

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาผู้สูงอายุ
ที่มีภาวะกระดูกพรุนและภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย

Study the effects of herbal medicines for the treatment of
osteoporosis/ sarcopenia patients

นักวิจัย

ผศ.ดร. ยุทธนา เฟื่องแจ่ม

หน่วยงาน : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจาก ทุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund : FF)
ปี 2564 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 รหัสโครงการ MET6405004S

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการจัดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID:398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1. โครงการวิจัยเดี่ยว

- (ภาษาไทย) การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาผู้สูงอายุที่มีภาวะกระดูกพรุน และภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย
- (ภาษาอังกฤษ) Study the effects of herbal medicines for the treatment of osteoporosis/ sarcopenia patients

2. คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล นายยุทธนา เพ็งแจ่ม (สัดส่วนในการทำวิจัย 80%)
 ตำแหน่งทางวิชาการ /ราชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 หน่วยงาน คณะเทคนิคการแพทย์
 ที่อยู่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90110
 โทร. 074289105 โทรสาร 074289101
 E-mail: yutthana.p@psu.ac.th
 โทรศัพท์ 0909671352

ผู้ร่วมวิจัยภายในประเทศ

ชื่อ-สกุล นายภาคภูมิ พาณิชยุบการนันท์ (สัดส่วนในการทำวิจัย 20%)
 ตำแหน่งทางวิชาการ /ราชการ รองศาสตราจารย์
 หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
 ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
 โทรศัพท์/โทรสาร 074-288980 โทรสาร 074-288891
 E-mail: pharkphoom.p@psu.ac.th
 โทรศัพท์ 0866924572

ผู้ร่วมวิจัยภายนอกประเทศ

- ชื่อ-สกุล Assist Prof Dr. Kazuya Hasegawa
 ที่อยู่ Faculty of Nutrition Science, Department of Nutrition Science, Morioka University, Iwate, Japan, E-mail: kazuya-h@morioka-u.ac.jp
- ชื่อ-สกุล Assist Prof Dr. Yuya Yamaguchi
 ที่อยู่ Faculty of Medicine, Department of Physiology, Toho University, Tokyo, Japan E-mail: yuuya_yamaguchi@med.toho-u.ac.jp

3. กิตติกรรมประกาศ

นักวิจัยหลัก ผศ.ดร. ยุทธนา เฟื่องแจ่ม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ภาคภูมิ พาณิชยุการนันท์ ผู้ร่วมวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ ที่คิดค้นสารสกัดเคอคูมินอยด์ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณคณบดีคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้สถานที่ห้องปฏิบัติการเภสัชเวชของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในการคิดค้นกรรมวิธีการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันที่มีสารเคอคูมินอยด์ปริมาณสูงมากกว่าเดิมถึง 85% โดยน้ำหนัก และเพิ่มการละลายน้ำมากกว่าเดิมถึง 70 เท่า และสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ทั้งในรูปแบบ pure compound และ crude extracts ทั้งจากคณะเภสัชศาสตร์ และคณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย และภาวะกระดูกพรุนในครั้งนี้ ขอขอบคุณคณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ที่ให้สถานที่ห้องวิจัยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการทดลอง จนทำให้งานประสบความสำเร็จด้วยดี และสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติได้ 3 ฉบับ โดยอยู่ในฐาน Scopus 1 ฉบับ และอยู่ในฐาน Wed of Science 2 ฉบับ (Q1 และ Q2) ขอขอบคุณอาจารย์ผู้ร่วมวิจัยทุกท่านทั้งในประเทศ และต่างประเทศที่ช่วยกันทำงานวิจัยจนสำเร็จ งานวิจัยพื้นฐานนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิก สำหรับเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทย และการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุน และเพิ่มการสร้างมวลกระดูกในผู้สูงอายุต่อไป

การทำวิจัยในครั้งนี้เป็นการร่วมมือกันระหว่างนักวิจัยของคณะเทคนิคการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่น ทำให้เกิด collaboration ของนักวิจัยในวงกว้าง เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่าง ๆ ต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย และภาวะกระดูกพรุน งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิก สำหรับเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทย และการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุน และเพิ่มการสร้างมวลกระดูกในผู้สูงอายุต่อไป

เอกสารฉบับนี้หมดเมื่อวันที่ 19/01/2022
 โดย ชันดล ศรีเพชร ID53398G38
 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

4. บทคัดย่อภาษาไทย และภาษาอังกฤษ

รายงานวิจัยในครั้งนี้ประกอบด้วยงานวิจัย 3 เรื่อง โดยแต่ละเรื่องใช้งบประมาณที่ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนในครั้งนี้อย่างเต็มที่ตามที่เสนอรายงานตาม “ร่างรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์” ซึ่งทั้ง 3 เรื่องผู้วิจัยขอแยกบทคัดย่อทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษออกเป็น 3 เรื่อง ตามลำดับคือ

บทคัดย่อภาษาไทยงานวิจัยเรื่องที่ 1

ข้อมูลพื้นฐาน : ภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย (Sarcopenia) เกิดจากความไม่สมดุลของการสร้าง และการทำลายโปรตีนของกล้ามเนื้อ ภาวะผิดปกติเกิดจากมีการทำลายมากกว่าการสร้าง ผลทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย การรักษาโรคนี้ในภาวะปัจจุบันมีการใช้ยา และไม่ใช้ยา ในกรณีที่ใช้ยามักเกิดผลข้างเคียง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจนำสารสกัดจากขมิ้นชันมาทดลองเพื่อกระตุ้นการสร้างมวลกระดูก

วัตถุประสงค์ : การทดลองนี้ได้ใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน ซึ่งเรียกว่าสารเคอคูมินอยด์ที่ประกอบด้วย Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter เพื่อช่วยกระตุ้นการสร้างโปรตีนจากเซลล์กล้ามเนื้อ โดยใช้ cells ที่ induce ให้คล้ายกับกล้ามเนื้อของผู้ที่เป็น sarcopenia ด้วย dexamethasone

วิธีการศึกษา : การทดลองนี้ได้ใช้เซลล์กล้ามเนื้อคือ C2C12 จากนั้นทำให้เซลล์มีลักษณะอ่อนแรงด้วย dexamethasone ต่อมาได้ศึกษา inhibition effects ของสารสกัดเคอคูมินอยด์ที่ประกอบด้วย Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter ด้วยวิธี MTT, LDH, RT-qPCR และ western blot

ผลการศึกษา : ผลการศึกษาพบว่า Cu, CRE, CRE-Bin, and CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Atrogin-1 และ MuRF-1 ซึ่งทั้ง Atrogin-1 และ MuRF-1 ส่งผลต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย ขณะที่ CRE-SD สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MuRF-1 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่า Cu, CRE, CRE-Bin, CRE-Ter, and CRE-SD สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีน Akt ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างโปรตีนใน TOR signaling pathway

สรุปผล : การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารเคอคูมินอยด์ที่ประกอบด้วย Cu, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter สามารถยับยั้งการเกิด muscle atrophy หรือ sarcopenia โดยสามารถยับยั้งยีนที่ทำให้ muscle atrophy คือทั้ง Atrogin-1 และ MuRF-1 นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนผ่าน TOR signaling pathway

Abstract (1)

Background: Sarcopenia is a disease of progressive loss of muscle mass due to the imbalance of protein synthesis and proteolysis, and tends to emerge with ageing. Currently its treatment consists of non-drug therapies and drug therapies, but some medications can have various side effects. Therefore, it is important to search for effective herbal medicines that can modulate muscle mass.

Purpose: In this study, we investigated the inhibition effects of curcuminoids including, Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells.

Methods: C2C12 cells were cultured and treated with various concentrations of curcuminoids including, Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter. The inhibitory effects were studied using various methods, including MTT and LDH assays for cell viability and cell cytotoxicity, RT-qPCR for gene expression analysis, and Western blots for protein analysis. In this study, dexamethasone-treated C2C12 myotubes (Dex) are the positive drug control and used as *in vitro* models of muscle atrophy.

Results: The results revealed that treating differentiated C2C12 cells with Cu, CRE, CRE-Bin, and CRE-Ter reduced Atrogin-1 and MuRF-1 expression, whereas CRE-SD reduced only MuRF-1 expression. The Western blot analysis results show that Cu, CRE, CRE-Bin, CRE-Ter, and CRE-SD upregulated the phosphorylation level of Akt, which is an important protein in the mTOR signaling pathway.

Conclusion: Our results show that Cu, CRE, CRE-Bin, CRE-SD, and CRE-Ter tend to inhibit muscle atrophy by decreasing expression of Atrogin-1 and MuRF-1 inhibiting protein degradation, and to upregulate Phospho-Akt to stimulate protein synthesis. These results provide corroborating evidence of therapeutic potential to treat sarcopenia patients.

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อภาษาไทยงานวิจัยเรื่องที่ 2

ข้อมูลพื้นฐาน : ในกระบวนการสร้าง osteoclasts มีการแสดงออกของ miR21 ร่วมด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกของ NFKB-miR-21 pathway เป็นกลไกใหม่ที่สามารถนำไปรักษาโรค diabetic ulcers ได้ และเมื่อไม่นานมานี้คณะผู้วิจัยพบว่าสารเคอร์คูมินอยด์ชนิด CRE-Ter สามารถยับยั้งกระบวนการสร้าง osteoclasts ผ่าน NFKB pathway ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง CRE-Ter, miR21 และกระบวนการสร้าง osteoclasts ยังไม่มีการศึกษามาก่อน

วัตถุประสงค์ : ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ miR21, NFKB pathway และกระบวนการสร้าง osteoclasts โดยหวังว่าจะเป็นกลไกใหม่ที่สามารถนำไปใช้รักษาโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา : การทดลองนี้ใช้เซลล์ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย RANKL จนทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็น osteoclasts โดยวัดจากการแสดงออกของ TRAP และ Cathepsin K จากนั้น treat เซลล์ด้วย CRE-Ter และศึกษาการแสดงออกของ ROS การแสดงออกของ miR21 ผ่าน signaling pathways ต่างๆ โดยวิธี Real time PCR, Western blotting, EMSA และ CHIP assays

ผลการศึกษา : ผลการศึกษาพบว่า หลังจาก treat cells ด้วย CRE-Ter ทำให้การแสดงออก ROS ลดลง การแสดงออกของ osteoclast markers ชนิด TRAP และ Cathepsin K ลดลง นอกจากนี้ CRE-Ter ยังทำให้การแสดงออกของ miR21 ลดลง จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการแสดงออกของ miR21, signaling pathways และ DNA-protein binding ผลพบว่า CRE-Ter ทำให้ miR21 มีการแสดงออกลดลง ผ่านการแสดงออกของโปรตีนใน NFKB และ Akt pathways และต่อเนื่องด้วย DNA – protein binding โดยใช้วิธี EMSA และ ChiP ลดลงด้วย

สรุปผล : การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าสารเคอร์คูมินอยด์ชนิด CRE-Ter สามารถยับยั้งการสร้าง osteoclasts ผ่านกลไก NFKB-Akt-miR-21 pathway ซึ่งเป็นกลไกใหม่ที่ยังไม่เคยรายงานมาก่อน ซึ่งกลไกนี้อาจนำไปใช้เพื่อรักษาโรคกระดูกพรุนต่อไป

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID53398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Abstract (2)

Background: miR-21 expression stimulates osteoclast cells in the context of osteoclastogenesis. A previous report showed that NF κ B-miR-21 pathway could serve as an innovative alternative to devise therapeutics for healing diabetic ulcers. Furthermore, our study demonstrated that a highly water-soluble curcuminoids-rich extract (CRE-Ter) inhibits osteoclastogenesis through NF κ B pathway.

