

## ความไวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมิน

บุญเลี้ยง สุพิมพ์, เบลญพร บุราณรัตน์, เอี่ยมเดือน ประวาฬ, วีรพล กุ๋นงวิริยพันธุ์ \*

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

## Sensitivity of Cholangiocarcinoma Cells to Chemotherapeutic Agents and Curcumin

Bunliang Suphim, Benjaporn Buranrat, Auemduan Prawan, Veerapol Kukongviriyapan \*

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, 40002

**หลักการและเหตุผล:** การรักษามะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดมักไม่ได้ผลเนื่องจากการไม่ตอบสนองต่อยา การศึกษาเพื่อดูผลของยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมินในการทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง

**วัตถุประสงค์:** ทดสอบความไวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อยาเคมีบำบัด หลายชนิดและสารเคอร์คูมิน ในห้องปฏิบัติการ **วัสดุและวิธีการ:** ใช้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง 3 ชนิด คือ KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 มาทดสอบความไวต่อยาเคมีบำบัด 3 ชนิด ได้แก่ 5-fluorouracil, doxorubicin และ carboplatin และเคอร์คูมินในการทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและตายภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

**ผลการศึกษา:** พบว่า KKU-100 และ KKU-M214 จะเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไวต่อ doxorubicin โดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 0.4-0.7 nmol/l ขณะที่ KKU-OCA17 จะไวต่อยาเคมีบำบัดน้อยกว่า ที่น่าสนใจคือ เซลล์เพาะเลี้ยงทุกชนิดจะไวต่อเคอร์คูมิน โดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 3-17  $\mu$ mol/l

**สรุป:** การศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีความไวต่อยาเคมีบำบัดแต่ละชนิดแตกต่างกัน และผลดังกล่าวจะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเลือกยาเคมีบำบัดในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ผลของเคอร์คูมินในการทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีน่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปพัฒนากลยุทธ์ในการใช้เคมีบำบัดรักษามะเร็งท่อน้ำดี

**คำสำคัญ:** มะเร็งท่อน้ำดี เคอร์คูมิน ยาเคมีบำบัด

**Background:** Chemotherapeutic treatment of cholangiocarcinoma is largely ineffective, because it is due to non-responsive for the obscured reason of the cancer to anticancer agents. Study was to investigate the cytotoxicity effects of chemotherapeutic agents and curcumin *in vitro*.

**Objective:** To test sensitivity of cholangiocarcinoma cell lines to chemotherapeutic agents and curcumin

**Material and Methods:** Three cholangiocarcinoma (CCA) cell lines, including KKU-100, KKU-M214 and KKU-OCA17 were used in the study. All cell lines were treated with three chemotherapeutic agents (5-fluorouracil, doxorubicin and carboplatin) or curcumin. The cell viability was determined under a fluorescence microscope by counting the number of living and dead cells after treatment.

**Results:** KKU-100 and KKU-M214 were the very sensitive cell lines to doxorubicin ( $IC_{50}$  values ranging from 0.4 to 0.7 nmol/l), whereas KKU-OCA17 was relatively more resistant cell line. Interestingly, all cell lines were sensitive to curcumin ( $IC_{50}$  values ranging from 3 to 17  $\mu$ mol/l).

**Conclusion:** This study showed different degrees of sensitivity of CCA cell lines to various chemotherapeutic agents. The data could serve as a basic information for chemotherapeutic selection for the treatment in CCA patients. Moreover curcumin exhibits the cytotoxicity on CCA cell lines, thereby it is suggested to be very beneficial in the development of strategy for chemotherapy of CCA cancer.

