สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่ RX-AR-073/2551

อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ของขมิ้นชันในการป้องกันการทำลายตับจากพิษของเอทานอลในหนูทดลอง

Hepatoprotective effect of *Curcuma longa* in ethanol-induced rat hepatic injury

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ผศ.ดร. นันทีทิพ ลิ้มเพียบชอบ	คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร
ผศ.ดร. สกลวรรณ ประพฤติบัติ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 5 JUL 2011
เลขทะเบียน 1563975 x
เลขเรียกหนังสือ 2 RM
666
.C96
W4375
2553

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัยนี้ จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และหน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการไปได้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2551

บทคัดย่อ

สาเหตุหลักของโรคตับแข็งและโรคตับจากแอลกอฮอล์มาจากการได้รับแอล์กอฮอล์ติดต่อกันนาน พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับเกิดการอักเสบต่อเนื่องทำให้เซลล์ตับถูกทำลาย ส่งผลให้การทำงานของตับล้มเหลวในที่สุด ในทางคลินิกยังไม่มียารักษาโรคนี้โดยเฉพาะ การนำพืชสมุนไพรหรือสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้รักษาหรือชะลอความรุนแรงของโรค จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการพัฒนายาสำหรับรักษาโรคนี้ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เป็นสมุนไพรท้องถิ่นในประเทศไทย สารสกัดจากขมิ้นชัน curcuminoid พบว่าที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบได้ดี ในการศึกษานี้จึงมุ่งทดสอบประสิทธิภาพของ curcuminoid ในการเป็นสารป้องกันตับ (hepatoprotective agents) จากพิษของแอลกอฮอล์ โดยทำการกระตุ้นหนูขาวใหญ่ให้เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังจากการได้รับเอทานอลติดต่อกันนาน 60 วัน จากนั้นได้รับ curcuminoid ในขนาดต่างๆ (250, 500, 750 mg/kg/day) ต่อเนื่อง 30 วัน ผลการวิจัยพบว่า curcuminid ในขนาด 500 และ 750 mg/kg/day สามารถลดระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ในซีรั่ม ที่เพิ่มสูงขึ้นในภาวะตับอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูตับอักเสบที่ไม่ได้รับ curcuminoid และมีประสิทธิภาพในการลด AST และ ALT ได้ใกล้เคียงกับ sylimarin ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าภาวะตับอักเสบเรื้อรังมีระดับของ oxidative stress เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismuates ในไมโครโซมตับ อย่างไรก็ต่อตาม curcuminoid ในขนาด 500 และ 750 mg/kg/day สามารถลดระดับ oxidative stress ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การวิจัยนี้ในเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่า curcuminoid สามารถลดภาวะตับอักเสบและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพิษของเอทานอล และ curcuminoid ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารป้องกันตับจากพิษของแอลกอฮอล์

Abstract

Mainly cause of cirrhosis and alcoholic liver disease are from long term alcohol exposures. Pathophysiology of continuous inflammatory processes in the hepatic tissues results in hepatic cells damage and finally, hepatic failure. In clinical treatment, there is still no specific drug to cure the diseases. Herbal plants and their extracts would be an option for drug development to treat and protect the progression of the diseases. Turmeric (*Curcuma longa*) is a native tropical herbal plant in Thailand. An extract from turmeric, curcuminoid contains strong antioxidant and anti-inflammatory properties. Therefore, the aim of this study is to determine an effect of curcuminoid as a hepatoprotective agent for an alcohol-induced toxicity. Rats were stimulated with ethanol for 60 days to become chronic hepatitis and then given various doses of curcuminoid (250, 500, 750 mg/kg/day) for another 30 days. The results demonstrated that 500 and 750 mg/kg/day of curcuminoids demolish the increases of hepatic enzymes; aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (AST) significantly ($p \leq 0.05$) in hepatitis rats, compared with the hepatitis rats without curcuminoid treatment. The reduction of the hepatic enzyme levels via curcuminoid were similar to an effect of sylimarin. In this study, oxidative stress production was slightly increased and there was no change in superoxide dismutase enzyme activity in microsomal extracts from the hepatitis rats. However, curcuminoid (500 and 750 mg/kg/day) could decrease the oxidative stress products significantly, compared with the control group. This study, basically, demonstrated that curcuminoid decreases hepatitis and oxidative stress in ethanol-induced toxicity. Curcuminoid, one of a local Thai herbal plant shows a potential to develop as a hepatoprotective drug.

Exclusive Summery

ในประเทศไทยเป็นแหล่งของพืชสมุนไพรหลายชนิด และมีการใช้มานาน บางชนิดที่มีการศึกษาฤทธิ์และความปลอดภัยเบื้องต้นได้จัดอยู่ในบัญชีสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน สมุนไพรเหล่านี้ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรค นอกจากนี้มีสมุนไพรหรือสารสกัดจากสมุนไพรจำนวนมากที่มีฤทธิ์เสริมสร้างสุขภาพและชะลอความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะภาวะของโรคเรื้อรังหลายชนิดที่ยังไม่มียาแผนปัจจุบันที่สามารถรักษาได้ ดังนั้นการใช้ยาสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง โรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver diseases) ซึ่งมีสาเหตุหลักจากการได้รับแอลกอฮอล์ติดต่อกันเป็นเวลานาน นับเป็นหนึ่งของโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของไทยและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะค้นหาสมุนไพรที่สามารถใช้บรรเทาป้องกันหรือลดการทำลายเซลล์ตับ (hepatoprotective effect) ในผู้ที่มีภาวะตับแข็ง

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เป็นสมุนไพรที่มีรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ คณะผู้วิจัยจึงคาดว่าขมิ้นชันอาจมีผลดีต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็งที่เกิดจากการติดสุราเรื้อรัง และอาจสามารถใช้อย่างต่อเนื่องเพื่อลดความรุนแรงของโรคได้ เนื่องจากมีข้อมูลรายงานว่าขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูงทั้งในคนและในสัตว์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลการออกฤทธิ์ของขมิ้นชันต่อการป้องกันการทำลายตับที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์โดยตรง ผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการวิจัยนี้ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชัน (curcuminoid) ในการป้องกันหรือบรรเทาการทำลายเซลล์ตับของหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันตับ (hepatoprotective effect) ของสารสกัดขมิ้นชันในหนูที่ตับได้รับพิษจากแอลกอฮอล์ และเพื่อประเมินผลของสารสกัดขมิ้นชันในการเปลี่ยนแปลงระดับอนุมูลอิสระ (oxidative stress) และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับของหนูทดลอง โดยใช้หนูขาวใหญ่ที่ทำให้เกิดภาวะของโรคตับโดยการให้เอทานอลติดต่อกันเป็นเวลานาน และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำลายตับของสารสกัดขมิ้นชัน โดยจะเปรียบเทียบกับการใช้สารมาตราฐาน คือ silymarin ซึ่งเป็นสารสกัดสมุนไพรที่นิยมให้ในปัจจุบัน

จากผลศึกษาพบว่า สารสกัดจากขมิ้นชันสามารถลดภาวะตับอักเสบจากความเป็นพิษของเอทานอลในหนูขาวที่ได้รับเอทานอลติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ซึ่งคล้ายกับพยาธิสภาพของโรคตับอักเสบจากแอลกอฮอล์และโรคตับแข็งได้ดี และสารสกัดจากขมิ้นชันลดการสร้าง oxidative stress ได้ แม้ว่าจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนไมโครโซมของตับ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารสกัดจากขมิ้นชันมาใช้เป็นสารชะลอหรือป้องกันโรคตับจากพิษแอลกอฮอล์ (hepatoprotective agents)

องค์ความรู้จากการศึกษานี้ เบื้องต้นจะเป็นข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในระดับสูงขึ้นต่อไป การศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ และความเป็นพิษ รวมทั้งเภสัชจลนพลศาสตร์ที่ชัดเจนของสาร

สกัดขมิ้นชันในภาวะตับอักเสบต่อไป และผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ ซึ่งจะเป็นหลักฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่จะช่วยยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยของขมิ้นชัน