Purpose: The interplay between miR-21 and CRE-Ter in osteoclastogenesis has not yet been investigated.

Methods: In this study, we examined the relation of CRE-Ter and miR-21 gene expression in receptor of the nuclear factor κ B (NF κ B) ligand (RANKL) - induced murine monocyte/macrophage RAW 264.7 cells, osteoclast cells, in osteoclastogenesis. Effect of CRE-Ter on generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was estimated by dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA).

Results: The results reveal that CRE-Ter reduced expression levels of miR-21 gene in osteoclasts. The inhibitory effects of CRE-Ter on in vitro osteoclastogenesis were evaluated by reduction in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) content, and by reduction in expression levels of an osteoclast-specific gene, cathepsin K. Treatment of the osteoclast cells with CRE-Ter suppressed RANKL-induced NF κ B activation including phospho-NF κ B-p65, and phospho I κ B α proteins. Western blot analysis revealed that NF κ B inhibitor up-regulated CRE-Ter-promoted expression of phospho-NF κ B-p65. In addition, CRE-Ter dose-dependently inhibited phospho-Akt expression. CRE-Ter also dose-dependently reduced DNA binding activity of NF κ B and Akt as revealed by EMSA. CHIP assay revealed binding of NF κ B-p65 to miR-21 promoters.

Conclusion: In conclusion, our results demonstrate that CRE-Ter downregulates miR-21 gene expression in osteoclasts via a de novo mechanism, NF κ B- Akt-miR-21 pathway.

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อภาษาไทยงานวิจัยเรื่องที่ 3

ข้อมูลพื้นฐาน : สารเคอร์คูมินอยด์ CRE-Ter มีส่วนประกอบของ curcumin ซึ่งมีรายงานมาก่อนว่าสามารถยับยั้งมะเร็ง, antioxidant และ anti-inflammation อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก curcumin ละลายน้ำยาก และดูดซึมเร็ว ดังนั้นจึงไม่เหมาะเพื่อนำไปใช้เป็นยารักษาโรค

วัตถุประสงค์ : เพื่อให้การดูดซึมของ CRE-Ter เข้าสู่ร่างกายของคนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยเลียนแบบ โดยได้นำ CRE-Ter เข้าใน liposome และศึกษากลไกการยับยั้งการสร้าง osteoclasts ผ่านตัวกลางคือ scaffold ชนิด PLA foams โดยหวังว่าจะเป็นวิธีใหม่ที่สามารถนำไปใช้รักษาโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา : การทดลองนี้ใช้เซลล์ RAW 264.7 (monocytes) ที่กระตุ้นด้วย RANKL จนทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็น osteoclasts โดยวัดจากการแสดงออกของ monocyte markers (F4/80), TRAP และ Cathepsin K จากนั้น treat เซลล์ด้วย Liposomal CRE-Ter ที่ผ่านตัวกลาง scaffold ชนิด PLA foam และศึกษาการยับยั้งการสร้าง osteoclasts ผ่าน signaling pathways ต่างๆ โดยวิธี Western blotting

ผลการศึกษา : ผลการศึกษาพบว่า หลังจาก treat cells ด้วย Liposomal CRE-Ter ทำให้การแสดงออก F4/80 เพิ่มขึ้น การแสดงออกของ osteoclast markers ชนิด TRAP และ Cathepsin K ลดลง นอกจากนี้ CRE-Ter ยังทำให้การแสดงออกของโปรตีนใน signaling pathways ชนิด NF κ B และ ERK pathways ลดลงด้วย

สรุปผล : การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า Liposomal CRE-Ter สามารถยับยั้งการสร้าง osteoclasts ผ่านกลไก NF κ B- ERK pathway ซึ่งกลไกนี้อาจนำไปใช้เพื่อรักษาโรคกระดูกพรุนต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Abstract (3)

Background: Curcuminoid (CRE-Ter) is the active component of turmeric, and is widely understood to offer anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory properties. The drawbacks, however, include rapid metabolism and systemic elimination as well as minimal bioavailability.

Purpose: . In an attempt to address the issue of bioavailability, this study seeks to encapsulate CRE-Ter in a liposome before its incorporation on PLA foams in order to inhibit the process of osteoclastogenesis which takes place in RANKL-induced RAW 264.7 cells

Methods: Having encapsulated the CRE-Ter into the liposomes, the influence of the release of liposomal CRE-Ter from PLA foams in order to inhibit the process of osteoclastogenesis in the case of RANKL-induced RAW 264.7 cells was investigated. By measuring the decline in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) content it was possible to evaluate the influence of CRE-Ter/Liposome upon osteoclastogenesis in vitro. Immunocytochemistry was employed to assess the marker for the monocyte/macrophage cells F4/80 content, while Western blots were used to evaluate the underlying mechanisms involved.

Results: The findings demonstrate a novel method which employs tissue engineering scaffolds, which are produced to work alongside advanced additive manufacturing techniques with their basis in concepts from the field of alternative medicine. Initially, it was confirmed that CRE-Ter/Liposome at 20 µg/ml is able to inhibit the creation of multinucleated osteoclasts which are induced by the receptor activator of the nuclear factor-κB ligand (RANKL) in RAW 264.7 cells. It was shown that the CRE-Ter/liposome was able to increase the F4/80 content (F4/80 immunohistochemistry) in the RANKL treated RAW 264.7 cells. The TRAP content was lowered by the CRE-Ter/liposome along with the osteoclast-specific gene content such as cathepsin K, via the use of liposome-encapsulated PLA foams. When treated with CRE-Ter/liposome, RANKL-induced NF-κB and ERK components such as NF-κB-p65, ERK, phospho-NF-κB-p65, and phospho-ERK pathways were all suppressed.

Conclusion: The successful encapsulation of CRE-Ter into the liposomes offered a new opportunity to provide a new inhibitor of osteoclastogenesis and offers the possibility of developing treatments capable of addressing diseases which concern abnormal bone lysis.

5. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

5.1. บทนำ

ปัจจุบันประชากรไทยในยุค 4.0 กำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ปัญหาเรื่องสุขภาพเป็นปัญหาสำคัญอันดับต้นๆ ของสังคมผู้สูงอายุ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของร่างกายไปตามอายุ เช่นภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยหรือ sarcopenia โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) และโรคกระดูกบาง (osteopenia) ภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยหรือ sarcopenia ถือเป็นกลุ่มอาการที่พบได้บ่อยถึง 1 ใน 3 ของผู้สูงอายุทั่วไป และจากการศึกษาข้อมูลยังพบอีกว่าผู้ที่มีอายุมากกว่า 50 ปี ตรวจพบภาวะกระดูกพรุน 1 ใน 3 ของผู้สูงอายุเพศหญิง และ 1 ใน 5 ของผู้สูงอายุเพศชาย การรักษาทั้งสองภาวะในปัจจุบัน คือการใช้ยาแผนปัจจุบันซึ่งมักมีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ยา ดังนั้นการใช้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีผลข้างเคียงน้อยและสามารถเพิ่มมวลกระดูกในโรค sarcopenia และด้านการเกิด osteoporosis จะเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาผู้สูงอายุต่อไปในอนาคต

ไขมันชั้น เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่รัฐบาลส่งเสริมให้วิจัยและพัฒนาให้เป็น product champion ของประเทศไทย ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากไขมันชั้นมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหลายชนิด ทั้งในรูปแบบยาแผนโบราณ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง สารสกัดไขมันชั้นมีสารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidation) ด้านการอักเสบ (anti-inflammation) ด้านมะเร็ง (anticancer) ด้านการแพ้ (anti-allergy) และด้านแบคทีเรีย (anti-bacteria) เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมาต้องใช้สารสกัด curcumin ปริมาณสูง ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสารสกัด curcumin ละลายน้ำได้น้อย และถูกกำจัดออกจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้น้อยมาก คณะผู้วิจัยได้คิดค้นกรรมวิธีการเตรียมสารสกัดไขมันชั้นที่มีสารเคอร์คูมินอยด์ปริมาณสูงมากกว่าเดิมถึง 85% โดยน้ำหนัก และเพิ่มการละลายน้ำมากกว่าเดิมถึง 70 เท่า นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ทั้งในรูปแบบ pure compound และ crude extracts ทั้งจากคณะเภสัชศาสตร์ และคณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย และภาวะกระดูกพรุน งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิก สำหรับเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทย และการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุน และเพิ่มการสร้างมวลกระดูกในผู้สูงอายุต่อไป

การทำวิจัยในครั้งนี้เป็นการร่วมมือกันระหว่างนักวิจัยของคณะเทคนิคการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่น ทำให้เกิด collaboration ของนักวิจัยในวงกว้าง เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่าง ๆ ต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย และภาวะกระดูกพรุน งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิก สำหรับเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทย และการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุน และเพิ่มการสร้างมวลกระดูกในผู้สูงอายุต่อไป

5.2 วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาผลต่อการสร้างมวลกล้ามเนื้อ และการสร้างเซลล์กระดูกและด้านการทำลายเซลล์กระดูกของสารสกัด curcuminoids ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ curcumin, bis-demethoxycurcumin, demethoxycurcumin, สารสกัด curcuminoids ที่มีสาร curcuminoids รวมไม่น้อยกว่า 85% w/w และ สารสกัด curcuminoids ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำ
- เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยพื้นฐานในครั้งนี้ไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิกในอนาคต สำหรับการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยถ่ายทอดผลงานวิจัยแก่บริษัทที่สนใจ เพื่อนำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ลดความเสี่ยงต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย และด้านโรคกระดูกพรุน และเพิ่มช่องทางในการนำสารสกัดต่างๆ ใช้ประโยชน์ต่อไป

