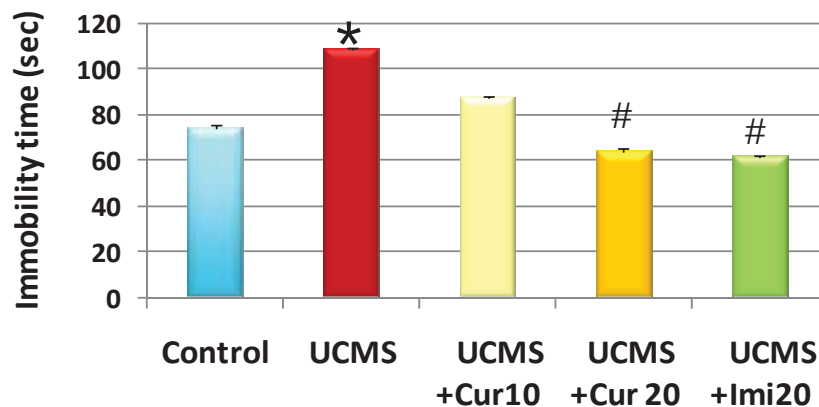


Figure 4: Effect of Curcumin on the tail suspension test of UCMS stressed mice (mean $\pm$ S.E.M., $n = 8 - 12$). The mice were administered vehicle, Curcumin (10, 20 mg/kg, i.p.) or Imipramine (20 mg/kg, i.p.). The mean immobility time of stressed-control mice was 108.76 ± 8.08 s. The respective percent reduction in immobility time was 19.75%, 40.90% and 43.35% for Curcumin 10 mg/kg, 20 mg/kg and Imipramine 20 mg/kg. $\#P < 0.05$ vs. the stressed-control mice.

Forced swimming test and tail suspension test

The effect of administration with curcumin in forced swimming test and tail suspension test at the dose of curcumin with 10 and 20 mg/kg and imipramine with 20 mg/kg. The duration of immobility time in forced swimming test, resulting in 21.81%, 23.88% and 14.15% immobility reduction of dose with curcumin 10, 20 mg/kg and imipramine 20 mg/kg, respectively compared to the UCMS stressed-control mice. In the tail suspension test, these same doses of curcumin and imipramine also significantly inhibited immobility with a respective percent reduction of 19.75%, 40.90% and 43.35%. In both models of depression, the effects of curcumin were similar to those observed for the classical antidepressant Imipramine (20mg/kg).

Open field analysis

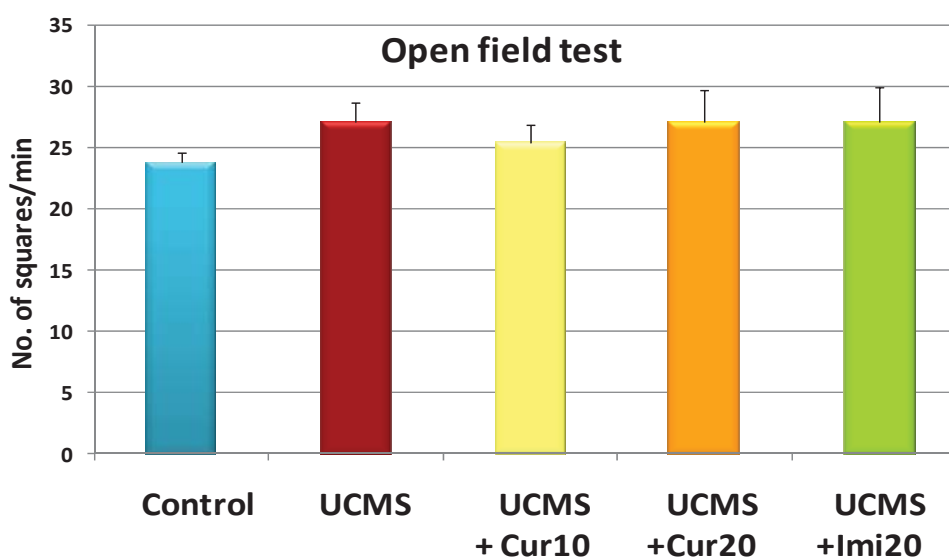


Figure 5: Effect of Curcumin on the open field analysis activity (mean $\pm$ S.E.M., $n = 8 - 12$). Chronic treatment of vehicle 20 mg/kg, Curcumin with 10, 20 mg/kg and Imipramine 20 mg/kg was given during last 2 weeks of UCMS procedure.