\* ผู้รับผิดชอบบทความ (corresponding author) veerapol@kku.ac.th

**Keywords:** cholangiocarcinoma, curcumin, chemotherapeutic agent

ศรีนครินทร์เวชสาร 2551; 23(3): 284-9 • Srinagarind Med J 2008; 23(3): 284-9

## บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณท่อน้ำดี พบทั่วโลกประมาณร้อยละ 10-15 ของมะเร็งตับทั้งหมด โดยทั่วไปมะเร็งชนิดนี้มีอุบัติการณ์ต่ำ<sup>1</sup> แต่ในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออุบัติการณ์เกิดมะเร็งชนิดนี้สูง<sup>2</sup> สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ ได้แก่ การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) และมีการรายงานไว้ในภูมิภาคนี้มีการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับสูงเช่นเดียวกัน การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของเยื่อผนังในท่อน้ำดี และมีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้น เช่น nitric oxide ซึ่งเชื่อว่า มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคมะเร็งชนิดนี้<sup>3</sup> ในปัจจุบันนี้การรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดเป็นวิธีการที่ดีที่สุดที่ช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอด แต่อย่างไรก็ตามการผ่าตัดช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอดอยู่ได้เพียงประมาณ 5 ปี เท่านั้นคิดเป็นประมาณร้อยละ 22.5 หลังจากได้รับการผ่าตัด<sup>4,5</sup> และที่สำคัญคือ ผู้ป่วยมะเร็งจำนวนหนึ่งในสามเท่านั้นที่สามารถเข้ารับการผ่าตัดได้

จากรายงานการศึกษาทางคลินิก พบว่า อัตราการตอบสนองของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อยาเคมีบำบัด มีการตอบสนองต่ำ ประมาณร้อยละ 0-30<sup>6,7</sup> ดังนั้นการพัฒนารักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดให้มีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งโดยเฉพาะสำหรับผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการผ่าตัดไม่ได้ การเปรียบเทียบข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับความไวของยาเคมีบำบัดกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดียังมีจำกัด<sup>8</sup> ข้อมูลทางระบาดวิทยาและการศึกษาในสัตว์ทดลองเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งเป็นแหล่งของยาที่สำคัญพบว่า สารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ ได้นำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ มากมาย รวมทั้งมะเร็ง<sup>9,10</sup> ที่น่าสนใจคือ เคอร์คูมินซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในการทำอาหารในประเทศต่างๆ ทั่วโลก เช่น จีน อินเดีย และไทย<sup>11</sup> มีรายงานการนำมาใช้ทางการแพทย์ เช่น ใช้รักษาอาการอักเสบ และมีรายงานพบว่า เคอร์คูมินมีผลยับยั้ง cytokine TNF- $\alpha$  ที่ชักนำให้มีการแสดงออกของ cyclo-oxygenase-2 (COX-2) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเกิดการอักเสบและมีผลยับยั้งการกระตุ้นของ nuclear factor kappa B ซึ่งเป็น transcription

factor ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการเจริญ การเพิ่มจำนวน และการอยู่รอดของมะเร็งหลายชนิด<sup>12</sup>

เคอร์คูมิน เป็นสารประกอบที่สกัดได้จากขมิ้น (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอมส้ม ไม่ละลายน้ำ ในทางการแพทย์ใช้ในการรักษาอาการอักเสบ และมะเร็ง มีข้อบ่งใช้ทั้งกินและทาในการรักษาโรค มีรายงานพบว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการบุกรุกและการเจริญในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่,<sup>13</sup> ลำไส้เล็กส่วนต้น,<sup>10</sup> กระเพาะอาหาร,<sup>14</sup> ต่อมลูกหมาก<sup>15</sup> และมะเร็งเต้านม<sup>16</sup>

การศึกษาค้นคว้านี้ได้ใช้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ได้เพาะเลี้ยงขึ้นในห้องปฏิบัติการเพื่อมาใช้เป็นโมเดลในการทดสอบความไวของยาเคมีบำบัด และศึกษาคุณสมบัติในการเป็นเคมีบำบัดเสริมของเคอร์คูมินในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาค้นคว้านี้จะทำการประเมินฤทธิ์ของยานี้โดยการย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ เพื่อทำการนับเซลล์ที่รอดชีวิตและเซลล์ที่ตาย

## สารเคมีและวิธีการทดลอง

เคอร์คูมินร้อยละ 65-75 ชื่อจาก Sigma Chemical (St Louis, MO, USA) fetal bovine serum (FBS) เป็นผลิตภัณฑ์จาก Hyclone laboratories (South Logan, UT) Ham's F12, trypsin-EDTA 0.25% ชื่อจาก Gibco (Grand Island, N.Y., USA) ยาเคมีบำบัดทั้งหมด ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท มาสุ จำกัด