5.3 สรุปผลการทดลองทั้งหมด

ก. การศึกษาเกี่ยวกับผลต่อการสร้างมวลกล้ามเนื้อ

บททวนวรรณกรรม

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกกำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ มีสาเหตุเนื่องด้วยเทคโนโลยีการแพทย์ที่ก้าวหน้าอย่างรวดเร็วในปัจจุบันที่ส่งผลให้ผู้สูงอายุในอนาคตมีแนวโน้มที่จะมีอายุยืนนานขึ้น หรือเกิดจากการลดลงของภาวะเจริญพันธุ์หรืออัตราการเกิดลดน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้สูงอายุนี้อีกสิ่งหนึ่งที่ตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้เลยก็คือปัญหาด้านสุขภาพ ภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยหรือ sarcopenia ถือเป็นอีกหนึ่งกลุ่มอาการที่พบได้บ่อยถึง 1 ใน 3 ของผู้สูงอายุทั่วไป การรักษาในปัจจุบันประกอบด้วยการรักษาโดยการไม่ใช้ยาและการใช้ยา จากหลักฐานที่ปรากฏพบว่าประโยชน์จากการใช้ยายังไม่เพียงพอต่อการรักษาอีกทั้งการได้รับยาบางตัวอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงได้ เช่น เทสโทสเตอโรน (testosterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยเพิ่มมวลกล้ามเนื้อและสร้างโปรตีนของกล้ามเนื้อ แต่ผลข้างเคียงก็มีหลายประการ เช่นทำให้เกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก เต้านมโตในผู้ชาย (gynecomastia) ภาวะเม็ดเลือดแดงมาก (polycythemia) ส่งผลให้มีข้อจำกัดในการใช้ จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในพืชสมุนไพรบางชนิดสามารถรักษาหรือยับยั้งภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยได้ ดังนั้น หากสารสกัดจากพืชสมุนไพรสามารถนำมาใช้ในการรักษาได้ ก็มีความเป็นไปได้ที่จะรักษาหรือยับยั้งภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยที่พบในผู้สูงอายุได้

การทำวิจัยในครั้งนี้เป็นความร่วมมือระหว่างนักวิจัยของคณะเทคนิคการแพทย์ นักวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นักวิจัยจาก Morioka University ภาควิชา Nutrition Science, Iwate ประเทศญี่ปุ่น และนักวิจัยจาก University of Miyazaki ภาควิชา Anatomy, Histochemistry and Cell Biology, Miyazaki ประเทศญี่ปุ่น ด้วยทุนวิจัย Kobayashi International Scholarship Foundation, Japan ซึ่งคณะผู้วิจัยได้สนใจนำสารสกัด curcuminoid ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ curcumin, bis-demethoxycurcumin, demethoxycurcumin, สารสกัด curcuminoids ที่มีสาร curcuminoids รวมไม่น้อยกว่า 85% w/w และสารสกัด curcuminoids ในรูปแบบของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำจาก รศ.ดร.ภก.ภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์ และคณะ จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ต่อการรักษาภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย

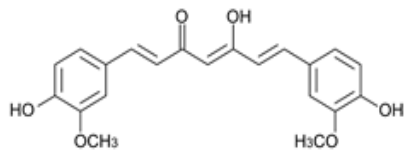
ภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย หรือ sarcopenia มาจากรากศัพท์ภาษากรีกคือ sarx (flesh) และ penia (loss) มีความหมายโดยรวมคือการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ โดย อุบัติการณ์ของภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยมีความแตกต่างกันมาก เนื่องจากจำกัดความของวิธีการวัดในแต่ละประชากรที่ศึกษามีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปพบ อุบัติการณ์ในคนอายุ 60-70 ปี ร้อยละ 5-13 และเพิ่มเป็นร้อยละ 11-50 เมื่ออายุเกิน 80 ปี จากการศึกษาในประเทศไทยที่ผ่านมาพบอุบัติการณ์สูงถึงประมาณ 1 ใน 3 ของประชากรทั่วไป โดยพบร้อยละ 32.5 ในเพศชายและร้อยละ 34.5 ในเพศหญิง พยาธิสรีรวิทยาของกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยโดยตรงมีหลายกลไก ได้แก่ การสร้างโปรตีน (protein synthesis) การสลายโปรตีน (proteolysis) การทำงานของระบบประสาท ปริมาณไขมันในกล้ามเนื้อ ปริมาณฮอร์โมนที่ลดลง ปฏิกริยาอักเสบ การขาดสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีน ชนิดของภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยแบ่งออกตามพยาธิสรีรวิทยาการเกิดได้เป็น ชนิดปฐมภูมิ (primary sarcopenia) และชนิดทุติยภูมิ (secondary sarcopenia) โดยชนิดปฐมภูมิหมายถึงภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยที่สัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น (age-related sarcopenia) โดยตรงไม่พบสาเหตุอื่นนอกจากอายุที่มากขึ้น ส่วนชนิดทุติยภูมินี้ถึงเมื่อพบสาเหตุอื่นของภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย เช่น ผู้ป่วยติดเตียง ผู้ที่ไม่ค่อยออกกำลังกาย ได้รับโปรตีนจากอาหารไม่เพียงพอ โรคที่มีกรออักเสบ เป็นต้น โดยส่วนใหญ่จะพบว่าภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยที่สัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้นจะเกิดจากการสูญเสียสมดุลระหว่างการสังเคราะห์และการสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ การรักษาในปัจจุบันจะประกอบไปด้วยการรักษาที่ไม่ใช้ยาและใช้ยา แต่เนื่องจากยังไม่มีหลักฐานประโยชน์การใช้ยารองรับมากเพียงพอ จึงทำให้มุ่งเน้นไปที่การรักษาแบบไม่ใช้ยา โดยการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าการรับประทานอาหารประเภทโปรตีนที่ประกอบไปด้วย ลิวซีน (leucine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ควบคู่กับการออกกำลังกายมีส่วนช่วยในการรักษาและป้องกันการฝ่อของกล้ามเนื้อได้ (muscle atrophy) และยังเป็นต้องได้รับการศึกษาผลต่อไป วิธีการส่งสัญญาณที่สำคัญที่พบในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนคือ insulin-like growth factor-1 (IGF1), Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt โดย IGF1-PI3K-Akt จะส่งสัญญาณไปกระตุ้น mammalian target of rapamycin (mTOR) ส่งผลให้เพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ นอกจากนี้ Akt ยังสามารถยับยั้งการสลายโปรตีนในเซลล์ผ่าน Forkhead box O (FOXO) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ proteasome activity ส่วนกระบวนการสลายโปรตีนในเซลล์จะมี ubiquitin-proteasome pathway และ autophagy-lysosomal pathway ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ โดย ubiquitin-proteasome pathway จะถือเป็นกลไกสำคัญที่ควบคุมการสลายโปรตีน

จากการศึกษาสมุนไพรที่ใช้เพื่อป้องกันภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย การศึกษาที่ผ่านมามีศึกษาผลของสารประกอบ ursolic acid ใน C2C12 myotubes พบว่า ursolic acid สามารถยับยั้งการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อโดยการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนและลดการสลายโปรตีน อีกทั้งยังลดการแสดงออกของ myostatin และ inflammatory cytokines (TGF- β , IL-6 และ TNF- α) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ ubiquitin-E3 ligase (Atrogin-1, MuRF-1 และ MUSA1) ที่พบใน ubiquitin-proteasome pathway และมีการรายงานพบว่า ผลของ resveratrol (สารที่พบมากในถั่วลิสง ผลหม่อน เมล็ดองุ่น) ต่อการลดการเกิดภาวะกล้ามเนื้อลีบ (muscle atrophy) ที่เกิดจากโรคไตชนิดเรื้อรัง ผ่าน MuRF1 signaling pathway พบว่า resveratrol สามารถยับยั้งการเกิดภาวะกล้ามเนื้อลีบได้โดยการยับยั้งการแสดงออกของ MuRF1 ทำให้ลดการสลายโปรตีน ในปี 2018 Seongguk Cho และคณะ ได้ศึกษาผลของสมุนไพรที่มีส่วนผสมของ *Schisandra chinensis* Baill, *Lycium chinense* Mill และ *Eucommia ulmoides* Oliv ต่อการรักษาภาวะกล้ามเนื้อลีบใน C2C12 myoblast cells พบว่า *Schisandra chinensis* Baill, *Lycium chinense* Mill และ *Eucommia ulmoides* Oliv ในอัตราส่วน 2:1:1 สามารถป้องกันภาวะกล้ามเนื้อลีบโดยยับยั้ง ubiquitin-proteasome pathway ตลอดจนเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนใน C2C12 myoblast cells

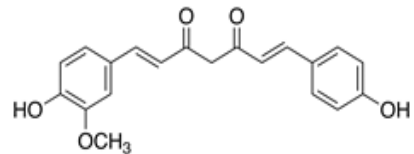
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด curcuminoids ต่อการรักษาภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย Diaz-Castro J และคณะ พบว่าการอักเสบและภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันสามารถทำให้กล้ามเนื้อเกิดการสูญเสียได้ ในปี 2009 Alamdari N และคณะพบว่า สารสกัด curcuminoids สามารถป้องกันการสูญเสียหรือการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อได้ โดยยับยั้งการทำงานของ NF-KB pathway ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสลายของโปรตีนและเกี่ยวข้องกับการอักเสบของกล้ามเนื้อ

สารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย สารสกัดจากขมิ้นชัน (curcuminoids) ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ curcumin (Cu), bis-demethoxycurcumin (Bis), de-methoxycurcumin (De), สารสกัด curcuminoids ที่มีสาร curcuminoids รวมไม่น้อยกว่า 85% w/w (CRE) และ สารสกัด curcuminoids ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำ และมีปริมาณสูง ซึ่งได้แก่ CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter ดังรูปที่ 1

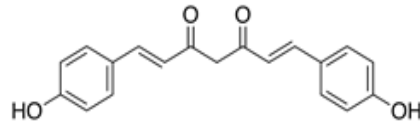
เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)



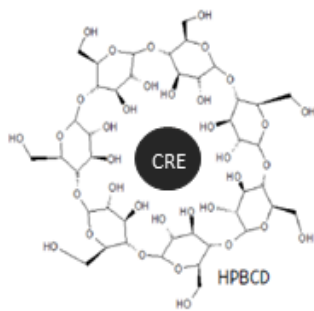
Curcumin (Cu)



Demethoxycurcumin (De)



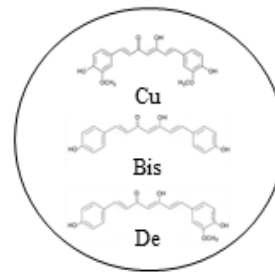
Bisdemethoxycurcumin (Bis)



CRE-Binary (CRE-Bin)