เนื้อหาการวิจัย

บทนำ

โรคตับเป็นสาเหตุสำคัญลำดับต้นๆ ของการเสียชีวิตในคนไทย โรคตับอักเสบเรื้อรังจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) และโรคตับแข็ง (cirrhosis) เป็นโรคตับที่พบในประชากร ไทย และคาดว่าจะมีแนวโน้มการเกิดโรคมากขึ้น สาเหตุของโรคตับมีหลายประการที่พบบ่อยในคนไทย เกิดจากการดื่มสุราในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานานและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี การดื่มสุราในปริมาณอย่างน้อย 240 ซีซี ติดต่อกันเป็นเวลา ประมาณ 10 ปี มีโอกาสทำให้เกิดโรคตับแข็ง ได้สูงถึงร้อยละ 30 จากฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) และการ รวบรวมของศูนย์วิจัยปัญหาสุราพบว่า แนวโน้มปริมาณเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่คนไทยบริโภคสูงขึ้น ทุกปี ข้อมูลจากปี พ.ศ. 2541 ถึง พ.ศ. 2543 มีการจัดอันดับการบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกประเภท คือ สุรา เบียร์ และไวน์ พบว่าคนไทยมีการเปลี่ยนแปลงอันดับ การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ จากอันดับที่ 30 ของโลกมาเป็นอันดับที่ 5 ของโลก โดยอันดับที่น้อยหมายความว่ามีการดื่มปริมาณ แอลกอฮอล์สูง โรคตับแข็งเกิดจากเซลล์ตับเกิดภาวะอักเสบอยู่นานเนื่องจากมีการทำลายเซลล์ตับดี จากสารพิษ เช่น แอลกอฮอล์หรือการติดเชื้อ เซลล์ตับที่ตายเกิดเป็นพังผืด (fibrosis) และทำให้ เนื้อตับแข็งซึ่งส่งผลต่อการทำงานปกติของตับและมีผลต่อระบบอื่นๆในร่างกาย ในระยะแรกอาจไม่มี ผลต่อการดำเนินชีวิต เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้นเรื่อยๆและทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนได้ จนกระทั่งการทำงานของตับล้มเหลวและมีผลถึงชีวิตในที่สุด ปัจจุบันการรักษาโรคตับแข็ง คือ การชะลอความ รุนแรงของโรค โดยการป้องกันไม่ให้เซลล์ตับที่เหลืออยู่เกิดการอักเสบและตายไป ในขณะเดียวกันให้ เวลาเซลล์ตับใหม่ถูกสร้างขึ้นมา ส่วนเนื้อตับที่ตายแล้วและเกิดพังพืดจะไม่สามารถรักษาให้เหมือน เดิมได้ การรักษาทางคลินิกของโรคตับแข็งที่สำคัญคือ การให้ผู้ป่วยหลีกเหลี่ยงจากปัจจัยที่ทำให้เกิด การทำลายเซลล์ตับมากขึ้น ได้แก่ งดการดื่มแอลกอฮอล์ ดูแลสุขภาพให้แข็งแรงด้วยโภชการที่ถูกต้อง และการให้วิตามินบำรุงร่างกายเท่านั้น สำหรับการรักษาทางยานั้นยังไม่ยาที่ใช้รักษาตับแข็งในทางคลินิก และมีความพยายามใช้ยาที่สามารถช่วยป้องกันหรือลดการทำลายเซลล์ตับจากภาวะอักเสบ

ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่คาดว่ามีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ตับ (hepato - protective effect) ใช้เป็นยาช่วยชะลอการดำเนินของโรคและการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ สารสกัดกลุ่มฟลาวานอยด์ จากเมล็ดต้น Milk Thistle ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Silybum Marianum* คือ ซีลิมาริน (silymarin) และอนุพันธ์ในกลุ่มได้มีการศึกษาและผลิตจำหน่ายโดยบริษัทยาต่างชาติเพื่อใช้เป็นยาป้องกันตับ (hepatoprotectant) ในผู้ป่วยโรคตับแข็งและตับอักเสบ แพทย์ในโรงพยาบาลต่างๆในประเทศไทยได้มีการจ่ายยานี้ให้ผู้ป่วยโรคตับแม้ว่า silymarin จะเป็นยานอกบัญชียาหลักแห่งชาติและมีราคาสูงมาก ประเทศไทยมีสมุนไพรหลายชนิดที่ได้รับการศึกษาเบื้องต้นทางด้านประสิทธิภาพ และ

ความปลอดภัยในการใช้ทางคลินิกและได้บรรจุไว้เป็นยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* Linn) เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับการบรรจุในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีข้อบ่งใช้สำหรับรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร จากการศึกษาคุณสมบัติของขมิ้นชัน และสารสกัดที่สำคัญจากเหง้าของขมิ้นชัน คือ เคอร์คิวมิน (curcumin) เป็นสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoid) มีการกล่าวถึงฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายตับได้ รวมทั้งคุณสมบัติในการต้านการอักเสบได้ดี ต้านการ ติดเชื้อและต้านมะเร็ง จากการศึกษาทางพิษวิทยาของ curcumin ไม่พบพิษต่อตับแม้ว่าจะให้ใน ขนาดสูงมากในหนูทดลอง จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ของ curcumin ในการป้องกันการทำลายเซลล์ตับ การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นไปได้ในการนำขมิ้นชันซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยมาใช้เป็นยาป้องกันตับ (hepatoprotectant) ในโรคตับแข็ง เป็นการส่งเสริมการพัฒนาทรัพยกรที่มีอยู่ใน ประเทศไทย และลดค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการใช้ยาต่างประเทศที่มีราคาสูง โดยเบื้องต้นมุ่งดูฤทธิ์ของ สารสกัด curcumin ในการป้องกันการทำลายตับที่เกิดจากพิษของเอทานอล

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันตับ (hepatoprotective effect) ของสารสกัดขมิ้นชันในหนูที่ตับได้รับพิษจากเอทานอล
2. เพื่อประเมินผลของสารสกัดขมิ้นชันในการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes)ในตับของหนูทดลอง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันตับของขมิ้นชัน ซึ่งในการศึกษาจะใช้สารสกัดขมิ้นชัน (curcuminoid powder) ที่ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูขาวใหญ่ที่ทำให้เกิดภาวะโรคตับโดยการให้เอทานอลติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำลายตับของสารสกัดขมิ้นชันจะถูกเปรียบเทียบกับการใช้สารมาตรฐาน คือ silymarin ซึ่งเป็นสารสกัดสมุนไพรที่นิยมใช้ในต่างประเทศ และทำการทดสอบว่ากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัด curcuminoid โดยการวัดผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับหนูที่ทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรัง

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (informations) ที่เกี่ยวข้อง

ตับ (liver) เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญมากต่อการทำงานปกติของร่างกาย และมีหน้าที่หลากหลาย อาทิ สร้างและขับน้ำดี เผาผลาญและสร้างเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตและไขมัน เฝ้าระวังสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย เปลี่ยนแปลงวิตามิน ยาต่างๆ และฮอร์โมน เมื่อตับได้รับอันตรายโดยเฉพาะกรณีที่ตับได้รับพิษติดต่อกันนานๆ เซลล์ตับส่วนใหญ่ถูกทำลายกลายเป็นพังผืด

(fibrosis) และเกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) เซลล์ตับส่วนนั้นจะไม่สามารถกลับมาทำงานได้ ตับจะสูญเสียการทำงานกระทั่งร่างกายไม่สามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ และสุดท้ายผู้ป่วยจะทำให้เสียชีวิต (Heidelbaugh J, 2006)

ตับแข็ง (cirrhosis) เป็นหนึ่งในโรคตับที่พบในประชากรไทยและคาดว่าจะมีแนวโน้มการเกิดโรคตับแข็งมากขึ้น สาเหตุของโรคตับมีหลายประการที่พบบ่อยในคนไทยเกิดจากการดื่มสุราในปริมาณมากติดต่อกัน ตับแข็งเป็นโรคที่เกิดจากตับอยู่ในภาวะอักเสบต่อเนื่องจากการที่เซลล์ตับได้รับอันตรายเป็นเวลานานเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ การได้รับยา บางชนิดติดต่อกันเป็นเวลานาน เช่น ยากดภูมิคุ้มกัน methotrexate และการติดสุราเรื้อรัง การเกิดพยาธิสภาพของตับแข็งพบว่า เซลล์ตับเกิดภาวะอักเสบต่อเนื่อง และมีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ซึ่งมีผลทำลายเอนไซม์และโมเลกุลโปรตีนต่างๆ ทำให้เซลล์เสียสภาพการทำงาน เกิดการสร้างผังผืด (fibrosis) และทำลายเซลล์ในที่สุด (O'Shea *et al.*, 2010) อาการทางคลินิกของโรคตับแข็งขึ้นอยู่กับสภาพตับของผู้ป่วย ในระยะแรกเซลล์ตับส่วนใหญ่ยังอยู่ในสภาพดี ผู้ป่วยมัก มีอาการไม่เด่นชัด เช่น อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เมื่อการดำเนินของโรคมากขึ้นและไม่มีการป้องกัน การทำลายเซลล์ตับ เซลล์ตับที่ดีเหลือน้อยผู้ป่วยจะมีอาการเนื่องจากการทำงานของตับเสียไป ได้แก่ ตัวเหลือง ตาเหลืองจากดีซ่าน (jaundice), ท้องมาน (ascites) ขาบวมเท้าบวม มีจ้ำเลือดเขียว ตามตัวเนื่องจากเลือดออกง่าย การแข็งตัวเลือดผิดปกติ ผิวหนังมีสีคล้ำ ติดเชื้อง่ายเนื่องจาก ภูมิคุ้มกันลดลง มีอาการในระบบสมองส่วนกลาง (hepatic encephalopathy) มีการคั่งของของเสีย (urea) และสารพิษต่างๆในร่างกายสูงมากขึ้น เกิดภาวะความดันในหลอดเลือดดำที่ไปเลี้ยงตับสูง (portal hypertension) มีโอกาสทำให้หลอดเลือดดำที่ไปเลี้ยงตับและทางเดินอาหารแตกได้ ผู้ป่วยจะมีอาการอาเจียนเป็นเลือดหรือถ่ายดำ นอกจากนี้ผู้ป่วยตับแข็งจะเกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นๆที่รุนแรง ได้ เช่น ผลต่อระบบไต (hepatorenal syndrome) และมะเร็งตับ (Gramenzi *et al.*, 2006; Heidelbaugh J, 2006) ในปัจจุบันการรักษาทางคลินิกของผู้ป่วยตับแข็งเป็นการรักษาตามอาการของผู้ป่วย และให้การดูแลทางด้านโภชนาการเป็นหลัก ส่วนเซลล์ตับที่เกิดเป็นพังผืดแล้วจะไม่สามารถรักษาให้กลับมาเป็นเซลล์ตับปกติได้อีก การรักษาที่ดีที่สุดคือการชะลอภาวะตับอักเสบ และลดการทำลายเซลล์ตับ (Lieber, 2005) ฉะนั้นคำแนะนำ สำหรับผู้ป่วยตับแข็งคือ หลีกเลี่ยงสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น งดดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ในรายที่สาเหตุมาจากการดื่มแอลกอฮอล์ หรือในรายที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบต้องรักษาด้วยยาต้านไวรัสที่เหมาะสม (Hou *et al.*, 2010) ผู้ป่วยตับแข็งต้องได้รับการพักผ่อนที่เพียงพอและอาหารครบส่วนโดยเฉพาะโปรตีน (Heidelbaugh J, 2006) สำหรับการรักษาตับแข็งด้วยยานั้นยังไม่มียาที่ใช้รักษาโรคตับแข็งโดยเฉพาะในทางคลินิก มีเพียงการใช้ยารักษาผู้ป่วยตามอาการเท่านั้น ในปัจจุบันการใช้สมุนไพรและสารสกัดสมุนไพรเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาโรคตับแข็ง โดยคาดว่าจะสามารถช่วยป้องกันการทำลายเซลล์ตับและมีฤทธิ์ชะลอภาวะอักเสบ