## Human CCA cell lines

เซลล์เพาะเลี้ยง KCU-100, KCU-M214 และ KCU-OCA17 พัฒนาจากเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแบบ intrahepatic cholangiocarcinoma ได้นำมาศึกษาครั้งนี้โดยความอนุเคราะห์จาก รศ.บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดถูกเพาะเลี้ยงในมีเดียชนิด Ham's F12 ซึ่งมีส่วนผสมเพิ่มเติม ร้อยละ 10 fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium-pyruvate, 100 U/ml penicillin และ 100  $\mu$ g/ml streptomycin และเลี้ยงในตู้บ่มก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์เพาะเลี้ยงในจานพลาสติกจะเปลี่ยนมีเดียใหม่ทุก 3 วัน เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนราวร้อยละ 70 จะทำการแยกเซลล์ โดย trypsin-EDTA และเพาะเลี้ยงในมีเดียใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จะนำไปทำการทดลองต่อไป

### การวิเคราะห์การตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

การวิเคราะห์ความไวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อ ยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมิน โดยการย้อมสีติดเซลล์และ นิวเคลียสของเซลล์ ในการศึกษานี้ใช้สี acridine orange และ ethidium bromide ที่เรืองแสง โดยดำเนินการตามวิธีของ Parks และคณะ<sup>17</sup> วิธีการโดยย่อ คือนำเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง และเติมมีเดียใหม่ที่มีเคอร์คูมินความเข้มข้น ตั้งแต่ 1 ถึง 100  $\mu\text{M}$  หรือ ยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil (3, 10, 30  $\mu\text{M}$  ส่วน KKU-M214 10, 30, 100  $\mu\text{M}$ ), carboplatin (10, 30, 100  $\mu\text{M}$ ), doxorubicin (KKU-100 and KKU-M214 0.1, 0.3, 1 nM ส่วน KKU-OCA17 1, 10, 100 nM) แล้วนำไป บ่มเพาะเลี้ยง ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline และ ย้อมด้วย acridine orange/ethidium bromide ทำการ นับเซลล์ในหลุม ณ ตำแหน่งที่สุ่มไว้อย่างเป็นระบบ โดยมี ตัวอย่างละ 2 หลุมต่อการทดลอง ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ โดยนับเซลล์ที่ติดสีเขียวเป็นเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ติด สีสแดงเป็นเซลล์ตาย

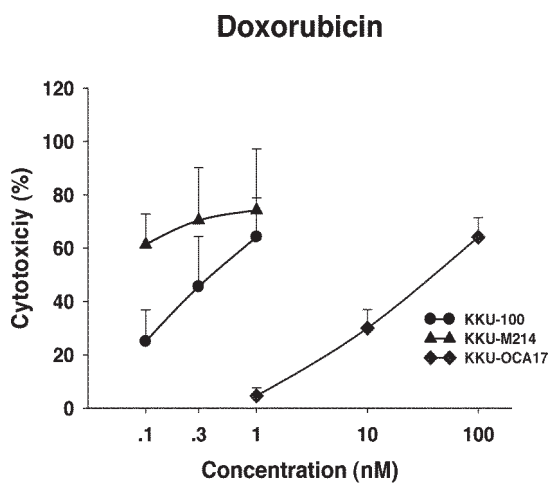
### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินและยาเคมีบำบัดที่ทำลาย เซลล์ได้ร้อยละ 50 ของการเจริญสูงสุด ( $IC_{50}$ ) คำนวณโดยใช้ nonlinear regression ในโปรแกรม SigmaPlot version 9 และการทำลายเซลล์มะเร็งคำนวณเป็นร้อยละ ได้จาก การนับเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มที่ได้รับยาต่อกลุ่มที่ไม่ได้รับยา =  $100 - (\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากกลุ่มที่ได้รับยา} / \text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุม}) \times 100$  ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ทั้ง 3 เซลล์ แสดงเป็นค่า mean  $\pm$  SD จากค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง

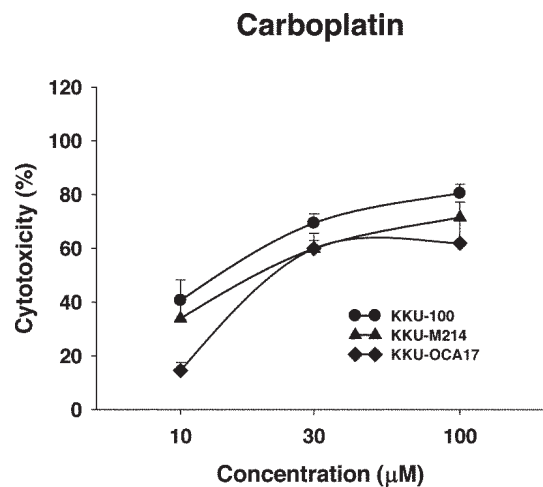
### ผลการศึกษา

#### ผลของยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมินต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

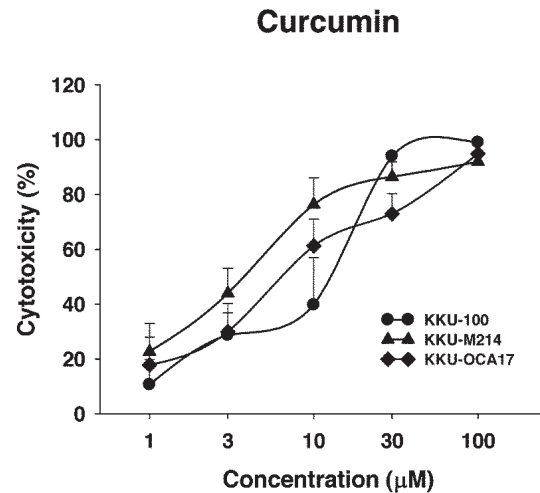
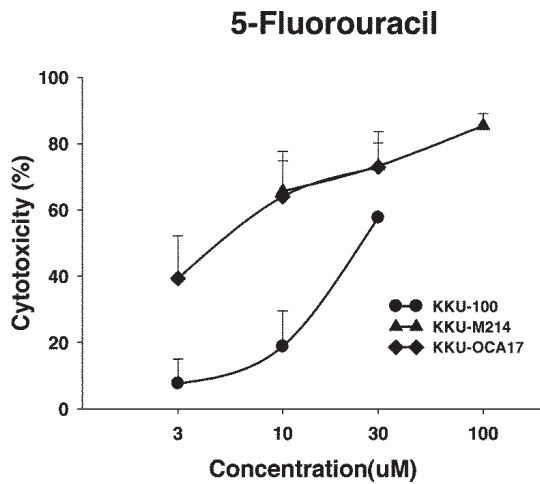
เมื่อเซลล์ KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 ได้รับ ยาเคมีบำบัด พบว่า doxorubicin ให้เปอร์เซ็นต์การทำลาย เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M214 ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 74.2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100 และ KKU-OCA17 carboplatin ให้เปอร์เซ็นต์การทำลายเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100 ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 80.5 เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M214 และ KKU-OCA17 5-fluorouracil ให้เปอร์เซ็นต์การทำลายเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M214 สูงสุด เท่ากับร้อยละ 83.1 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100 และ KKU-OCA17 และเคอร์คูมิน พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์ การทำลายเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 เซลล์ใกล้เคียงกันคือ อยู่ใน ช่วงร้อยละ 94 ถึง 99 (รูปที่ 1-4)



รูปที่ 1 ผลการทำลายของเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 เมื่อได้รับยา doxorubicin ที่ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแสดงค่า mean $\pm$ SD จาก 3 การทดลอง



รูปที่ 2 ผลการทำลายของเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 เมื่อได้รับยา carboplatin ที่ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแสดงค่า mean $\pm$ SD จาก 3 การทดลอง



**รูปที่ 3** ผลการทำลายของเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 เมื่อได้รับยา 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแสดงค่า mean±SD จาก 3 การทดลอง

**รูปที่ 4** ผลการทำลายของเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 เมื่อได้รับ curcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแสดงค่า mean±SD จาก 3 การทดลอง

เมื่อนำมาคำนวณเป็น  $IC_{50}$  พบว่า เมื่อเซลล์ KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 ได้รับยาเคมีบำบัด ได้แก่ 5-fluorouracil, carboplatin และ doxorubicin พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100 จะไวต่อ doxorubicin มากที่สุดคือค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.7 nmol/l รองลงมาคือ curcumin, carboplatin และ 5-fluorouracil โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 10.2, 11.1 และ 19.5  $\mu\text{mol/l}$  ตามลำดับ เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M214 ไวต่อ doxorubicin มากที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.4 nmol/l