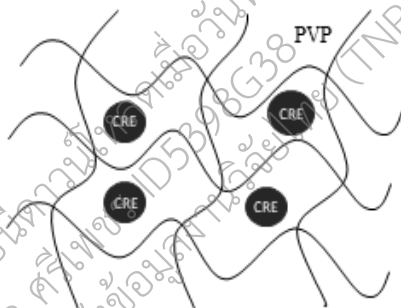
= CRE+Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD)

(Oligosaccharide: outside is hydrophilic)



Curcuminoid rich extract (CRE)

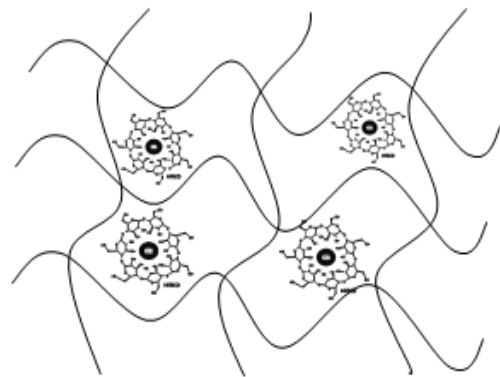
= Cu+Bis+De



CRE-solid dispersion (CRE-SD)

=CRE+ Polyvinylpyrrolidone (PVP)

(Polymer: hydrophilic)



CRE-Ternary (CRE-Ter)

= CRE+Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD)

+ Polyvinylpyrrolidone (PVP)

(Oligosaccharide+Polymer: outside is hydrophilic)

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารสกัดเคอคูมินอยด์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งประกอบด้วย Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter

วิธีการทดลอง

1) เตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร

เตรียมสารสกัด curcuminoid ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ curcumin, bis-demethoxycurcumin, de-methoxycurcumin, สารสกัด curcuminoids ที่มีสาร curcuminoids รวมไม่น้อยกว่า 85% w/w และสารสกัด curcuminoids ในรูปแบบของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำ จาก รศ.ดร.ภก.ภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์ และคณะ จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2) ศึกษาผลของสารสกัดต่อการรักษาภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย

วัสดุและวิธีการ

Cell line: C2C12 myoblast cells (*Mus musculus*)

Medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)+10% Fetal bovine serum

(for growth), DMEM+2% horse serum (HS) for differentiation

Reagent: Dexamethasone

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยง C2C12 myoblast cells ใน DMEM ที่มี 10% FBS ภายใต้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน (37°C, 5% CO₂ และที่ความชื้น 95%) subconfluent C2C12 myoblast cells จะถูกเปลี่ยนเป็น DMEM ที่มี 2% ซีรัมม้า (HS) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็น myotubes ที่มีหลายนิวเคลียส ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน ในช่วง 5 วันที่เซลล์เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็น myotubes ทำการบำรุงรักษา myotubes ด้วย 1uM dexamethasone พร้อมกับทำการเติมสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่เตรียมไว้ หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงจึงทำการวิเคราะห์ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร

2.2 การตรวจวัด cell viability

ทำการเตรียม C2C12 myoblast cells ใน 96 well plate ผสมกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรในความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเติมสารละลาย MTT เพื่อตรวจวัด cell viability ของสารสกัดทุกตัวเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทำการทดลองต่อไป

2.3 ตรวจวัดการแสดงออกของยีน โดยวิธี Real-time PCR

ทำการเลี้ยง C2C12 myoblast cells ที่ผสมสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อเซลล์น้อยที่สุดในการทดลองที่ 2 สกัด RNA จากนั้นเปลี่ยนเป็น cDNA หลังจากนั้นจึงใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน MuRF-1 และ Atrogin-1 ในการทำ Real time- PCR

Primer design

MuRF-1 (mouse)

Forward: GGAACCTGCTGGTGGAAAACATC

Reverse: CGTCTTCGTGTTCCCTTGACATC

Atrogin-1F (mouse) Forward: GCAGAGAGTCGGCAAGTC

Reverse: CAGGTCGGTGATCGTGAG

2.4 ตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี western blotting

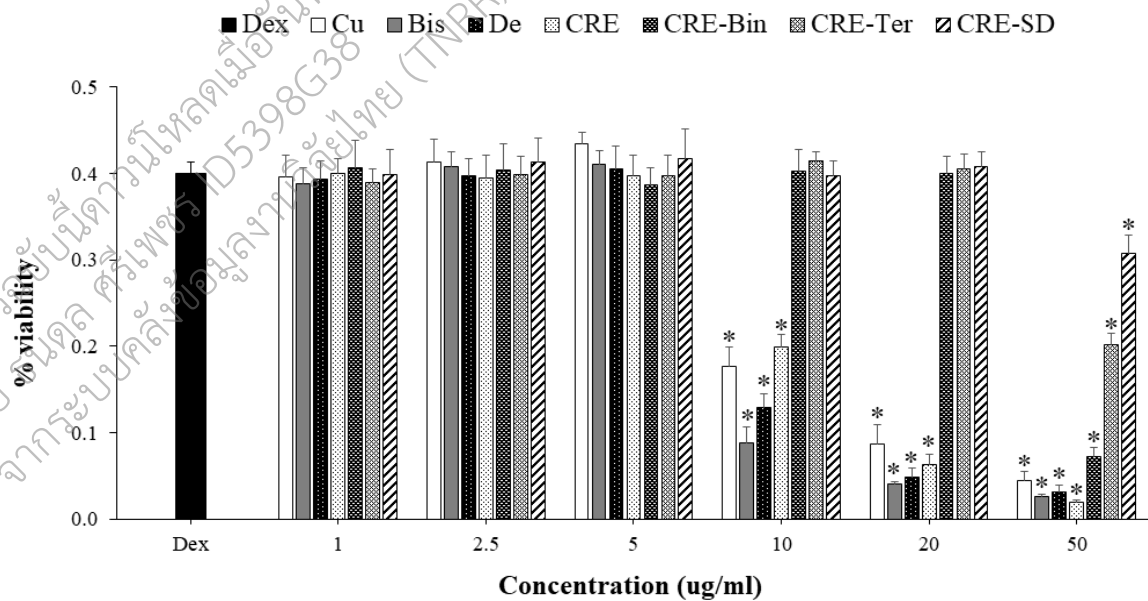
ตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน P-Foxo-1, P-Foxo-3 และ P-Akt ด้วย western blotting ซึ่งโปรตีนทุกตัวเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนในคนที่เป็โรค sarcopenia

2.5 Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบ mean \pm SD จากนั้นเปรียบเทียบค่าต่างๆ โดยใช้ one-way ANOVA with student T-test ที่ทำซ้ำ 3 การทดลอง ค่า statistical significance คือ $p < 0.05$

การทดลองที่ 1 ศึกษาความมีชีวิตหรือ Cell viability โดยวิธี MTT

คณะผู้วิจัยได้ศึกษา cell viability โดยทำการเลี้ยงเซลล์ C2C12 ซึ่งเป็น muscle cells จากนั้น induce C2C12 ด้วย dexamethasone (control) ให้เซลล์กลายเป็น muscle atrophy และเติมสารสกัดซึ่งประกอบด้วย Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter ใน C2C12 cells ที่ induce ด้วย dexamethasone เพื่อศึกษาความมีชีวิตของเซลล์หลังจากใส่สารสกัด ผลการศึกษาแสดงได้ในรูปที่ 2



*P-value < 0.05

รูปที่ 2 ผลการศึกษา cell viability ด้วยวิธี MTT โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า Cu, Bis, De, CRE มี cell viability ที่ 5 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ CRE-Bin, CRE-Ter และ CRE-SD มี cell viability ที่ 20 $\mu\text{g/ml}$

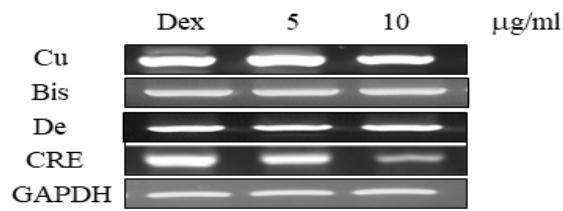
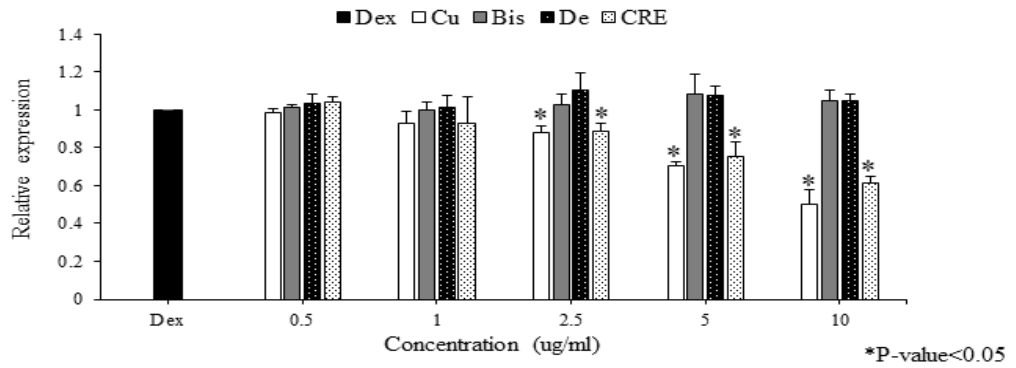
วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 แสดงผลของ Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter ต่อ C2C12 cells ที่ induce ด้วย dexamethasone ผลการศึกษาพบว่า พบว่า Cu, Bis, De, CRE มี cell viability ที่ 5 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ CRE-Bin, CRE-Ter และ CRE-SD มี cell viability ที่ 20 $\mu\text{g/ml}$

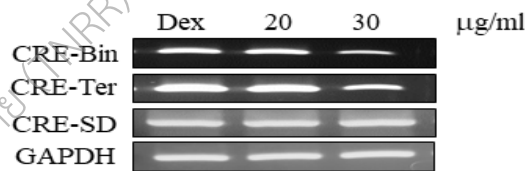
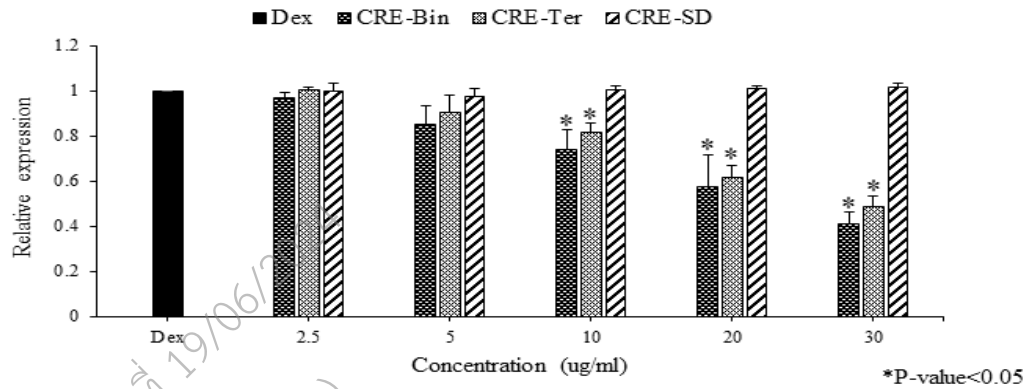
การทดลองที่ 2 ศึกษาการแสดงออกของ Atrogin -1 ละ MuRF-1