No significant difference in total locomotor activity between nonstress control group and UCMS mice in open field analysis. After 2 weeks of curcumin and imipramine treatment, the locomotor activity were not significantly difference in all group treatment.

Light/Dark preference

Mice receiving UCMS procedure show the significant decrease in the latency to dark zone. After treatment with curcumin and imipramine the latency time were significantly increase. No significant difference in spending time in dark zone and light zone between UCMS group and treatment group. The respect percentage of dark zone timereduction were 21.75%, 31.73% and 31.28% in dose of curcumin and imipramine compared to stressed-control mice. The mean of time preference of dark zone of UCMS group was 214.34 ± 1.38 . The percentage time induction of light zone were 54.15%, 79.01% and 77.90% in dose of curcumin and imipramine compared to stressed-control mice. The mean of light time preference in the light zone of UCMS group was 85.96 ± 9.87 .

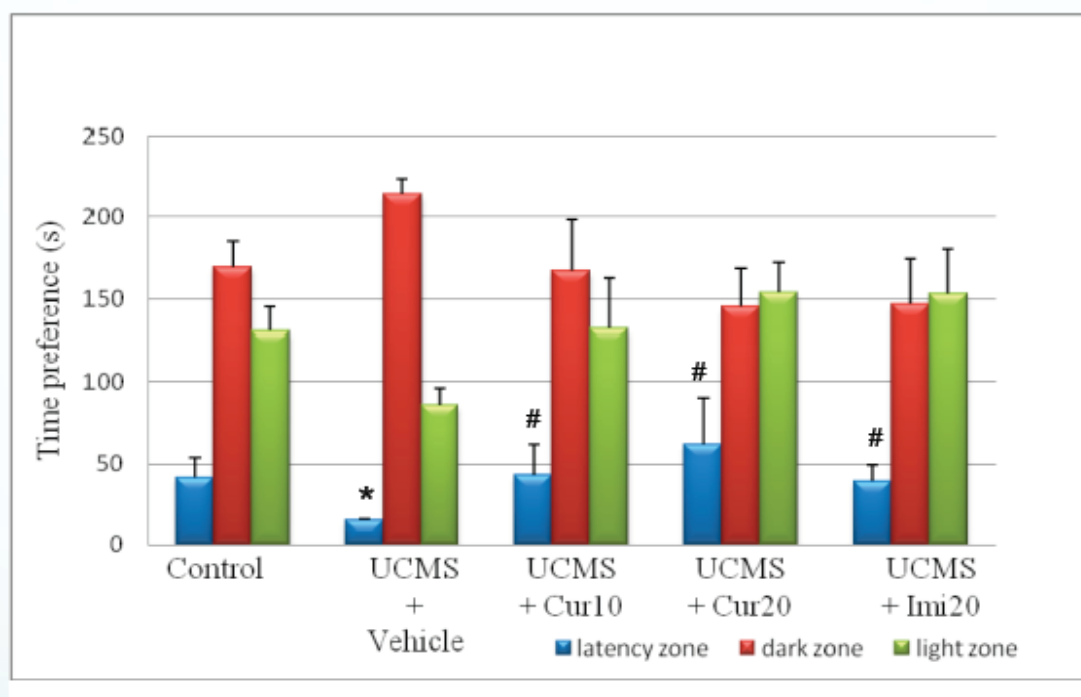


Figure 6: Effect of Curcumin on light-dark preference with the UCMS stressed mice and non-stressed control (mean $\pm$ S.E.M., $n = 8 - 12$), # $P < 0.05$, compared between curcumin 20 mg/kg and imipramine 20 mg/kg with the stressed-control mice, * $P = 0.006$, t -test vs. non-stressed control group.

Elevated plus maze

UCMS mice show significantly decrease in the spending time in open arm and close arm when compare with the non stress mice. Only curcumin 20 mg/kg significantly reverse the effect of UCMS stress in both spending time in open arm and close arm. Imipramine show significantly increase only spending time in close arm.