รองลงมาคือ 5-fluorouracil, curcumin และ carboplatin ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5, 5.4 และ 18.2  $\mu\text{mol/l}$  ตามลำดับ และเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-OCA17 ไวต่อ doxorubicin เช่นเดียวกันโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 18.96 nmol/l รองลงมาคือ 5-fluorouracil, curcumin และ carboplatin ค่า  $IC_{50} = 3.9, 17.1, 20.2 \mu\text{mol/l}$  ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

จากค่าแสดง  $IC_{50}$  และ เปอร์เซ็นต์การทำลายเซลล์ พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100 และ KKU-M214 จะไวต่อยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมินมากที่สุด

**ตารางที่ 1** ค่า  $IC_{50}$  ของยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมินต่อการทำลายเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 เมื่อได้รับยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็น เวลา 48 ชั่วโมง

| Drugs                                | CCA cell lines  |                 |                  |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
|                                      | <i>KKU-K100</i> | <i>KKU-M214</i> | <i>KKU-OCA17</i> |
|                                      | $IC_{50}$       | $IC_{50}$       | $IC_{50}$        |
| Doxorubicin (nmol/l)                 | 0.69±0.88       | 0.42±0.64       | 18.96±11.13      |
| Carboplatin ( $\mu\text{mol/l}$ )    | 11.09±1.78      | 18.17±18.08     | 20.18±5.22       |
| 5-Fluorouracil ( $\mu\text{mol/l}$ ) | 19.48±10.36     | 5.00±6.14       | 3.87±3.04        |
| Curcumin ( $\mu\text{mol/l}$ )       | 10.16±7.11      | 5.36±4.16       | 17.1±18.41       |

ข้อมูล แสดงค่า mean±SD จากค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง

## วิจารณ์

ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการทดลองเพื่อหาความไวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีต่อยาเคมีบำบัดและเคอร์คูมิน โดยยาเคมีบำบัดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้เลือกทดสอบยาเคมีบำบัดที่ใช้ทั่วไปในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ 5-fluorouracil, doxorubicin<sup>18</sup> และ carboplatin<sup>19</sup> โดยผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่า การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงต่อยาเคมีบำบัดจะแตกต่างกันตามชนิดของยาเคมีบำบัด ซึ่งโดยรวมแล้วเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-100, KKU-M214 และ KKU-OCA17 จะไวต่อ doxorubicin และเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 เซลล์จะไวต่อ carboplatin

ผลการศึกษาค้นคว้านี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tepsiri และคณะ<sup>9</sup> ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด ต่อยาเคมีบำบัด 13 ชนิด กล่าวคือ ยา doxorubicin มีฤทธิ์สูงกว่า 5-fluorouracil และ carboplatin แต่อย่างไรก็ตาม ค่า IC<sub>50</sub> ของการศึกษาทั้งสองมีทั้งที่คล้ายคลึงกันและแตกต่างกันมาก เช่น ค่า IC<sub>50</sub> ของ doxorubicin ในรายงานก่อนพบว่า อยู่ในช่วง 0.25-2.3 µmol/l ในขณะที่ในรายงานนี้ พบอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่ามาก 0.4-19 nmol/l มีข้อสังเกตว่าการศึกษาทั้งสองใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่ต่างกัน การทดลองครั้งนี้ใช้การนับจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่ตรงไปตรงมา วิธีการวิเคราะห์การรอดของเซลล์ที่นิยมใช้ทั่วไป คือ การใช้สีที่รีดิวซ์ได้ เช่น MTT หรือ MTS หลักการคือ สีเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียเกิดสารมีสีขึ้น ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียและการเกิดสีขึ้นจึงนำมาสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยอมรับว่าสีเหล่านี้ไม่ว่า MTT, MTS หรือ resazurin สามารถถูกรีดิวซ์ได้ด้วยเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมและโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก pyridine nucleotide หรือโดยอนุมูลอิสระออกซิเจน<sup>20, 21</sup> ดังนั้น ผลการวัดการทำงานของเอนไซม์รีดักเตสเหล่านี้ จึงอาจไม่ได้บ่งบอกถึงการตายของเซลล์โดยตรง การวัดโดยการย้อมสีนับจำนวนเซลล์จึงน่าจะให้ค่าที่แน่นอนกว่าแม้จะเปลืองแรงงานมากกว่า