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Atrogin -1 ละ MuRF-1 ซึ่งยีนทั้งสองชนิด ถ้ามีการแสดงออกมากกว่าปกติจะทำให้เกิด muscle atrophy โดยผู้วิจัยทำการเลี้ยงเซลล์ C2C12 ซึ่งเป็น muscle cells จากนั้น induce C2C12 ด้วย dexamethasone (control) ให้เซลล์กลายเป็น muscle atrophy จากนั้นเติมสารสกัดซึ่งประกอบด้วย Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter ใน cells ที่ induce ด้วย dexamethasone สกัด RNA และทำ Real time – qRT-PCR ผลดังรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Atrogin-1

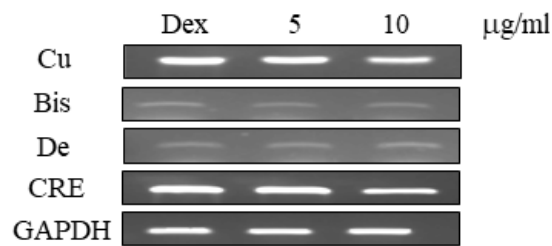
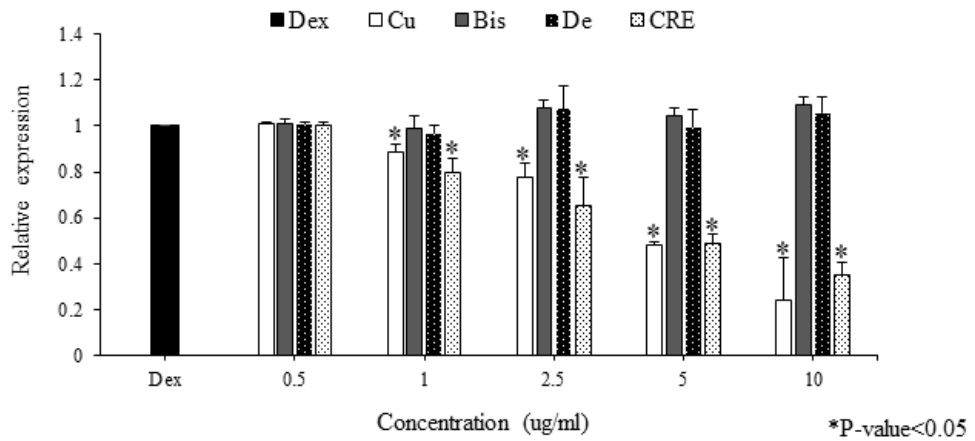
(A)



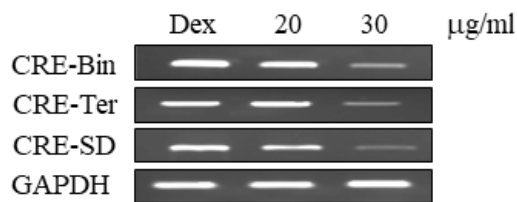
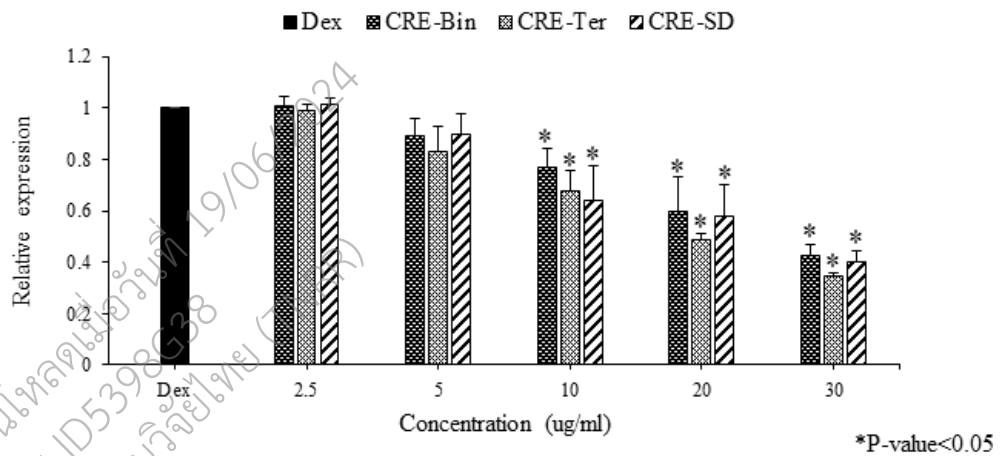
(B)

รูปที่ 3.1 แสดง Cu, CRE, CRE-Bin, และ CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออกของ Atrogin -1 ส่วน De Bis และ CRE-SD ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ Atrogin-1 (A และ B) โดยแต่ละ lane (แถวการทดลอง) เปรียบเทียบกับ Dex (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

MuRF-1



(A)



(B)

รูปที่ 3.2 แสดง Cu, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MuRF-1 ส่วน De และ Bis ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ MuRF-1 (A และ B) โดยแต่ละ lane (แถวการทดลอง) เปรียบเทียบกับ Dex (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

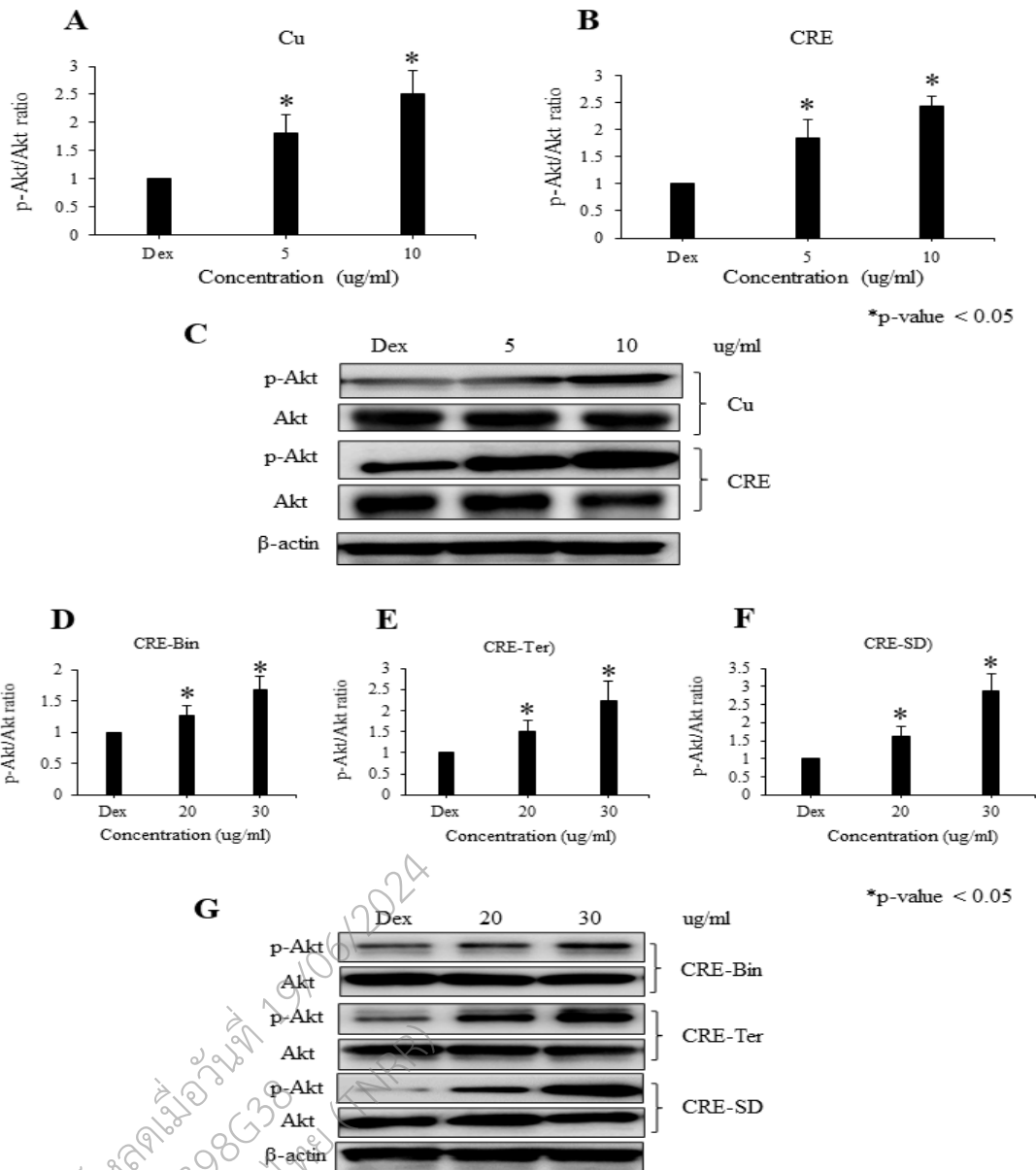
วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

Cu, CRE, CRE-Bin, และ CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออกของ Atrogin -1 ส่วน De Bis และ CRE-SD ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ Atrogin-1 ขณะที่ Cu, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MuRF-1 ส่วน De และ Bis ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ MuRF-1

การทดลองที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของ Akt และ phospho-Akt ใน TOR signaling pathway ซึ่งเป็น pathway ที่สำคัญต่อการสร้างโปรตีนของ muscle cells

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Akt และ phospho-Akt ใน TOR signaling pathway ซึ่งเป็น pathway ที่สำคัญต่อการสร้างโปรตีนของ muscle cells โดยทำการเลี้ยงเซลล์ C2C12 ซึ่งเป็น muscle cells จากนั้น induce C2C12 ด้วย dexamethasone (control) ให้เซลล์กลายเป็น muscle atrophy จากนั้นเติมสารสกัดซึ่งประกอบด้วย Cu, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, และ CRE-Ter ใน cells ที่ induce ด้วย dexamethasone สกัดโปรตีน และศึกษาโปรตีน Akt และ phospho-Akt ด้วยวิธี western blot ผลดังรูปที่ 4

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการผลิตเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