เรื้อรังได้ ทำให้เซลล์ตับดีที่เหลืออยู่ไม่ถูกทำลาย การนำสารสกัดจากต้น Milk Thistle (*Silybum Marianu)* คือ ซีลิมาริน (silymarin) มาใช้ทางคลินิก เพื่อช่วยป้องกันการทำลายเซลล์ตับ (hepatoprotective effect) แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญ และการศึกษาความเป็นพิษในคนยังไม่ทราบแน่นอน นอกจากนี้สารสกัด silymarin เป็นยานำเข้า และมีราคาแพงมาก (Crocenzi FA, 2006)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn) พืชในกลุ่ม Zingiberaceae เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศไทยที่มีการนำมาใช้ในการรักษาอาการในระบบทางเดินอาหารและทางผิวหนังมานาน ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาคือส่วนเหง้าของขมิ้นชัน สารสำคัญที่สกัดได้จากเหง้าขมิ้นชัน คือ เคอร์คิวมิน (curcumin) เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) นับแต่มีการสกัดสาร curcumin จากขมิ้นชัน ปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆของ curcumin รวมทั้งคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา (Sharma *et al.*, 2005; Rivera-Espinoza and Muriel, 2009; Thomas-Eapen, 2009) จากการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ เมื่อให้ curcumin ในหนูทดลองด้วยการรับประทาน curcumin สารจะถูกดูดซึมได้ค่อนข้างน้อย curcumin ถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับได้สาร dihydrocurcumin และ tetrahydrocurcumin และถูกขจัดออกทางปัสสาวะบางส่วน ในรูป glucuronide conjugated ร้อยละ 75 ของ curcumin จะถูกขับออกทางอุจจาระและน้ำดี ส่วนข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ ในคนของ curcumin ยังมีน้อยและไม่แน่ชัด (Aggarwal and Sung, 2009) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ curcumin พบว่ามีฤทธิ์หลากหลาย คือ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant), ต้านการอักเสบ (anti-inflammtory), ต้านมะเร็ง (anticancer), ฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรค (antimicrobial) รวมทั้งมีฤทธิ์สมานแผล ทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น และรักษาอาการผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืด แน่นเฟ้อ (Maheshwari *et al.*, 2006; Gautam *et al.*, 2007; Goel *et al.*, 2008) ผลของ curcumin ต่อโรคตับและฤทธิ์ในป้องกันการทำลายตับยังไม่มีการศึกษาแน่ชัด อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาเบื้องต้นในหลายการทดลอง จะเห็นว่า curcumin มีผลดีต่อเซลล์ตับและไม่เกิดพิษ คณะผู้วิจัยจึงคาดว่าขมิ้นชันอาจมีผลดีต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็งที่เกิดจากการติดสุราเรื้อรัง และอาจสามารถใช้อย่างต่อเนื่องเพื่อลดความรุนแรงของโรคได้ เนื่องจากมีข้อมูลรายงานว่าขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูงทั้งในคนและในสัตว์ ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ของขมิ้นชันจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการออกฤทธิ์ของขมิ้นชันต่อการป้องกันการทำลายตับที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์โดยตรง

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการป้องกันหรือบรรเทาการทำลายเซลล์ตับของหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางวิทยาศาสตร์ที่จะมีส่วนสนับสนุนและส่งเสริมให้มีการนำขมิ้นชันมาใช้ เพื่อชะลอความรุนแรงหรือบรรเทาอาการในผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็งที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์ได้หรือเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับลึกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สารสกัดขมิ้นชัน

ผงสารสกัดขมิ้นชัน (curcuminoid powder) จากองค์การเภสัชกรรม กรุงเทพมหานคร

การเตรียมสัตว์ทดลองและการกระตุ้นหนูทดลองด้วยเอทานอล

หนูขาวใหญ่เพศผู้ (rat) สายพันธุ์ Sprague-Dewley น้ำหนัก 230-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกนำมาพักในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองก่อนเริ่มการทดลองหนึ่งสัปดาห์ หนูได้รับน้ำและอาหารปกติ หนูถูกแบ่งกลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม
2. 60% glucose (isocaloric to ethanol) 2.5 ml/100 g (60 วัน); และ ณ วันที่ 31 ได้รับ vehicle (30 วัน)
3. 40% Ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 31 ได้รับ silymarin 100 mg/kg (30 วัน)
4. 40% Ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 31 ได้รับ vehicle (30 วัน)
5. 40% Ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 31 ได้รับ curcuminoid 250 mg/kg (30 วัน)
6. 40% Ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 31 ได้รับ curcuminoid 500 mg/kg (30 วัน)
7. 40% Ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 31 ได้รับ curcuminoid 750 mg/kg (30 วัน)

หนูจะได้สารต่างๆ ตามระบุตามกลุ่มหนูข้างต้นผ่านทางท่อให้อาหาร (feeding tube) สอดเข้าไปในหลอดอาหาร โดยหนูกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลได้รับ 40% เอทานอล ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 60 วัน ในขนาดเริ่มต้น 4 g/kg/day แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 14 วันจะมีการเพิ่มขนาดของเอทานอลเป็น 5 g/kg/day และ 6 g/kg/day ตามลำดับ จากนั้นได้รับเอทานอลในขนาดคงที่ 6 g/kg/day ไปตลอดระยะเวลาการทดลอง หลังจากหนูได้รับยาครั้งสุดท้าย ให้หนูอดอาหารและน้ำนาน 1 คืน ทำการสลบหนูด้วย pentobarbital และเก็บเลือดจากเส้นเลือด femoral เพื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมี จากนั้นทำให้ตายอย่างสงบและรวดเร็วแล้วทำการผ่าตัดเก็บตับเพื่อนำใช้ประเมินภาวะ oxidative stress ต่อไป

การทดสอบทางชีวเคมี

ซีรั่มที่ได้จากสัตว์ทดลองทุกตัวจะนำมาตรวจการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของตับ เช่น aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) ด้วยชุดน้ำยาตรวจการทำงานเอนไซม์ (Human, Wiesbaden, Germany) ผลการทดลองโดยอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) และนำค่ามาคำนวณกลับให้อยู่ในหน่วยของ traditional unit (U/L)

การสกัดไมโครโซมอล (microsomal extract) จากเนื้อเยื่อตับ

ตับหนูขาว 1 g ในสารละลาย 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) ใน phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ถูกนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และปั่นละเอียดด้วย homonenizer จากนั้นนำมาปั่นแยกด้วย centrifuge (10,000 g x 1 hour) ส่วน supernatant ถูกนำมาปั่นแยกอีกครั้งด้วย ultracentrifuge (60,000 rpm x 1 hour) แล้วแยกส่วนตกตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นส่วน microsomal extract จากเนื้อเยื่อตับ จากนั้นมาปั่นละเอียดด้วย homogenizer อีกครั้งในสารละลาย PBS ที่มี 20% glycerol และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับนำไปใช้วัด oxidative stress ต่อไป

การประเมินภาวะ oxidative stress ในตับ

วัดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยวิธี tiobarbituric acid reactive (TBARs) assay โดยจะวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตผลสุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่อยู่ในตับ โดยนำส่วน microsomal extract จากเนื้อเยื่อตับไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit (Pierce®) และแบ่งไปวัด TBARs โดยการเติม TBARs reagent (10% trichloroacetic acid, 1% thiobarbituric acid, 5% HCl และ 1% SDS) แล้ว incubate ที่ 90 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากทิ้งให้เย็นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm

วัดการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) นำส่วน microsomal extract จากเนื้อเยื่อตับวัดการทำงานของเอนไซม์ด้วย SOD assay kit-WST (Sigma-Aldrich, Switzerland) โดยเติมสาร WST working solution และ enzyme working solution นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที และวัดการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ 450 nm หลักการทำงานของชุดตรวจวัด ประกอบด้วยสาร WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) monosodium salt) ซึ่งเป็นสารที่จะถูกเปลี่ยนแปลงให้เกิดสีละลายน้ำ โดยอาศัยปฏิกริยาระหว่าง WST-1 กับ super oxide anion (O_2^-) ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ xanthin oxidase กระบวนการเกิดสีนี้จะถูกยับยั้งด้วยการทำงานของเอนไซม์ SOD ซึ่งสามารถเปลี่ยน (O_2^-) ให้เป็น oxygen การเกิด O_2 นี้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำงานของ SOD และการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสีของ WST-1 การวัดการทำงานของ SOD (SOD activity) จะแสดงในรูปของร้อยละการยับยั้งการเกิดสี WST-1 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (% inhibition)

วิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จะมีการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์ร่วมกับ curcuminoid และกลุ่มควบคุม โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ระหว่างแต่ละกลุ่มที่ทำการศึกษา

ผลการศึกษาวิจัย

ผลของ curcuminoid ต่อเอนไซม์ตับ ในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล

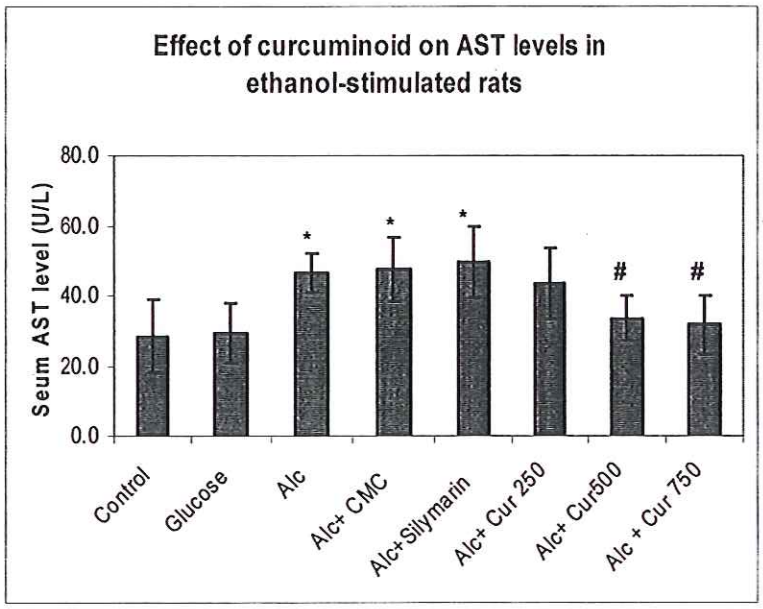
หนูขาวเพศผู้ได้รับเอทานอล (40% v/v) ในขนาด 4-6 g/kg/day เพื่อกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรัง เมื่อนำซีรั่มของหนูมาทดสอบหาระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของตับ (liver enzymes) ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatate (ALP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่บ่งชี้ภาวะเซลล์ตับถูกทำลาย พบว่า ภายหลังได้รับเอทานอลติดต่อกัน 60 วัน ระดับของเอนไซม์ AST และ ALT ในซีรั่มของหนูขาวเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมที่ไม่ได้รับเอทานอล แสดงถึงการเกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังในหนูขาวอย่างชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากนั้นหนูขาวในภาวะตับอักเสบถูกแบ่งกลุ่มได้รับยา sylimarin (Legalon®) 100 mg/kg/day, curcuminoid 250, 500, 750 mg/kg/day หรือสารละลายตัวนำ (vehicle) carboxymethylcellulose (CMC) เป็นระยะเวลาติดต่อกันอีก 30 วัน จากผลการตรวจวัดระดับเอนไซม์จากซีรั่มหนู แสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับ curcuminoid ขนาด 500 mg/kg/day และ 750 mg/kg/day สามารถลดระดับเอนไซม์ AST และ ALT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และลดลงมีระดับใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเอทานอล ส่วนหนูขาวตับอักเสบที่ได้รับ curcuminoid ในขนาดต่ำ 250 mg/kg/day หรือได้รับ sylimarin มีระดับเอนไซม์ AST ลดลงเล็กน้อย แต่ sylimarin มีผลลดระดับเอนไซม์ ALT ได้ค่อนข้างดี ในขณะที่หนูขาวตับอักเสบที่ได้รับเฉพาะสารสะลายตัวนำ CMC พบว่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ยังคงมีระดับสูงกว่าปกติ และหนูกลุ่มที่ได้รับ glucose ในขนาดที่ให้พลังงานเทียบเท่ากับกลุ่มที่ได้รับเอทานอล (isocaloric equivalence) นั้นระดับเอนไซม์ AST และ ALT ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม ดังกราฟที่ 1 และ 2 เมื่อวัดระดับเอนไซม์ alkaline phosphatate (ALP) ในซีรั่มหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลติดต่อกันและเกิดภาวะตับอักเสบ พบว่าระดับของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นบ้าง แต่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ ผู้วิจัยสังเกตุว่า sylimarin และ สาร curcuminoid ในขนาดสูงมีแนวโน้มลดระดับเอนไซม์ ALP ได้ ส่วนกลุ่มหนูที่ได้รับ glucose พบว่า ระดับ ALP ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเอทานอล ดังแสดงในกราฟที่ 3

ผลของ curcuminoid ต่อระดับ oxidative stress ในตับ

ตับหนูที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในภาวะตับอักเสบเรื้อรังที่ได้รับสารกลุ่มต่างๆและตับหนูกลุ่มควบคุมถูกนำมาปั่นแยกและนำเอา microsomal extract ที่ได้จากเนื้อเยื่อตับมาใช้ในการประเมินภาวะ oxidative stress โดยวัดหาปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยา lipid peroxidation โดยวิธีการ TBARs assay และนำค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบไปเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน (MDA standard curve) พบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลติดต่อกันและเกิดภาวะตับอักเสบจะมี

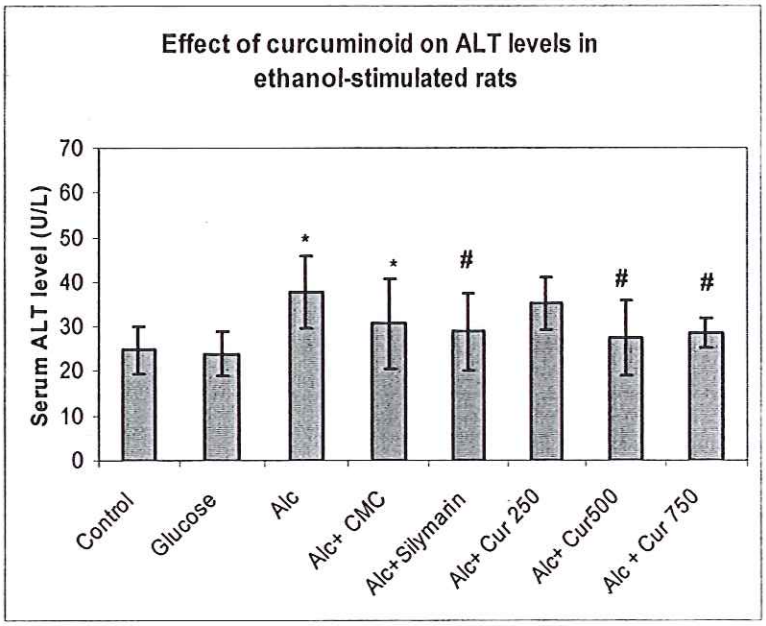
ระดับ MDA เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามกลุ่มหนูที่มีภาวะตับอักเสบและได้รับ curcuminoid ในขนาดต่างๆนั้น curcuminoid ในขนาด 500 และ750 mg/kg/day สามารถลดปริมาณ MDA ใน microsomal extract ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่เกิดภาวะตับอักเสบจากเอทานอลและหนูกลุ่มควบคุม (กราฟที่ 4) ในการศึกษานี้ sylimarin ซึ่งใช้เป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยตับอักเสบ (positive control) ไม่มีผลลดปริมาณ MDA ส่วนหนูที่ได้รับ glucose ในปริมาณที่ให้พลังงานเทียบเท่ากับหนูที่ได้รับเอทานอลติดต่อกัน พบว่ามีระดับ MDA ไม่แตกต่างจากลุ่มควบคุม ดังแสดงในกราฟที่ 4

การวัดการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) จาก microsomal extract ของตับหนูกลุ่มต่างๆ แสดงในรูปของเปอร์เซนต์การยับยั้ง (% inhibition) ของการเกิด oxygen species ($O_2^{\cdot}$) ในการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการทำงานของ SOD ในกลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลติดต่อกันจนเกิดภาวะตับอักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม กลุ่มหนูที่ได้รับ curcuminoid ในขนาดต่างๆ กลุ่มที่ได้รับ sylimarin รวมทั้งกลุ่มที่ได้รับ glucose มีระดับการทำงานของ SOD ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเช่นกัน (กราฟที่ 5)



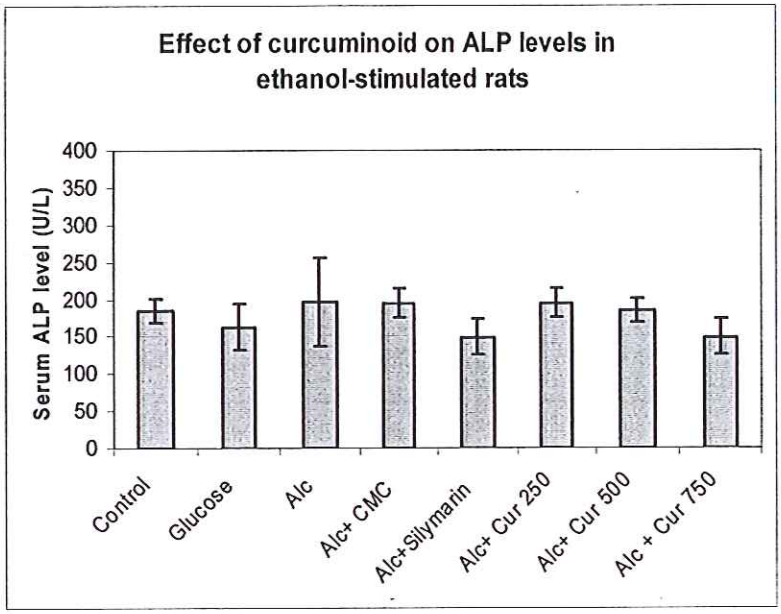
กราฟที่ 1 ผลของ curcuminoids ในขนาดต่างๆต่อระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) ในซีรั่มของหนูขาวใหญ่