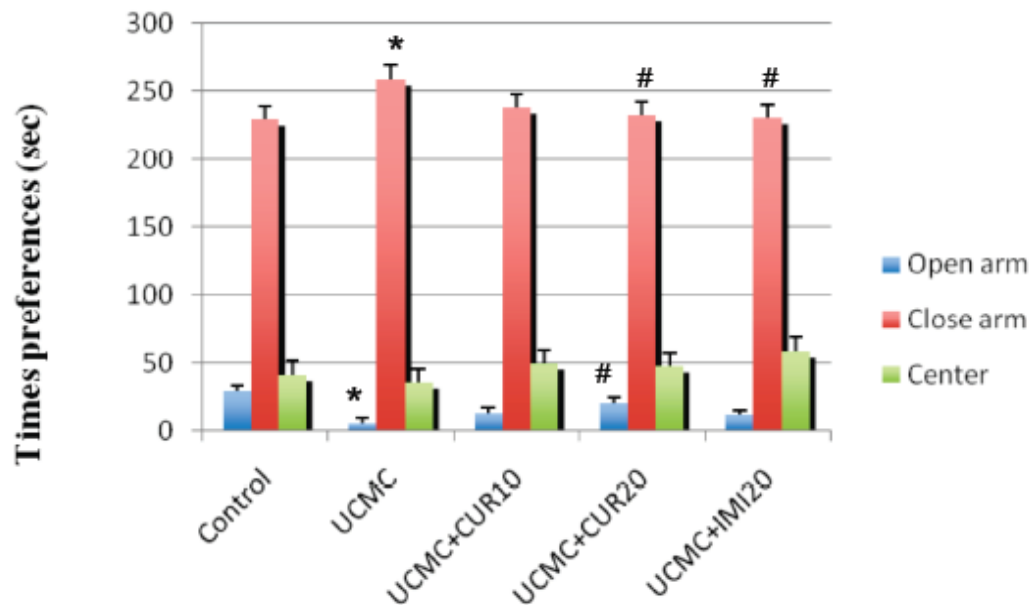


Figure 7: Effects of curcumin on the elevated plus maze of UCMS stressed mice (mean $\pm$ S.E.M., $n = 8$). The result showed significantly differences among non-stressed control and stressed control groups ($*P \leq 0.001$, t -test) and $\#P < 0.05$ vs. stressed control group.

Semi quantitative RT-PCR analysis

UCMS procedure significantly reduced the relative CREB and BDNF mRNA expression in hippocampus and frontal cortex areas when compare with non stress treatment. Curcumin and imipramine treatment group significantly increased the CREB and BDNF mRNA expression when compare with UCMS+vehicle mice.