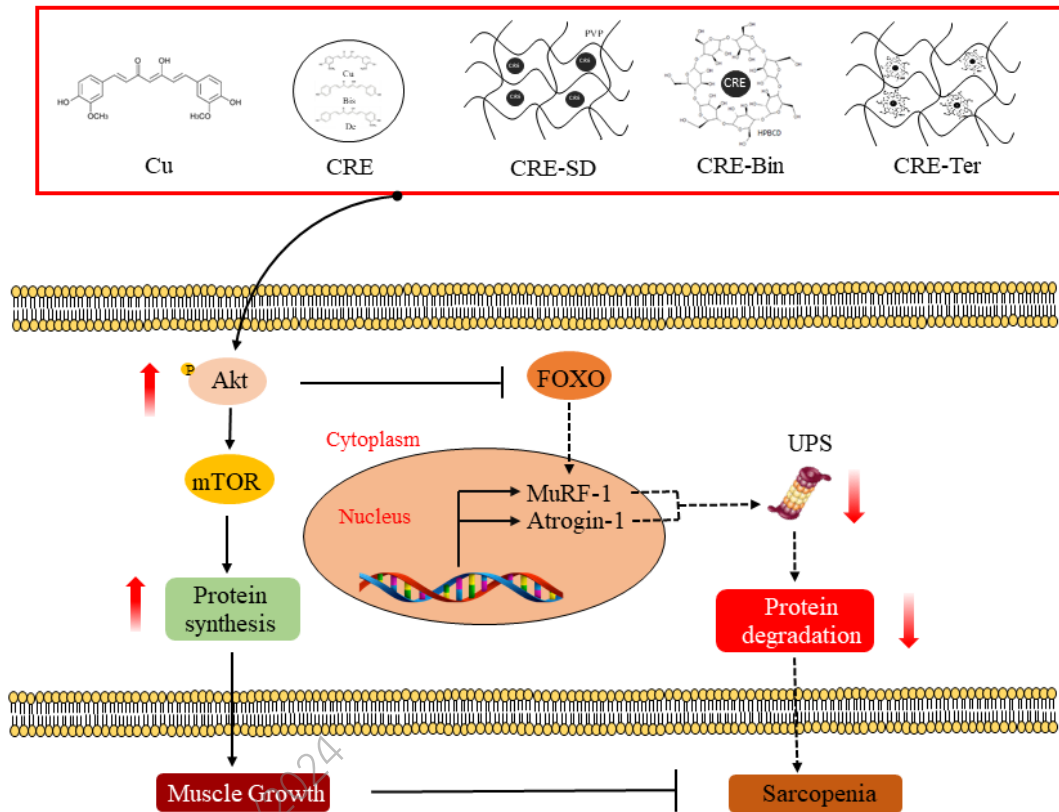


รูปที่ 4 แสดงว่า Cu (A), CRE (B), CRE-Bin (D), CRE-Ter (E) และ CRE-SD (F) สามารถกระตุ้นการสร้าง phosphor-Akt ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีนใน TOR signaling pathway ได้ โดยแต่ละ lane (แถวการทดลอง) เปรียบเทียบกับ Dex (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

Cu (A), CRE (B), CRE-Bin (D), CRE-Ter (E) และ CRE-SD (F) สามารถกระตุ้นการสร้าง phosphor-Akt ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีนใน TOR signaling pathway ได้ โดยแต่ละ lane (แถวการทดลอง) เปรียบเทียบกับ Dex (control)

สรุปผลการศึกษา



รูปที่ 5 แสดงภาพสรุปผลการศึกษา การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารเคอคูมินอยด์ที่ประกอบด้วย Cu, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter สามารถยับยั้งการเกิด muscle atrophy หรือ sarcopenia โดยสามารถยับยั้งยีนที่ทำให้ muscle atrophy คือทั้ง Atrogin-1 และ MuRF-1 นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนผ่าน TOR signaling pathway ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ดังเอกสารแนบ (Sani A, Hasegawa K, Yamaguchi Y, Panichayupakaranant P, **Pengiam Y**. Inhibitory effects of curcuminoids on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells. *Phytomedicine Plus* 1 (1) 2021, 100012.) (Corresponding author) ฐาน Scopus

การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิก สำหรับการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยถ่ายทอดผลงานวิจัยแก่บริษัทที่สนใจ เพื่อนำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ลดความเสี่ยงต่อภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อย และต้านโรคกระดูกพรุน และเพิ่มช่องทางการนำสารสกัดต่างๆ ใช้ประโยชน์ต่อไป

ข. การศึกษาเกี่ยวกับการต้านการทำลายเซลล์กระดูกของสารสกัด

บทบทวนวรรณกรรม

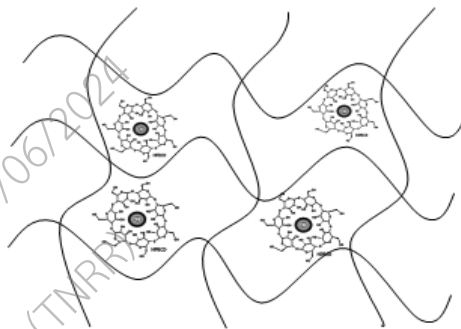
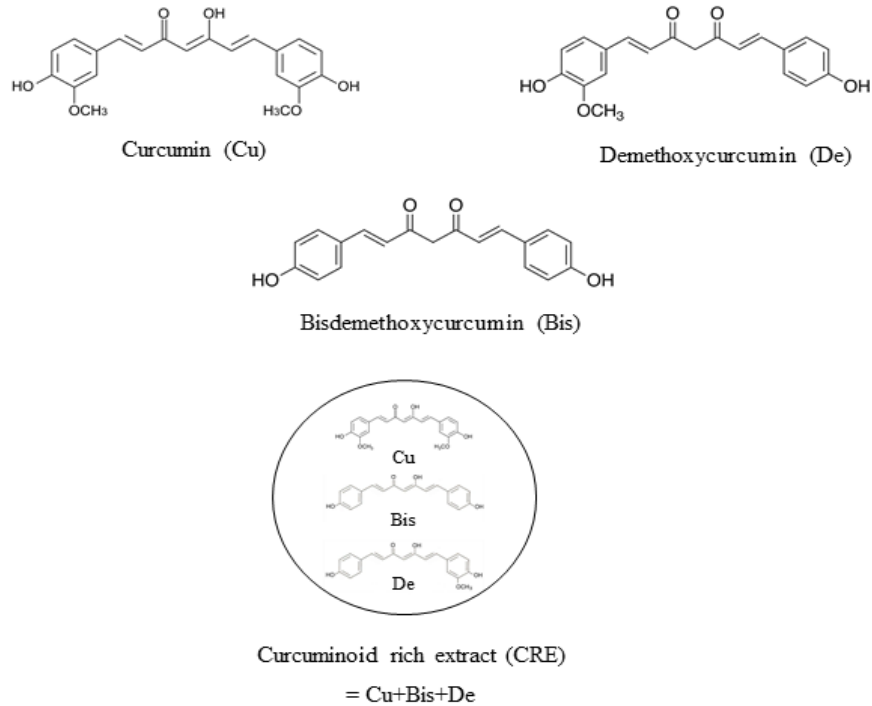
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบ miRNA ซึ่งประกอบด้วย miR-21, miR-26a, miR-125b, miR-133, miR-135, miR-29a, miR-141, miR-200a, miR-210, miR-29, miR-378, miR-2861, and miR-206 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง osteoclast (osteoclastogenesis) (30,31) อย่างไรก็ตามพื้นฐานทางโมเลกุลและความสัมพันธ์ระหว่าง miRNA และ osteoclastogenesis ยังมีการศึกษาน้อย จากการศึกษามาก่อนพบว่า miR-21 กระตุ้นการสร้าง osteoclast โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน c-FOS และ NFATc1 ผ่าน NF- κ B signaling pathways และยับยั้งโปรตีน programmed cell death 4 (PDCD4) ซึ่ง PDCD4 จะยับยั้งกระบวนการสร้าง osteoclast (32) และจากการศึกษาที่ผ่านมาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าการแสดงออกของ miR-21 มีความเกี่ยวข้องกับ NF- κ B signaling pathway โดยที่ NF- κ B-miR-21 pathway อาจจะเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาโรค healing diabetic ulcers (33) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่า aloin สามารถยับยั้งกระบวนการสร้าง osteoclast ผ่าน NF- κ B-miR-21 pathway

การศึกษาค้นคว้าวิจัยสนใจนำสารสกัดจากขมิ้นชันในรูปแบบที่เพิ่มการละลายน้ำต่อกระบวนการสร้าง osteoclasts ผ่าน NF- κ B-miR-21 pathway ซึ่งข้อมูลที่ได้จะช่วยเสริมผลการศึกษาเรื่อง ผลของสารสกัดเคอคูมินอยด์ในรูปแบบที่เพิ่มการละลายน้ำต่อการสร้างและต้านการทำลายเซลล์กระดูก ซึ่งได้ทุนอุดหนุนการแพทย์ครบวงจร (medical hub) ของ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 2561-2562 สัญญาทุนวิจัยเลขที่ RDG6150075 เป็นการเพิ่มมูลค่าของขมิ้นชันให้มากขึ้นในการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของบริษัท บางกอก แล็บ แอนด์ คอสเมติก จำกัด เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดเคอคูมินอยด์ในรูปแบบที่เพิ่มการละลายน้ำ และสารสกัดเคอคูมินอยด์ในรูปแบบปกติ ต่อการแสดงออกของ miR-21 ในกระบวนการสร้าง osteoclasts

คณะผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าประกอบด้วย สารสกัด curcuminoids ในรูปแบบ สารสกัด curcuminoids เสิงซอนที่เพิ่มการละลายน้ำสูงคือ CRE-Ter มาเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ดังรูปที่ 1



CRE-Ternary (CRE-Ter)
= CRE+Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD)
+ Polyvinylpyrrolidone (PVP)
(Oligosaccharide+Polymer: outside is hydrophilic)

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างสารสกัด curcuminoids ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำสูง CRE-Ter

ระเบียบวิธีการศึกษา

1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

RANKL ซื้อจากบริษัท R&D ประเทศไทย, RPMI cell culture medium ซื้อจากบริษัท Gibco ประเทศไทย, TRAP staining ซื้อจากบริษัท sigma ประเทศไทย, anti-NF- κ B -p65, anti-p.NF- κ B-p65, anti-I κ B α , anti-p.I κ B α , และ Anti β -actin ซื้อจากบริษัท cell signaling น้ํายาและสารเคมีอื่นๆ ซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศไทย, บริษัท ธีระเทรตติ้ง และบริษัท Gibthai จำกัด

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์
นำ RAW 264.7 cells (ได้จาก ATCC cell lines ประเทศไทย) มาเลี้ยงใน RPMI cell culture medium ที่มีส่วนผสมของ 10% FBS, 2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin G และ 100 μ g/ streptomycin และ anti-bacterial cocktail (PNS) ใน incubator ที่มี 5% CO₂ ที่ 37°C ในกรณีต้องการเปลี่ยน RAW 264.7 cells ให้กลายเป็น osteoclasts ต้องเติม 20 ng/ml RANKL และเลี้ยงเซลล์นาน 5 วัน
3. การตรวจการสร้าง TRAP enzymes ของ osteoclast โดย TRAP assays
ปรับ RAW 264.7 cells ให้มีความเข้มข้น 0.3 x 10³ cells/mL ใน 96 well plate ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/ml RANKL เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจการสร้าง leukocyte acid phosphatase ของ osteoclasts โดยใช้ TRAP staining reagent kit
4. การตรวจการสร้าง cathepsin K ของ osteoclasts โดยวิธี Real time -PCR
เลี้ยง RAW 264.7 cells ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/ml RANKL เป็นเวลา 5 วัน สกัด RNA โดยใช้ QAGEN reagent kit จากนั้นเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ ReverTraAce qPCR reagent kit จากนั้นใช้ primer ที่จำเพาะยีนต่างๆ เหล่านี้เพื่อทำ PCR