Alc คือ กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล (40% v/v) ติดต่อกันนาน 60 วันจนเกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรัง, Alc + sylimarin คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลและ sylimarin ขนาด 100 mg/kg/day, AlC + Cur250, Alc + Cur500, Alc + Cur750 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอล และ curcuminoid ในขนาด 250, 500, 750 mg/kg/day ตามลำดับ, Alc + CMC คือกลุ่มหนูได้รับเอทานอลและ carboxymethylcellulose (CMC), Control คือ หนูกลุ่มควบคุมไม่ได้รับเอทานอล, Glucose คือหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลายglucose ในปริมาณที่ให้พลังงาน (isocalrolic equivalence) เทียบเท่ากับเอทานอลในหนูกลุ่มตับอักเสบเรื้อรัง ระดับเอนไซม์ AST ในซีรั่ม หน่วย U/ml แสดงค่า mean ± S.D จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 4-6 ตัว, * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มตับอักเสบ (one-way ANOVA)



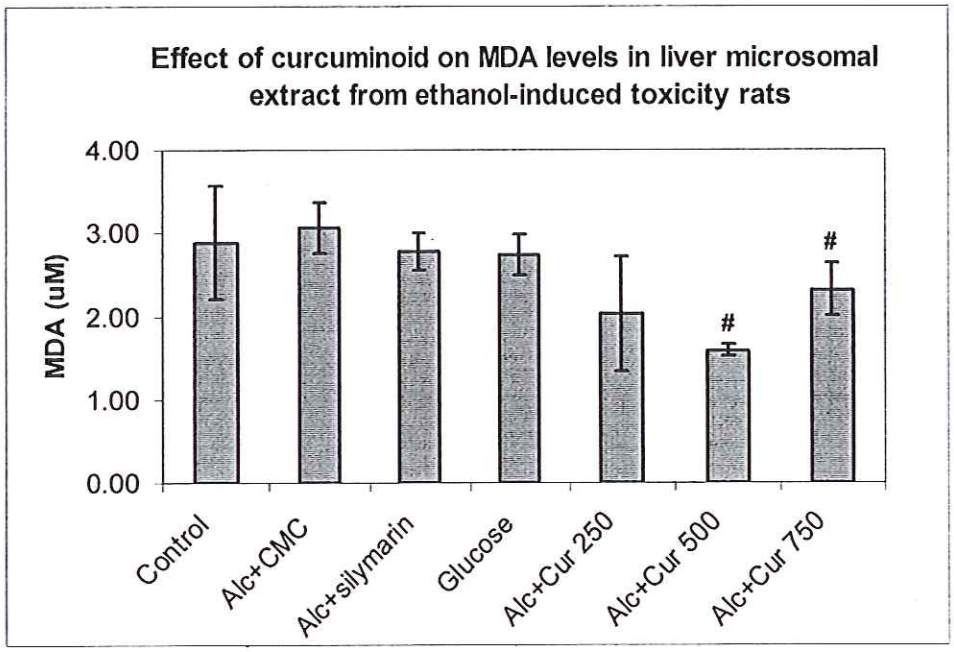
กราฟที่ 2 ผลของ curcuminoids ในขนาดต่างๆต่อระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ในซีรั่มของหนูขาวใหญ่

Alc คือ กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล (40% v/v) ติดต่อกันนาน 60 วัน จนเกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรัง, Alc + sylimarin คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลและ sylimarin ขนาด 100 mg/kg/day, AlC + Cur250, Alc + Cur500, Alc + Cur750 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอล และ curcuminoid ในขนาด 250, 500, 750 mg/kg/day ตามลำดับ, Alc + CMC คือกลุ่มหนูได้รับเอทานอลและ carboxymethylcellulose (CMC), Control คือ หนูกลุ่มควบคุมไม่ได้รับเอทานอล, Glucose คือหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลายglucose ในปริมาณที่ให้พลังงาน (isocalrolic equivalence) เทียบเท่ากับเอทานอลในหนูกลุ่มตับอักเสบเรื้อรังได้รับ ระดับเอนไซม์ ALT ในซีรั่ม หน่วย U/ml แสดงค่า mean ± S.D จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 4-6 ตัว, * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มตับอักเสบ (one-way ANOVA)



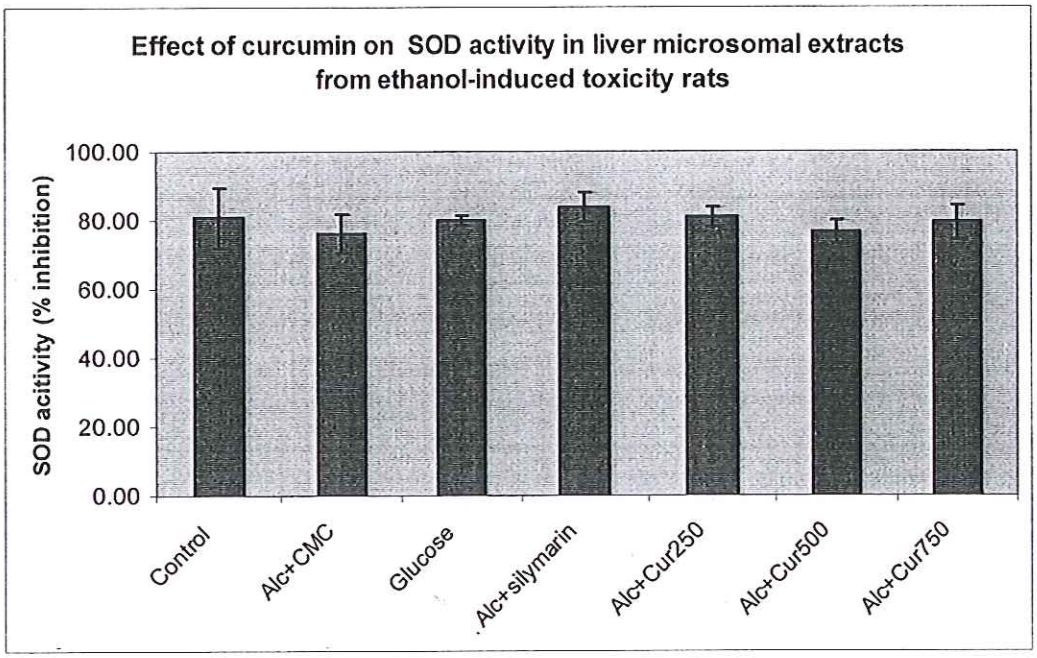
กราฟที่ 3 ผลของ curcuminoids ในขนาดต่างๆ ต่อระดับเอนไซม์ alkaline phosphatate (ALP) ในซีรั่มของหนูขาวใหญ่

Alc คือ กลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล (40% v/v) ติดต่อกันนาน 60 วัน จนเกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรัง, Alc + sylimarin คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลและ sylimarin ขนาด 100 mg/kg/day, AlC + Cur250, Alc + Cur500, Alc + Cur750 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอล และ curcuminoid ในขนาด 250, 500, 750 mg/kg/day ตามลำดับ, Alc + CMC คือกลุ่มหนูได้รับเอทานอลและ carboxymethylcellulose (CMC), Control คือ หนูกลุ่มควบคุมไม่ได้รับเอทานอล, Glucose คือหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลายglucose ในปริมาณที่ให้พลังงาน (isocalrolic equivalence) เทียบเท่ากับเอทานอลในหนูกลุ่มตับอักเสบเรื้อรังได้รับ ระดับเอนไซม์ ALP ในซีรั่ม หน่วย U/ml แสดงค่า mean ± S.D จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 4-6 ตัว, * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มตับอักเสบ (one-way ANOVA)



กราฟที่ 4 ผลของ curcuminoids ในขนาดต่างๆ ต่อระดับ malondialdehyde (MDA) โดย TBARs assay ใน microsomal extracts ของตับหนูขาวใหญ่

Alc + CMC คือกลุ่มหนูได้รับเอทานอลจนเกิดภาวะตับอักเสบและ carboxymethylcellulose (CMC), Control คือ หนูกลุ่มควบคุมไม่ได้รับเอทานอล, Glucose คือหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลาย glucose ในปริมาณที่ให้พลังงาน (isocalrolic equivalence) เทียบเท่ากับเอทานอลในหนูกลุ่มตับอักเสบเรื้อรังได้รับ Alc + sylimarin คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลและ sylimarin ขนาด 100 mg/kg/day, AlC + Cur250, Alc + Cur500, Alc + Cur750 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอล และ curcuminoid ในขนาด 250, 500, 750 mg/kg/day ตามลำดับ, ปริมาณผลผลิต MDA ในหน่วย μM โดยการคำนวณ แสดงค่า mean ± S.D จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 4-6 ตัว, # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มตับอักเสบ (one-way ANOVA)