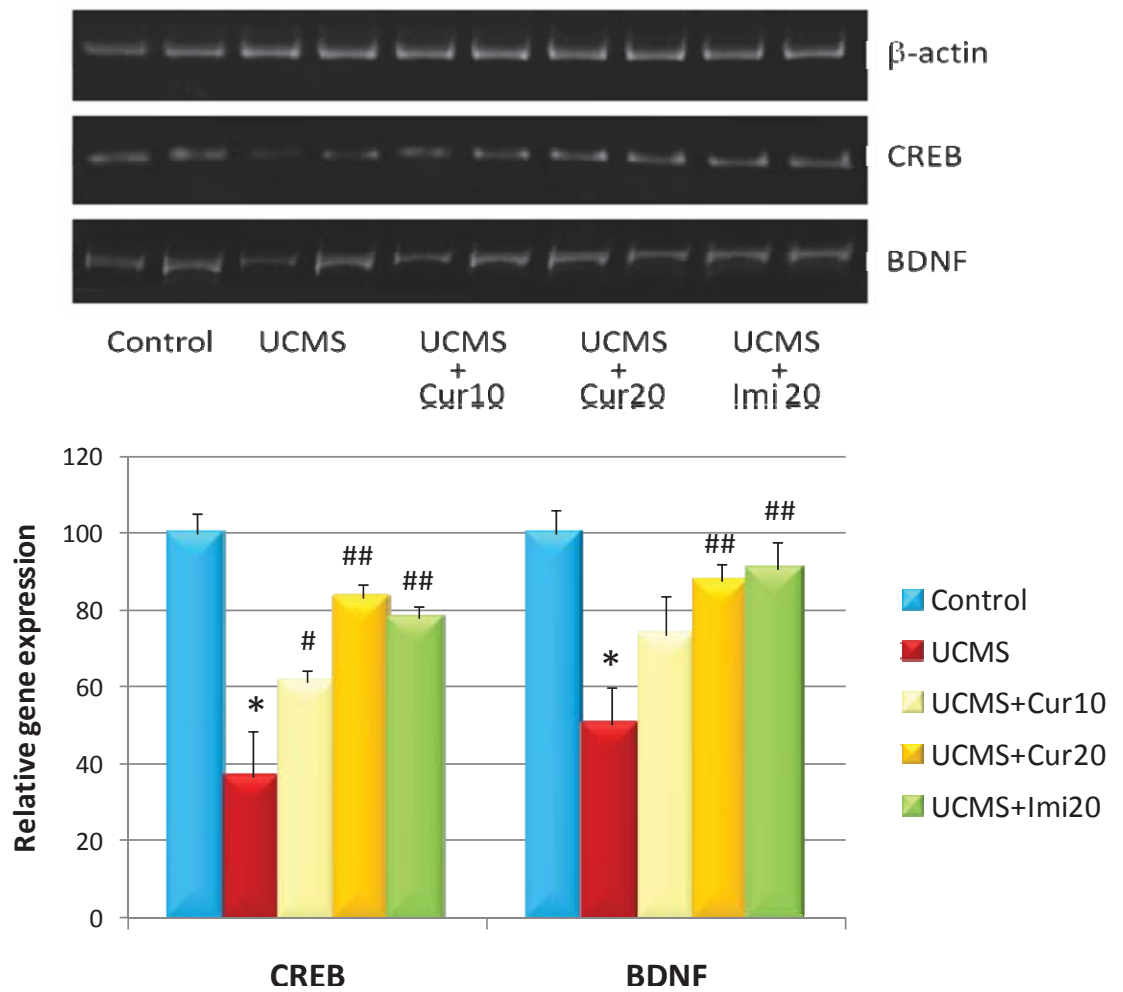


Figure 8: The effect of curcumin on relative BDNF and CREB mRNA expression in hippocampus of non-stress and UCMS mice (mean $\pm$ S.E.M, n=3-4), (*P<0.01 vs control group and #P<0.05, ##P<0.01 vs UCMS group)