Cathepsin K: Forward: ATGTGGGGCTCAAGGTTCTG
Reverse: CATATGGGAAAGCATCTTCAGAGTC
Reverse: TGTGGGATGTGAACTCGGAA
GAPDH: Forward: AAATGGTGAAGGTCGGTGTG
Reverse: GAATTTGCCGTGAGTGGAGT

ซึ่ง Cathepsin K, c-Fos และ NFATc1 เป็นยีนของ osteoclasts

5. การศึกษาการแสดงออกของ miR-21 โดยวิธี Real-time PCR
เลี้ยง RAW 264.7 cells ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/ml RANKL เป็นเวลา 5 วัน สกัด miRNA โดยใช้ QAGEN (miRNA) reagent kit
Primer sequences for miR-21

RT-primer: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACA-3';

Forward: 5'-CGGCGGTAGCTTATCAGACTGATGT-3'

Reverse: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

U6 (RT-primer: 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGCAT-3'

Forward: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'

Reverse: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3')

PTEN (forward: 5'-ACCATAACCCACCACAGC-3'; reverse: 5'-CAGTTCGTCCCTTCCAG-3'), and GAPDH (Forward: AAATGGTGAAGGTCGGTGTG;

Reverse: GAATTTGCCGTGAGTGGAGT)

6. การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี western blotting
เลี้ยง RAW 264.7 cells ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/ml RANKL เป็นเวลา 5 วัน สกัด proteins โดยใช้ RIPA buffer จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ที่มี 2-mercaptoethanol ทำการต้มสารละลายโปรตีนที่ 95 °C นาน 5 นาที แล้วนำมาแยกใน 10% poly acrylamide gel ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนที่อยู่ใน gel ลงใน PVDF membrane

หลังจาก block nonspecific binding ด้วย nonfat milk in TBST (TBS และ 0.1% Tween 20) จากนั้น incubate membranes ใน specific antibody แต่ละชนิดซึ่งได้แก่ , anti-NF- κ B -p65, anti-p.NF- κ B-p65, anti-I κ B α , anti-p.I κ B α , anti-cathepsin K และ Anti β -actin ซึ่งที่ซื้อจากบริษัท cell signaling ประเทศไทย จากนั้น incubate ใน secondary antibody ที่ conjugate ด้วย horseradish peroxidase จากนั้นตรวจสอบผลโดยใช้ digital imaging system

7. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน p65 NF- κ B กับโปรโมเตอร์ของ miR-21 gene โดยวิธี

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

เลี้ยง RAW 264.7 cells ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/ml RANKL เป็นเวลา 5 วัน สกัด nuclear proteins โดยใช้ reagent kit จากนั้นนำ nuclear extracts มาผสมกับ biotin labelled nucleotides (15 μ g protein ผสมกับ 15 fmol DNA), NF κ B (Forward): 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' and NF κ B (Reverse): 5'-GCCTGGGAAAGTCCCTCAACT-3' นำไปอุ่น 30 นาทีที่ 37 °C. จากนั้น DNA-protein complex นำมาแยกด้วยวิธี 5% native polyacrylamide gels (SDS-PAGE) จากนั้นถ่ายโปรตีนที่อยู่ใน gel ลงใน PVDF membrane หลังจากนั้นนำ PVDF membrane ไปอบที่ 80 °C 2 ชั่วโมง block nonspecific binding ด้วย nonfat milk in TBST (TBS และ 0.1% Tween 20) จากนั้น incubate membranes ใน specific antibody คือ anti-NF- κ B -p65 ที่ซื้อจากบริษัท cell signaling ประเทศไทย จากนั้น incubate ใน secondary antibody ที่ conjugate ด้วย horseradish peroxidase จากนั้นตรวจสอบผลโดยใช้ digital imaging system

8. Chromatin immunoprecipitation (CHIP) assays

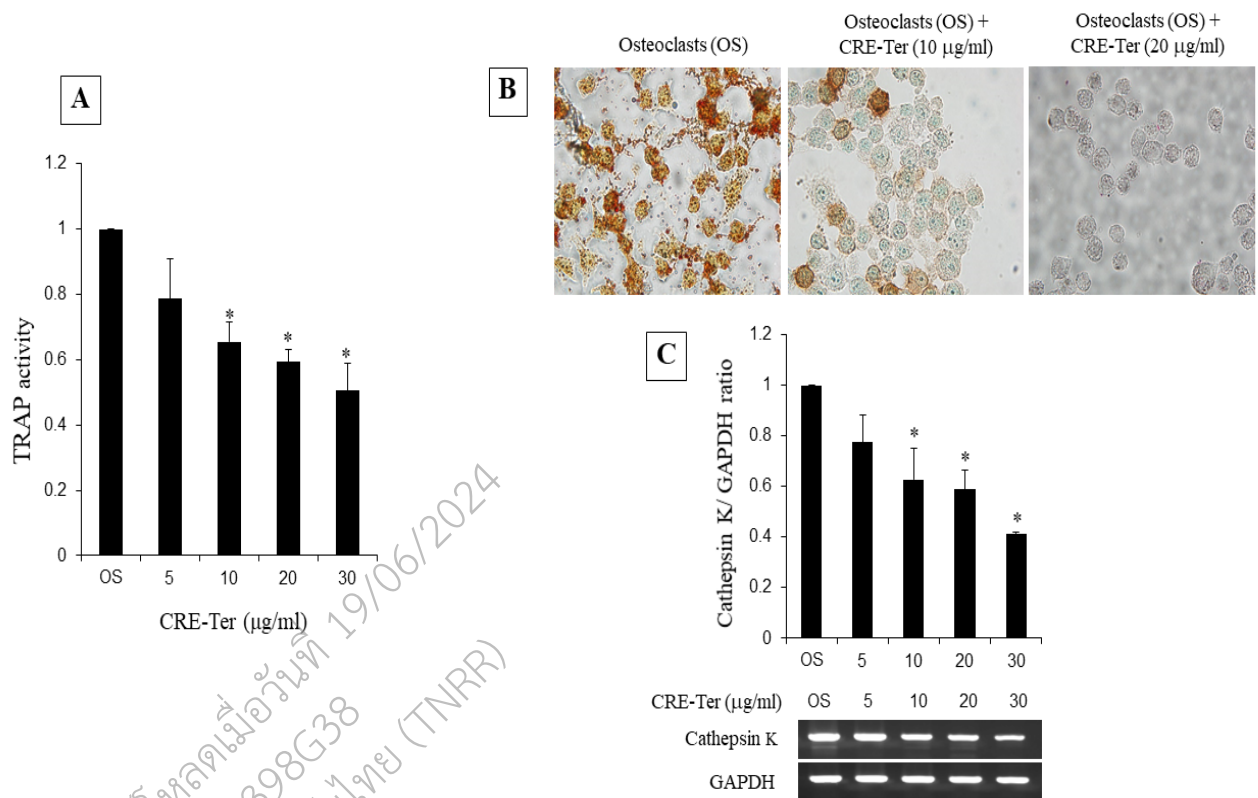
เลี้ยง RAW 264.7 cells ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/ml RANKL เป็นเวลา 5 วัน จากนั้น เซลล์จะถูก cross-linked ด้วย 1% formaldehyde และ chromatin เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้ Pierce™ Chromatin Prep module (Thermo Scientific) จากนั้น chromatin จะถูกจับกับ anti-NF κ Bp65 โดยวิธี immunoprecipitation โดยใช้ IgG เป็น negative control ใช้ Pierce™ agarose CHIP kit (Thermo Scientific) จากนั้นนำไปทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ pri-miR-21 ซึ่งคล่อมกับ binding site ของ NF- κ B โดยมี primers 2 set ประกอบด้วย set A: Forward 5'-GGAGTGGATGGGTTCTGCCTTA - 3' and Reverse 5'- CAAGGTGGATTGCATCGAGG - 3'; set B: Forward 5'- TGCAACAGACTGGCCTTC-3' and Reverse 5'- CATGCAAGACTGTTATCCAATCT-3'.

10. Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบ mean \pm SD จากนั้นเปรียบเทียบค่าต่างๆ โดยใช้ one-way ANOVA with student T-test ที่ทำซ้ำ 3 การทดลอง ค่า statistical significance คือ $p < 0.05$

การทดลองที่ 1 แสดงผลของ CRE-Ter ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ TRAP และ Cathepsin K ซึ่งเป็น mature markers ของ osteoclasts

TRAP และ Cathepsin K เป็น osteoclast markers ที่คณะผู้วิจัยศึกษาในครั้งนี้ โดยคณะผู้วิจัยได้เลี้ยง RAW 264.7 cells จากนั้น induce ให้ RAW 264.7 cells ให้กลายเป็น osteoclasts โดยการเติม RANKL 20 ng/ml จากนั้นเติม CRE-Ter แบบ dose dependent และศึกษา TRAP activity (A) TRAP staining (B) และ Cathepsin K (C) ด้วยวิธี Real time -qRT PCR ของ osteoclasts