กราฟที่ 5 ผลของ curcuminoids ในขนาดต่างๆ ต่อการทำงานของ superoixde dismutase (SOD) ใน microsomal extracts ของตับหนูขาวใหญ่

Alc + CMC คือกลุ่มหนูได้รับเอทานอลจนเกิดภาวะตับอักเสบและ carboxymethylcellulose (CMC), Control คือ หนูกลุ่มควบคุมไม่ได้รับเอทานอล, Glucose คือหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลายglucose ในปริมาณที่ให้พลังงาน (isocalrolic equivalence) เทียบเท่ากับเอทานอลในหนูกลุ่มตับอักเสบเรื้อรังได้รับ Alc + sylimarin คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลและ sylimarin ขนาด 100 mg/kg/day, AlC + Cur250, Alc + Cur500, Alc + Cur750 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอล และ curcuminoid ในขนาด 250, 500, 750 mg/kg/day ตามลำดับ, การทำงานของ SOD (SOD activity) โดยการคำนวณร้อยละการยับยั้งการเกิดสารมีสีที่ลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ ผลที่ได้แสดงค่า mean ± S.D จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มท่ากับ 4-6 ตัว, # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มตับอักเสบ (one-way ANOVA)

อภิปรายผลการศึกษา

สารสกัดสีเหลือง curcuminoid จากส่วนเหง้าของพืชสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* L.) (Thomas-Eapen, 2009) ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยาในการรักษาบำบัดโรคต่างๆมายาวนาน หลายการศึกษาทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* แสดงให้เห็นว่า curcuminoid มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer), ฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพต่างๆ (anti-microbial effects), ฤทธิ์ช่วยสมานแผล (wound healing effect) และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ได้ดี (Sharma *et al.*, 2005; Maheshwari *et al.*, 2006) จากฤทธิ์ต่างๆเหล่านี้ของ curcuminoid โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการอักเสบ curcuminoid จึงถูกนำมาใช้ในการรักษาบรรเทาภาวะต่างๆ ที่เกิดพยาธิภาพจากขบวนการอักเสบเรื้อรัง อาทิ มะเร็ง, ปลายประสาทอักเสบ (neuro-degenerative disease), ระบบหัวใจและหลอดเลือด (Aggarwal and Harikumar, 2009) ภาวะท้องเสียเรื้อรัง (irritable bowel syndrome), ภาวะอักเสบในระบบทางเดินหายใจ (Gilani *et al.*, 2005) และภูมิคุ้มกัน(Gautam *et al.*, 2007; Aggarwal and Sung, 2009)

โรคตับแข็งจากแอลกอฮอล์ เกิดจากภาวะอักเสบของเซลล์ตับเรื้อรังจนเนื้อเยื่อตับตายและเป็นผังผืดแข็ง กลไกหนึ่งมาจากการสร้างอนุมูลอิสระต่างๆจำนวนมากจากเซลล์ตับอักเสบเนื่องจากพิษของสารเมทาบอไลท์จากแอกอฮอล์ (Lieber, 2005; O'Shea *et al.*, 2010) และส่งผลย้อนกลับทำให้เซลล์ตับดีถูกทำลายและเกิดภาวะอักเสบต่อเนื่อง ในการศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นไปได้ของสารสกัด curcuminoid ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ในการเป็นสารป้องกันภาวะตับอักเสบ (hepatoprotective agents) จากพิษของแอลกอฮอล์ โดยศึกษาในหนูขาวใหญ่ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังคลายในคน หนูขาวจะได้รับเอทานอล (40% v/v) ทางปากติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 60 วัน พบว่าเมื่อนำซีรัมหนูไปตรวจวัดระดับของเอนไซม์ aminotransferases ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ซึ่งถือเป็นตัวบ่งชี้หลักในทางคลินิก (clinical markers) ถ้าระดับเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นมากกว่าสองเท่า (เพิ่มขึ้น 2-6 เท่า) เป็นการบ่งชี้ว่าผู้ป่วยการเกิดภาวะตับอักเสบ (Lieber, 2005) และการวัดระดับเอนไซม์ alkaline phosphatate (ALP) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้หลักและจะมีระดับเพิ่มขึ้นชัดเจนในภาวะท่อน้ำดีอุดตัน (cholestasis) (Wolf, 1999) นอกจากนี้ ALP ยังใช้เป็นตัวบ่งชี้รองสำหรับภาวะตับอักเสบ จากผลการศึกษานี้พบว่าหนูขาวที่ได้รับเอทานอลติดต่อกันมีระดับเอนไซม์ AST และ ALT เพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าและมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเอทานอลและหนูกลุ่มที่ได้รับ glucose ในปริมาณที่ให้พลังงานเทียบเท่ากับเอทานอล (isocaloric equivalence) แสดงให้เห็นว่าการได้รับสารพลังงานสูงจาก glucose ไม่มีผลต่อทำให้เซลล์ตับอักเสบ สำหรับระดับเอนไซม์ ALP ในซีรั่มพบว่าเพิ่มขึ้นบ้าง แม้ว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเป็นการแสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะตับอักเสบในหนูที่ได้รับเอทานอล เมื่อหนูขาวที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรังได้รับ curcuminoid ติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์ พบว่า curcuminoid ที่

ใช้ในการทดสอบขนาด 500 และ 750 mg/kg/day สามารถลดภาวะตับอักเสบได้ดี โดยสามารถลดปริมาณเอนไซม์ AST และ ALT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่มีภาวะตับอักเสบก่อนที่จะได้รับ curcuminoid และให้ผลลดระดับเอนไซม์ AST และ ALT ใกล้เคียงหรือดีว่า sylimarin ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชและเป็นยาที่ปัจจุบันนิยมใช้ในผู้ป่วยตับอักเสบ (Ludovico *et al.*, 2010) curcuminoid ในขนาดสูง 750 mg/kg/day มีแนวโน้มลดระดับของ ALP ได้บ้าง แม้ว่าจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า curcuminoid มีฤทธิ์ในการปกป้องตับ และชะลอภาวะอักเสบในหนูที่เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังจากเอทานอลได้

กลไกหนึ่งที่สำคัญในการเกิดภาวะอักเสบจากพิษของเอทานอล คือ การสร้างสารอนุมูลอิสระ เมื่อร่างกายได้รับเอทานอลส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ใน microsomal system โดย cytochrom P4502E1 และมีการสร้างสารในกลุ่ม oxygen species ออกมาจำนวนมาก ซึ่งมีผลทำลายเซลล์ตับ (Ying *et al.*, 2009) นอกจากนี้ในภาวะที่ได้รับเอทานอลติดต่อกันนานๆยังพบว่าเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระในร่างกาย ได้แก่ superoxide dismutate (SOD), catalase, glutathione dismutase และ glutathione reductase มีปริมาณลดลง ส่งผลให้มีปริมาณอนุมูลอิสระเหลือทำลายเซลล์ดีเพิ่มขึ้น (Albano, 2006)ในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาผลของ curcuminoid ต่อระดับ oxidative stress จาก microsomal extract ในเซลล์ตับหนูขาวพบว่าในหนูที่ได้รับเอทานอลติดต่อกัน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ระดับ oxidative stress ที่วัดในรูปของ MDA ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการ lipid peroxidative เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) และระดับของเอนไซม์ SOD ไม่มีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า curcuminoid ในขนาดสูง 500 และ 750 mg/kg/day สามารถลดปริมาณ MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ในขณะที่ sylimarin ไม่มีผลลดการสร้าง MDA ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า curcuminoid มีฤทธิ์ลดการสรางอนุมูลอิสระได้แรง สำหรับผลของเอทานอลต่อการทำงานเอนไซม์ SOD ซึ่งวัดใน microsomal extracts จากผลการทดสอบในที่นี้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ อาจจเนื่องจากเป็นการวัดการทำงานเอนไซม์เฉพาะใน microsomal extracts ซึ่งแตกต่างจากรายงานอื่นๆ ที่ส่วนใหญ่จะทำการวัดการทำงานของ SOD จากเนื้อเยื่อตับ (homogenized tissues) (Albano, 2006) ตำแหน่งของ SOD มีผลต่อการทำงานและอาจมีผลต่อความไวในการถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล

ในหลายรายงานก่อนหน้านี้ ได้เคยแสดงให้เห็นว่า curcuminoid ช่วยการอักเสบและความรุนแรงของโรคที่เกิดจากความเป็นพิษของเอทานอลได้ อาทิ พบว่า curcuminoid สามารถลดความรุนแรงของภาวะตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis) ในหนูขาวที่ได้รับเอทานอลร่วมกับ cholecystokinin เนื่องจาก curcuminoid มีผลลดการทำงานของ nuclear factor keppa-B ซึ่งควบคุมการสร้างและการแสดงออกของสารก่อการอักเสบหลายชนิด (Gukovsky *et al.*, 2003) ในเซลล์ประสาท hippocampus ที่

ถูกกระตุ้นให้เกิดเซลล์ประสาทอักเสบจากเอทานอล curcuminoid สามารถลดภาวะอักเสบได้ดีและกระตุ้นการทำงานของ mitogenic activated protein kinase phosphate-1 (Pae *et al.*, 2009) การศึกษานี้แสดงให้ผลเบื้องต้นของ curcuminoid ในการมีฤทธิ์ป้องกันการตับโดยการลดการอักเสบจากพิษของเอทานอลในหนูขาว ซึ่งสอดคล้องการศึกษาฤทธิ์ของ curcuminoid ในการชะลอภาวะอักเสบเรื้อรังจากพิษของเอทานอลในโมเดลการศึกษาอื่นๆ

สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ยืนยันถึง ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดสีเหลือง curcuminoid จากขมิ้นชัน สารนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี โดยในที่นี้ curcuminoid สามารถลดภาวะตับอักเสบจากความเป็นพิษของเอทานอลในหนูขาวที่ได้รับเอทานอลติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ซึ่งคล้ายกับพยาธิสภาพของโรคตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) และโรคตับแข็ง กลไกการออกฤทธิ์ของ curcuminoid ส่วนหนึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) curcuminiod มีความสามารถในการลดการสร้าง oxidative stress ได้ดีในส่วนไมโครโซมของเซลล์ตับ ในอนาคต curcuminoid หรือสารสกัดจากขมิ้นชันมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารชะลอหรือป้องกันโรคตับ (hepatoprotective agents) จากพิษแอลกอฮอล์ได้ เพื่อให้เกิดการพัฒนาศักยาภาพของสมุนไพรท้องถิ่นและลดการใช้ยาราคาแพงจากการนำเข้าจากต่างประเทศ อย่างไรก็ตามควรต้องมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ และความเป็นพิษ รวมทั้งเภสัชจลนพลศาสตร์ที่ชัดเจนของ curcuminoid ในภาวะตับอักเสบต่อไป

เอกสารอ้างอิงโครงการวิจัย

Aggarwal, B.B., and Harikumar, K.B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol 41, 40-59.

Aggarwal, B.B., and Sung, B. (2009). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. Trends in Pharmacological Sciences 30, 85-94.

Albano, E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proceedings of the Nutrition Society 65, 278-290.

Crocenzi FA, R.M. (2006). Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: new possabilities for an ancient medication. Curr Med Chem 13(9), 1055-1074.

Gautam, S., Gao, X., and Dulchavsky, S. (2007). IMMUNOMODULATION BY CURCUMIN. In: The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, 321-341.

Gilani, A.H., Shah, A.J., Ghayur, M.N., and Majeed, K. (2005). Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and respiratory disorders. Life Sciences 76, 3089-3105.

Goel, A., Kunnumakkara, A.B., and Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. Biochemical Pharmacology 75, 787-809.

Gramenzi, A., Caputo, F., Biselli, M., Kuria, F., Loggi, E., Andreone, P., and Bernardi, M. (2006). Review article: alcoholic liver disease; pathophysiological aspects and risk factors. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 24, 1151-1161.

Gukovsky, I., Reyes, C.N., Vaquero, E.C., Gukovskaya, A.S., and Pandol, S.J. (2003). Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284, G85-95.

Heidelbaugh J, B.M. (2006). Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. AFP 74, 756-762.

Hou, J.K., Velayos, F., Terrault, N., and Mahadevan, U. (2010). Viral hepatitis and inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases 16, 925-932.

Lieber, C.S. (2005). Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. Rocz Akad Med Bialymst. 50, 7-20.

Ludovico, A., Raffaele, C., Natasa, M., and Francesco, C. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytotherapy Research 9999, n/a.

Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., and Srimal, R.C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: A short review. Life Sciences 78, 2081-2087.

O'Shea, R.S., Dasarathy, S., McCullough, A.J., Diseases, P.G.C.o.t.A.A.f.t.S.o.L., and Gastroenterology, t.P.P.C.o.t.A.C.o. (2010). Alcoholic liver disease. Hepatology 51, 307-328.

Pae, H.-O., Jeong, S.-O., Zheng, M., Ha, H.-Y., Lee, K.-M., Kim, E.-C., Kim, D.-H., Hwang, S.-Y., and Chung, H.-T. (2009). Curcumin attenuates ethanol-induced toxicity in HT22 hippocampal cells by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. Neuroscience Letters 453, 186-189.

Rivera-Espinoza, Y., and Muriel, P. (2009). Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. Liver International 29, 1457-1466.

Sharma, R.A., Gescher, A.J., and Steward, W.P. (2005). Curcumin: The story so far. European Journal of Cancer 41, 1955-1968.

Thapa, B., and Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. Indian Journal of Pediatrics 74, 663-671.

ผลสำเร็จที่ได้จากโครงการ

ผลสำเร็จเบื้องต้น จากการวิจัยนี้ได้ทราบและยืนยันประสิทธิภาพการป้องกันตับ (hepato-protective effect) ของสารสกัดขมิ้นชัน (curcuminoid) ในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังจากพิษของแอลกอฮอล์

ผลสำเร็จกึ่งกลาง การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถลดภาวะ oxidative stress ในตับหนูรวมทั้งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ถือว่าเป็นแนวทางที่จะนำไปต่อ ยอดสู่การพัฒนาการนำสารสกัดขมิ้นชันไปใช้เป็นยาในโรคตับต่อไป

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

การนำเสนอผลการวิจัย ในรูปแบบโปสเตอร์และมีการตีพิมพ์บทความบน Proceeding ในการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 32 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย (ระดับชาติ) ระหว่างวันที่ 22-24 มีนาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ วิทยาเขตรังสิต ปมุทธานี

สำนักหอสมุด
- 5 JUL 2011

Original article **P35**

Effects of curcuminoid on ethanol-induced toxicity in hepatic cells and rats

Ruttiya Thongrung[1*], Sakonwun Praputbut[1]

[1]Department of pharmaceutical sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
* Presenting author

Abstract

Alcoholic liver disease (ALD) is caused by excessive consumption of alcohol. The pathological progress of ALD involves in increasing reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production, cytokines secretions, and inflammatory reactions. Curcuminoid, a mixture of active substance derived from turmeric compound, has exhibited an antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aimed to examine effect of curcuminoid on NO production in ethanol-stimulated hepatic cells and on hepatoprotective effect in ethanol-induced toxicity rats. We found that curcuminoid at lower concentration (0.313 and 0.625 μg/ml) tended to reduce NO production in the ethanol-stimulated cells. In addition, curcuminoid at concentration 500 and 750 μg/ml decreased the liver function enzymes significantly in the ethanol-induced toxicity rats. The results suggested that curcuminoid had a potential property to be use as a hepatoprotective agent in ethanol-induced hepatic toxicity.

Keywords: alcoholic liver disease, ethanol, nitric oxide, hepatoprotective agent, curcuminoid

Introduction

The excessive consumption of alcohol has been identified as the leading cause of ALD. The pathological changes of ALD range from fatty liver (steatosis), hepatic inflammation and cell injury (hepatitis), cell fibrosis (cirrhosis) and finally, hepatocellular carcinoma. (1) On the early stages, alcohol increases fatty molecule in the hepatic cells, lipid peroxidation and ROS that resulting in initiation of inflammatory process. (2) On the other hand, the direct alcohol toxicity is contributed from its metabolism pathway to ROS production. (3) Several studies have shown that NO, an interesting ROS generated from hepatic cells involve in both physiological and pathological roles in the liver. (4, 5) NO, an endogenous gas with short half-life (< 10 seconds) is synthesized from L-arginine by enzyme nitric oxide synthase (NOS). (6) Under normal condition, the hepatic cells produce low level NO to regulate vascular perfusion, however, in ALD, the large amounts of NO are produced. (7) The mechanisms of alcohol induced hepatic toxicity are complex with diverse consequences in different cell types and tissues. In addition, there is no pharmacological agent for ALD treatment. Now a day, one idea of developing hepatoprotective agent from herbal plants to reduce production of ROS is remarkably under investigation. Curcuminoid, a yellow pigment in turmeric compound is derived from *Curcuma Longa Linn* in ginger family. (8) Curcuminoid has been shown variety of pharmacological actions such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant and anticarcinogenic properties. (9, 10) Curcuminoid interacts with numerous target molecules; enzymes, transcription factors, growth factors, receptors or metals, that supports the notion of its influence of many biological cascades. (10) We are interested in the effect of curcuminoid as a hepatorprotective agent against alcohol-induced toxicity. The aim of this study was to investigate effects of curcuminoid on NO production in ethanol-stimulated cells and on aminotransferase enzymes in rats.

Methods

Cell culture: The human liver cell line, Hep G2 cells were obtained from American Type Culture Collection and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin to 90% confluence.

Effect of curcuminoid on nitric oxide production: All cells were plated into 96-black well plates at density $3x10^4$ cell/well for 24 hours. Then, the medium was removed and cells were pre-treated with various concentrations of curcuminoid in serum free medium for 2 hours. After that cells were added with10% (V/V) of ethanol for 22 hours. The diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA) was added to the wells and incubated for 30 minutes in dark. Fluorescence was read at excitation 485 nm, emission 535 nm. The cells were lysed and measured protein content by BCAkits®. (Bio-rad, Philadelphia)

Animals: Sprague-Dawley rats (weight 180-220 g) were obtained from National laboratory animal center, Mahidol University, Nakornpathom. All rats were rested 7 days before experiments. The rats were fed with regular diet and water ad libitum.