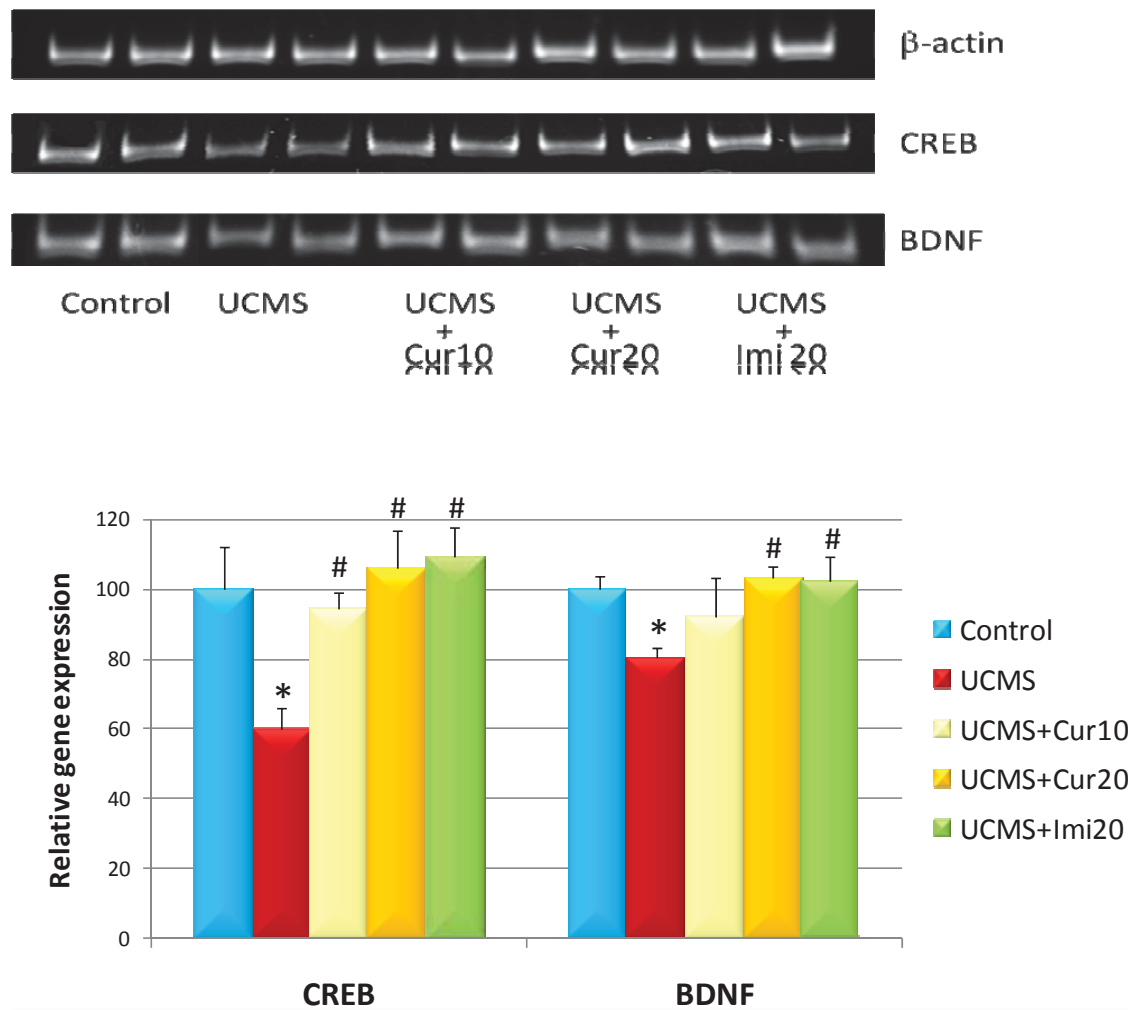


Figure 9 The effect of curcumin on relative BDNF and CREB mRNA expression in frontal cortex of non-stress and UCMS mice (mean $\pm$ S.E.M, n=3-4), (* P <0.05 vs control group and # P <0.05 vs UCMS group)

Discussion

The UCMS model of depression involves in the presentation of a series of varied and unpredictable environment stressors, such as two periods of tilted cage 45° (12h), two periods of 1 h restricted access to food (5 micropellets), two periods of exposure to empty bottle (3h), one period of 21 h wet cage (200 ml water in 100 g sawdust bedding), two periods of light exposure (36h), two periods of intermittent sound (3h, 5h), two periods of paired caging (2h) and food and water deprivation for 18 h. Following such exposure, mice have been reported with anhedonia effect, measured by 2% sucrose consumption. To assured these results are from UCMS procedure and sucrose

preferences; we performed the behavioral activities to test the effect of curcumin substances and used the classical antidepressant, imipramine, as standard of treatment. The forced swimming test and tail suspension test were performed for determining the antidepressant effect. Curcumin 20 mg/kg and imipramine 20 mg/kg showed the antidepressant activity in both test. Only imipramine exhibited the decreasing in locomotor activity in open field test. In addition, the anxiety test was performed in this study to determine the effect of curcumin in anxiolytic activity. Light/dark preferences and elevated plus maze were performed to evaluate the anxiolytic activity of curcumin. The results showed that curcumin had the anxiolytic activity by decreasing the latency to dark zone in light/dark preference and decreased spending time in close arm and increased the spending time in open arm. UCMS induced behavioral changes were reversed by chronic antidepressant medication and long-term curcumin consumption. In addition, curcumin and imipramine reversed the effect of UCMS on BDNF expression. Interestingly, we found that curcumin increased BDNF levels quite similar to the imipramine ($p > 0.05$). In fact, chronic antidepressants could produce long-term adaptation in cellular signaling mechanisms in mice. The ability of curcumin to up-regulate BDNF mRNA expression is also considered to prove its potential mechanism as antidepressant agent. Some mechanism may involve with curcumin to explain, why it is involved in depression. Increased cell proliferation and neuronal populations may be a mechanism by which curcumin treatment overcomes the stress-induced behavioral abnormalities and neuronal damage. Moreover, curcumin treatment, via up-regulation of 5-HT_{1A} receptors and BDNF, may reverse or protect neurons from further damage in response to chronic stress, which may underlie the therapeutic actions of curcumin (8). And the topic of dose of curcumin 10 mg/kg and 20 mg/kg are not significantly different ($p > 0.05$) on relative gene expression, they are similar to the dose of curcumin 10 mg/kg, 20 mg/kg gives the efficiency to promote BDNF mRNA expression closely for each other.