ในแง่การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 3 เซลล์ต่อเคอร์คูมิน พบว่า เคอร์คูมินสามารถทำลายเซลล์เพาะเลี้ยงได้ทั้ง 3 ชนิด และเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิดส่วนใหญ่จะไวต่อเคอร์คูมิน โดยพิจารณาจากค่า IC<sub>50</sub> ซึ่งอยู่ในช่วง 3 - 17 µmol/l จากผลการศึกษาในครั้งนี้และที่ผ่านมา เคอร์คูมินเป็นสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งตั้งแต่ระยะเริ่มแรกจนถึงระยะลุกลามซึ่งในมะเร็งส่วนใหญ่เชื่อว่า เคอร์คูมินมีผลยับยั้ง cytokine และ transcription factor ที่เกี่ยวกับการเจริญ การเพิ่มจำนวนและการมีชีวิตรอดของเซลล์<sup>12</sup> อย่างไรก็ตามในมะเร็งท่อน้ำดี

กลไกในการทำลายเซลล์ของเคอร์คูมินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้านี้แสดงค่า IC<sub>50</sub> ของ doxorubicin และ carboplatin อยู่ในช่วงระดับยาที่สามารถเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยาดังกล่าว แต่การคาดคะเนผลจากการทดลองไปยังมนุษย์ยังมีปัจจัยเกี่ยวข้องอีกมาก

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาใน *in vitro* ครั้งนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติความไวของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่เป็นโมเดลในการศึกษาต่อยาเคมี และเพื่อพัฒนาระบบการทดสอบยาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้การศึกษาศักยภาพในการเป็นเคมีบำบัดเสริมของเคอร์คูมินจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปพัฒนากลยุทธ์ในการใช้เคมีบำบัดรักษามะเร็งท่อน้ำดี

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 2550 และทุนอุดหนุนการทำวิจัยทั่วไป คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2550 นางสาวบุญเลี้ยง สุพิมพ์ ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาจากศูนย์พยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2550

## เอกสารอ้างอิง

1. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *N Engl J Med* 1999; 341:1368-78.
2. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, et al. Cancer incidence in Thailand, 1995-1997. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6:276-81.
3. Srivatanakul P, Ohshima H, Khat M, Parkin M, Sukaryodhin S, Brouet I, et al. Opisthorchis viverrini infestation and endogenous nitrosamines as risk factors for cholangiocarcinoma in Thailand. *Int J Cancer* 1991; 48:821-5.
4. Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, et al. Extended hepatic resection and outcomes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10:259-64.
5. Uttaravichien T, Bhudhisawasdi V, Pairojkul C, Pugkhem A. Intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6:128-35.
6. Choi CW, Choi IK, Seo JH, Kim BS, Kim JS, Kim CD, et al. Effects of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of pancreatic-biliary tract adenocarcinomas. *Am J Clin Oncol* 2000; 23:425-8.

7. Eng C, Ramanathan RK, Wong MK, Remick SC, Dai L, Wade-Oliver KT, et al. A Phase II trial of fixed dose rate gemcitabine in patients with advanced biliary tree carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2004; 27:565-9.
8. Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V, et al. Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11:2748-53.
9. Willett WC. Diet and breast cancer. *J Intern Med* 2001; 249:395-411.
10. Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1994; 54:5841-7.
11. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41:1955-68.
12. Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999; 18:6013-20.
13. Chen A, Xu J, Johnson AC. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene* 2006; 25:278-87.
14. Singh SV, Hu X, Srivastava SK, Singh M, Xia H, Orchard JL, et al. Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. *Carcinogenesis* 1998; 19:1357-60.
15. Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate* 2001; 47:293-303.
16. Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem* 2005; 280:20059-68.
17. Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:1962-6.
18. Harvey JH, Smith FP, Schein PS. 5-Fluorouracil, mitomycin, and doxorubicin (FAM) in carcinoma of the biliary tract. *J Clin Oncol* 1984; 2:1245-8.
19. Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Waugh KA, Hoque AM, Frome AI, et al. Phase II trial of cisplatin, interferon alpha-2b, doxorubicin, and 5-fluorouracil for biliary tract cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3375-80.
20. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303:474-82.
21. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 1991; 51:2515-20.