Effect of curcuminoid on ethano- induced toxicity rats: Rats were divided into 6 groups of six rats in each group. Group I was the control animal. Group II was the rats received vehicle. Group III was the rat received isocaloric 60% glucose. Group IV, V, and VI, VII, the rats were received ethanol (6 g/kg /day p.o.) for 14 weeks and on week 8^{th} the rats were received sylimarin ((Legalon®) 100 mg/kg/day or curcuminoid 250,500 and 750 mg/kgday respectively. Serums from the animals were analyzed for alnine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) by LFEkits® (S.E. supply, Bangkok)

Results

Effect of curcuminoid on NO production in ethanol stimulated Hep G2 cells

Hep G2 cells, stimulated with various concentrations of ethanol for 24 hours, increased NO production as a dose-dependent manger. The ethanol concentration at 7.5% and 10% v/v could induce the cells to generate amounts of NO significantly, comparing with the control cells (figure 1A.) When 10% ethanol-stimulated Hep G2 cells were pre-incubated with curcuminoid, we found that curcuminoid at lower concentration (0.313 and 0.625 µg/ml) trends to decrease NO productions. However, curcuminoid at higher concentration could enhance NO productions in the stimulated cells. (figure 1B.)

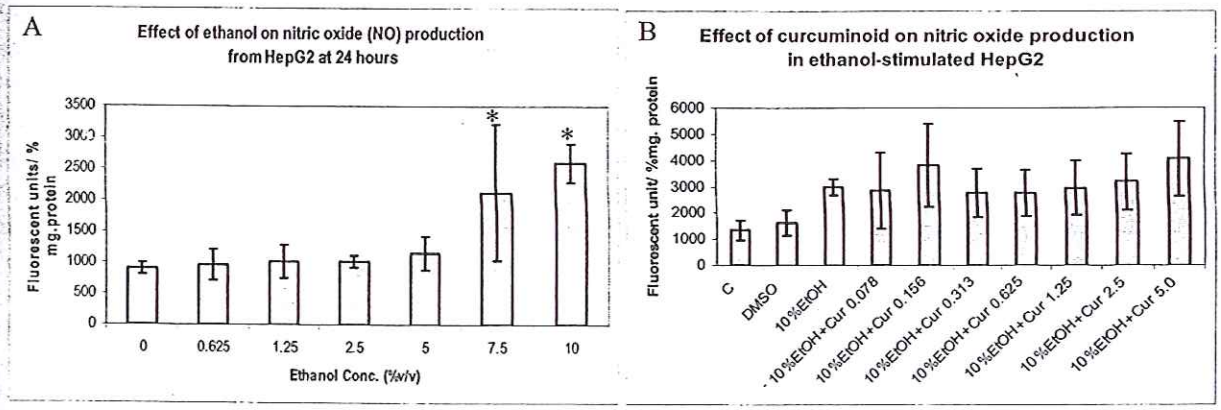


Figure 1. Nitric oxide (NO) production in ethanol stimulated Hep G2 cells. Cells were stimulated with ethanol with various concentration (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, and 10 % v/v) of ethanol for 24 hours (A.) The ethanol stimulated cells were pre-incubated with curcumiond (B.) NO productions were measured by DAF-2DA reagent. Data were from 3 separated experiments (n=3) and shown as mean ± SD of fluorescent unit/%mg. protein. Data were analyzed statistic significantly by ANOVA, comparing to the control ($p \leq 0.05$).

Effect of curcuminoid on aminotransferases in ethanol-induced toxicity rats

Serum ALT and AST levels were increased significantly from all groups received ethanol, comparing to the control group ($p \leq 0.05$). (figure 2A, 2B.) After that the ethanol-induced toxicity rats were received a vehicle, sylimarin (hepatoprotective agent) or various doses of curcuminoid for another 6 weeks. The results showed that curcuminoid concentration at 750 and 1000 μg/ml decrease the serum ALT and AST levels significantly ($p \leq 0.05$) and this effect of curcuminoid seemed to be similar to sylimarin. (figure 2A, 2B.) The serum level of ALT and AST showed fewer changes in the rats received only the vehicle.

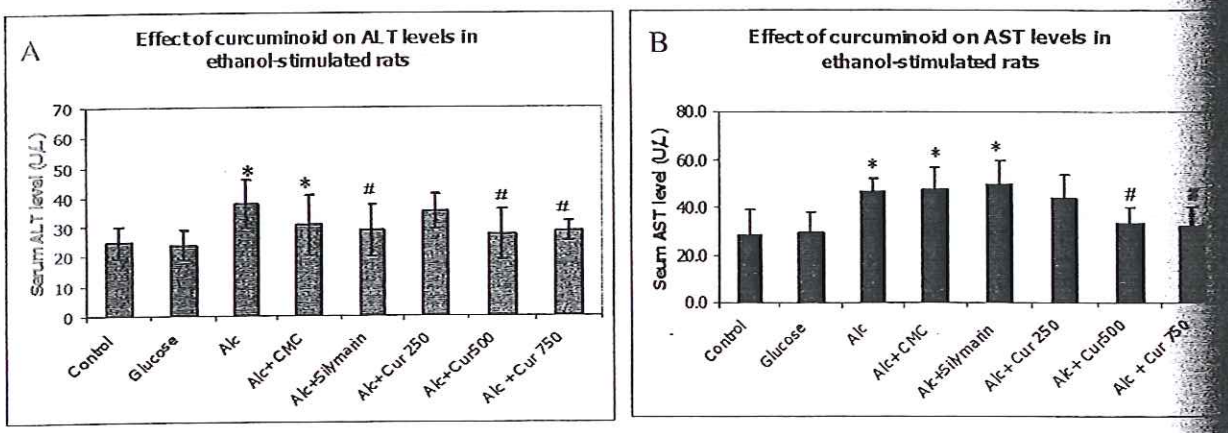


Figure 2. Effects of curcuminoid on serum ALT and AST in ethanol-induced hepatic toxicity rats. Rats were received ethanol (6 g/kg/day) for 8 weeks and then were given carboxymethylcellulose (CMC), sylimarin or curcuminoid (250, 500, 750 μg/ml) for another 6 weeks. Serum ALT and AST levels were measured with the liver function enzyme kits. Data were from 6 animals (n=6) and shown as mean ± SD. Data were analyzed statistic significantly by ANOVA ($p \leq 0.05$), comparing to the control group(*) or comparing to the ethanol induced hepatic toxicity baseline (#).

Discussions

It has been demonstrated that enzyme NOS are upregulated in cirrhosis livers and they involve in pathological process. (11, 12) NO modulates different inflammatory cells and prolong cytokines secretions such as TNF-α, resulting in hepatitis. (5) In this present study the ethanol-stimulated hepatic cells enhance NO production. When we tested the effects of curcuminoid on ethanol-stimulated cells, the results showed that curcuminoid at lower concentration trends to reduce NO production. However, curcuminoid at high concentration seemed to accelerate NO production in the cells. We also studied the effect of curcuminoid in long term ethanol-induced rats. Curcuminoid could significantly reduce the enzyme ALT and AST which are the markers for chronic hepatitis. Many studies before have been demonstrated that curcuminoid contains anti-inflammatory and antioxidant effects. (10) For example, curcuminoid has protective effect on iron-induce hepatotoxicity (13) and ethanol induced pancreatitis. (14) Our studies confimed that curcuminoid decrease ethanol-induce hepatic toxicity in rats as well as reduce NO production in ethanol-stimulated hepatic cells

Conclusion

In this study, we showed that curcuminoid in lower concentration reduce NO production in the ethanol-stimulated hepatic cells. In chronic ethanol-induced rats, curcuminoid also decreased the liver function enzymes, ALT and AST significantly. These results suggest that curcuminoid might delay the inflammatory progression in chronic hepatitis and be use as hepatoprotective agents. However, further investigation in mechanism of actions and toxicity of curcuminoid on ethanol-stimulated in vitro and in vivo are need to be done.

Acknowledgements

This project was partly supported by National Research Council of Thailand (NRCT), The Thailand Research Fund (TRF, strategic basic research) and Postgraduate Education and Research Program in Chemistry, Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC)

References

1. Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, Kuria F, Loggi E, Andreone P, et al. Review article: alcoholic liver disease; pathophysiological aspects and risk factors. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 2006; 24(8): 1151-61.
2. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, Diseases PGCotAAftSoL, Gastroenterology tPPCotACo. Alcoholic liver disease. Hepatology2010; 51(1):307-28.
3. Lieber CS. The Discovery of the Microsomal Ethanol Oxidizing System and Its Physiologic and Pathologic Role. Drug Metabolism Reviews2004; 36(3-4):511-29.
4. Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. Free Radical Biology and Medicine2008; 45(11):1542-50.
5. Deng X-s, Deitrich RA. Ethanol metabolism and effects: Nitric oxide and its interaction. Curr Clin Pharmacol2007; 2(2):145-53.
6. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? Nat Rev Drug Discov2002; 1(12):939-50.
7. Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. Trends in Pharmacological Sciences2000;21(7):249-52.
8. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. Biochemical Pharmacology2008; 75(4):787-809.
9. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. Trends in Pharmacological Sciences2009; 30(2):85-94.
10. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. European Journal of Cancer2005; 41(13):1955-68.
11. Demoncheaux EAG, Elphick DA, Dɜrner MB, Higgins GE, Crowther D, Williams EJ, et al. Conservation of whole body nitric oxide metabolism in human alcoholic liver disease: Implications for nitric oxide production. Scandinavian Journal of Gastroenterology2006; 41(7):820-5.
12. Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. World J Gastroenterol2006;12(4):588-94.
13. Manjunatha H, Srinivasan K. Protective effect of dietary curcumin and capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein, iron-induced hepatotoxicity and carrageenan-induced inflammation in experimental rats. FEBS Journal 2006; 273 (19): 4528-37.
14. Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol2003 January 1, 2003; 284(1):G85-95.