Conclusion

The effect of Curcumin can reverse the decrease of Anhedonic behavior, which involves with depression by monitoring the sucrose consumption. These changes were reversed by chronic curcumin administration (10 or 20 mg/kg, p.o.). According to 2% sucrose consumption, at the last 2 weeks of UCMS procedure, resulting in significant differences of sucrose consumption among their groups. In the group of Curcumin and

Imipramine treated, the mice showed the induction of sucrose preferences compared to the stressed-control mice. The effect of administration with Curcumin in forced swimming test and tail suspension test at the dose of Curcumin with 10 and 20 mg/kg and Imipramine with 20 mg/kg. The duration of immobility time in forced swimming test, resulting in 21.81%, 23.88% and 14.15% immobility reduction of dose with Curcumin 10, 20 mg/kg and Imipramine 20 mg/kg, respectively compared to the UCMS stressed-control mice. In the tail suspension test, these same doses of Curcumin and Imipramine also significantly inhibited immobility with a respective percent reduction of 19.75%, 40.90% and 43.35%. In both models of depression, the effects of Curcumin were similar to those observed for the classical antidepressant Imipramine (20mg/kg). In case of open field test, they showed no differences among their groups but there is significantly differences between stressed-control and Imipramine mice and showed as the same result as light/dark preference. The light/dark preferences showed the percentage of time reduction in dark zone and induction time in light zone of mice were treated with Curcumin and Imipramine compared to the stressed-control mice. In addition, we also found that the unpredictable chronic stress procedure induced a down-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels (1), in the frontal cortex of UCMS mice. Furthermore, these stress-induced decreases in BDNF were also blocked by chronic curcumin administration (10 or 20 mg/kg, p.o.). These results provide compelling evidence that the behavioral effects of curcumin in chronically stressed animals may be related to their modulating effects on other organ. In addition some evidence has hypothesis that, curcumin has an property of MAO inhibitor that was effect on Catecholamine neurotransmitter(6) such as Serotonin, Epinephrine, Dopamine etc. these are regulate the function of mood. Although BDNF gene we have selected in this study but many gene are relevant on the depression not only BDNF gene and also should be study further gene expression on the other organs.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (MRG5280173).

References

Angelucci F, Brene S, Mathe AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry*. 2005 Jan 18;10(4):345-352.

- Chen Y, Wang H, Xia X, Kung H, Pan Y, Kong L., 2007. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seed of *Psoralea corylifolia* in the chronic mild stress model of depression in mice. *Phytomedicine*. 14, 523-529.
- Fumagalli F, Racagni G, Colombo E, Riva MA. BDNF gene expression is reduced in the frontal cortex of dopamine transporter knockout mice. *Mol Psychiatry*. 0 ;8(11):898-899.
- Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 May ;161(2):160-7.
- Li Y, Wang F, Pan Y, Qiang L, Cheng G, Zhang W, et al. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2009 Apr 30;33(3):435-449.
- Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y., 2007. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci*. 80, 1373-1381.
- Wang R, Xu Y, Wu H, Li Y, Li Y, Guo J, Li X., 2008. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Eur. J. Pharmacol*. 578, 43-50.
- Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Research*. 2007 Aug 8;11629-18.
- Xu Y, Ku B, Tie L, Yao H, Jiang W, Ma X, Li X., 2006. Curcumin reverse the effect of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Res*. 1122, 56-64.
- Xu Y, Ku B, Yao H, Lin Y, Ma X, Zhang Y, Li X., 2005. The effect of curcumin on depressive-like behaviors in mice. *Eur. J. Pharmacol*. 518, 40-46.