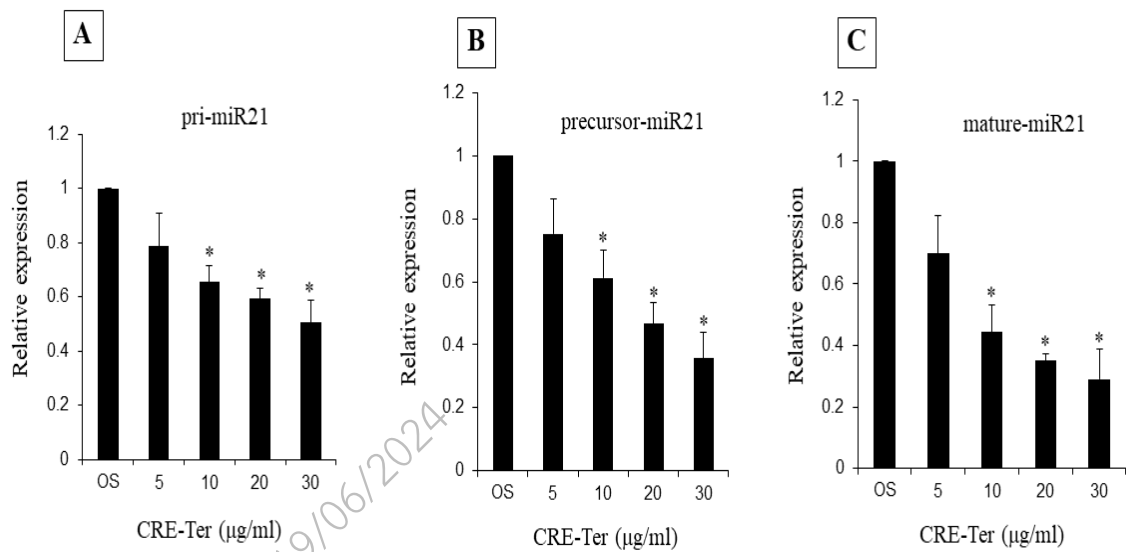
รูปที่ 2 แสดง CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้งการแสดงออก TRAP (A, B) และ Cathepsin K ของ osteoclasts ได้ (*P-value < 0.05) โดย OS คือ osteoclasts (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 แสดงผลของ CRE-Ter ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ TRAP และ Cathepsin K ซึ่งเป็น mature markers ของ osteoclasts การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า CRE-Ter ซึ่งเป็นเคอร์คูมินอยด์ ที่ละลายน้ำสูงสามารถยับยั้ง osteoclast markers ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังมี osteoclast markers อื่นหลายอย่างเช่น c-Fos และ NFATc1 ซึ่งไม่ได้ศึกษาในครั้งนี้ ถ้าศึกษาการแสดงออกของ c-Fos และ NFATc1 ด้วยจะทำให้ข้อมูลสมบูรณ์มากขึ้น

การทดลองที่ 2 แสดงผลของ CRE-Ter ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ miR-21

การศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่า miR-21 เกี่ยวข้องกับการสร้าง osteoclasts ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจว่า สารสกัด curcuminoids ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำสูง CRE-Ter สามารถยับยั้งการสร้าง miR-21 หรือไม่ โดยคณะผู้วิจัยได้เลี้ยง RAW 264.7 cells จากนั้น induce ให้ RAW 264.7 cells ให้กลายเป็น osteoclasts โดยการเติม RANKL 20 ng/ml จากนั้นเติม CRE-Ter แบบ dose dependent และศึกษา molecules ของ miR-21 ซึ่งได้แก่ pri-miR21, precursor-miR21 และ mature miR21



รูปที่ 3 ผลการศึกษาแสดงว่า CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้งการแสดงออกของ pri-miR21, precursor-miR21 และ mature miR21 ได้ (*P-value < 0.05) โดย OS คือ osteoclasts (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

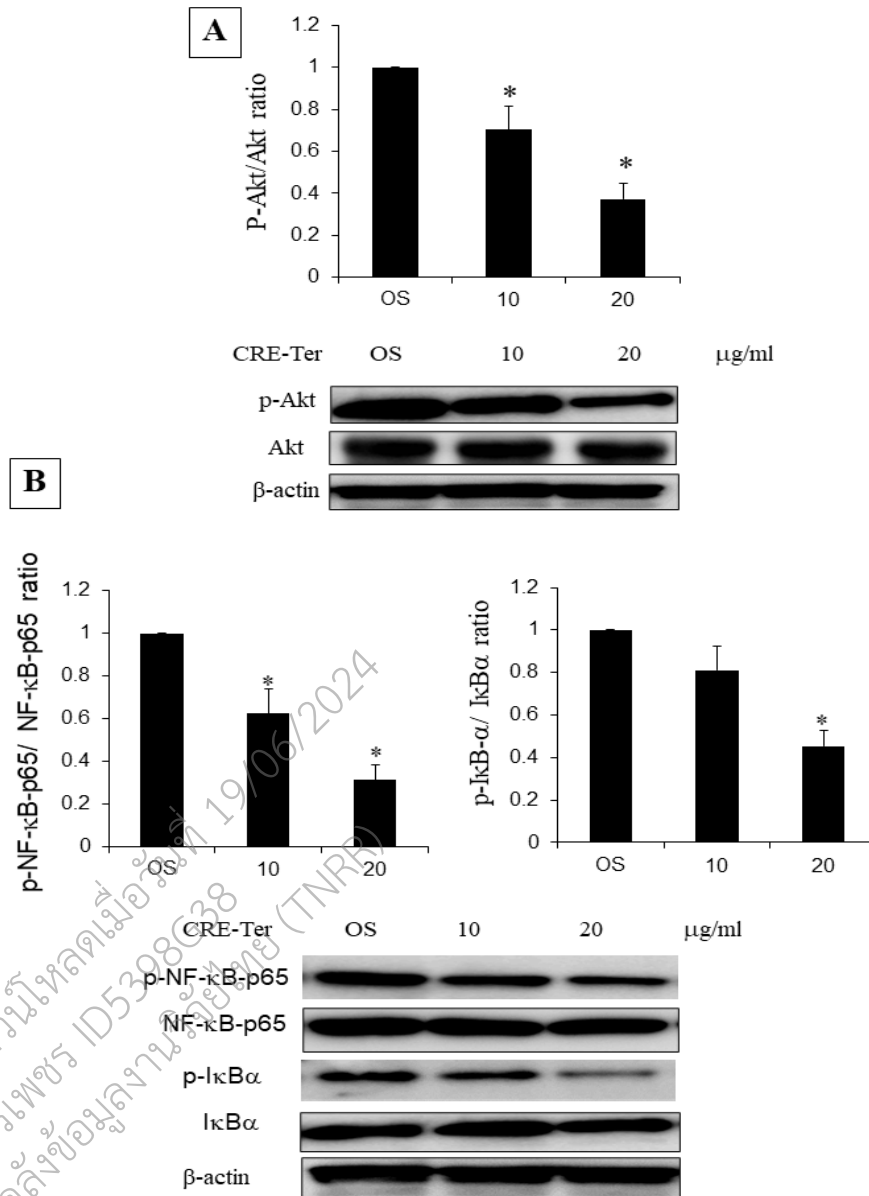
วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาแสดงว่า CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้งการแสดงออกของ pri-miR21, precursor-miR21 และ mature miR21 ได้

การทดลองที่ 3 แสดงผลของ CRE-Ter ของ Akt และ NF-κB signaling pathway

คณะผู้วิจัยพบว่าการสร้างยีนต่างๆ ใน osteoclasts เกี่ยวข้องกับ Signaling pathway รวมถึงการแสดงออกของ miR-21 ด้วย ดังนั้น คณะผู้วิจัยได้เลี้ยง RAW 264.7 cells จากนั้น induce ให้ RAW 264.7 cells ให้

กลายเป็น osteoclasts โดยการเติม RANKL 20 ng/ml จากนั้นเติม CRE-Ter dose dependent และศึกษา Akt และ NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี western blot analysis



รูปที่ 4 แสดง CRE-Ter dose dependent สามารถยับยั้งการแสดงออก Akt (A) และ NF- κ B (B) signaling pathway ของ osteoclasts (*P-value < 0.05) โดย OS คือ osteoclasts (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

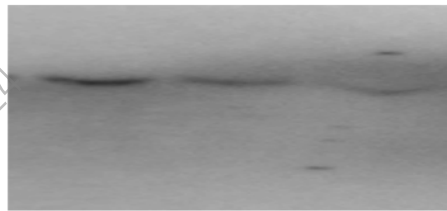
วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า CRE-Ter dose dependent สามารถยับยั้งการแสดงออก Akt และ NF- κ B signaling pathways ของ osteoclasts เนื่องจากการทดลองนี้แสดงเฉพาะโปรตีนของ NF- κ B บางตัวเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาอย่างละเอียดพบว่าใน signaling pathway นี้ประกอบด้วยโปรตีนหลายตัว การศึกษาเพิ่มขึ้นจะทำให้มั่นใจในผลการทดลองในครั้งนี้น่ามากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานมาก่อนว่า CRE - Ter สามารถยับยั้งผ่านทั้งสอง signaling pathways

การทดลองที่ 4 แสดงผลของ CRE-Ter ต่อการ binding promoter sequence ของ NF- κ B transcriptional protein

เพื่อที่จะศึกษา protein - DNA binding ในนิวเคลียสระหว่าง CRE-Ter ต่อการ binding promoter sequence ของ NF- κ B transcriptional protein คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธี EMSA (A) และ CHIP precipitation assay (B) ดังภาพข้างล่าง

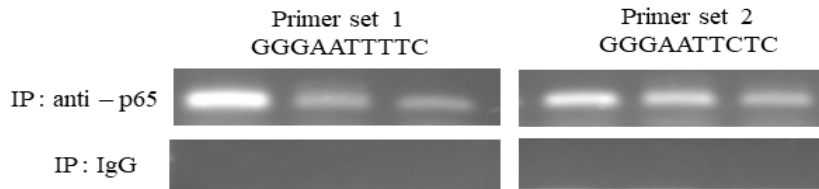
A



Raw cells + RANKL (20 ng/ml)	OS	OS	OS
CRE- Ter (µg/ml)	0	10	20

B

Potential NF κ B binding sequence



Raw cells + RANKL (20 ng/ml)	OS	OS	OS	OS	OS	OS
CRE- Ter (µg/ml)	0	10	20	0	10	20

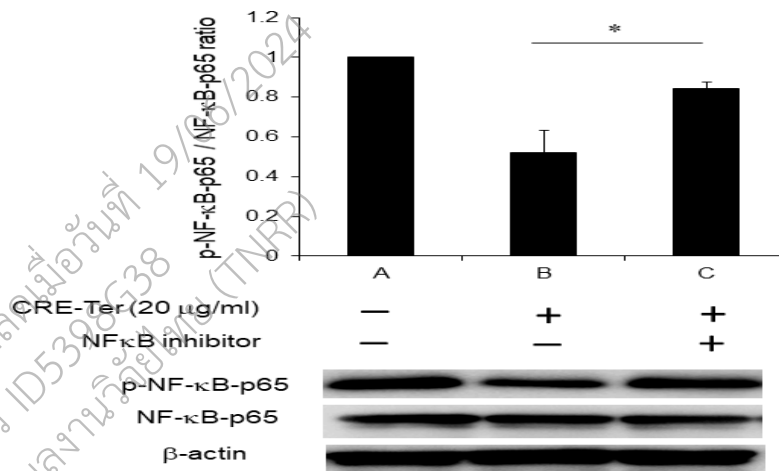
รูปที่ 5 แสดง CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้ง CRE-Ter dose dependent ต่อการ binding promoter sequence ของ NF- κ B transcriptional protein (A และ B) โดย OS คือ osteoclasts (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้ง CRE-Ter dose dependent ต่อการ binding promoter sequence ของ NF- κ B transcriptional protein โดยศึกษาจาก DNA – protein binding โดยวิธี EMSA และ CHIP precipitation assay จากการศึกษาด้วยวิธี CHIP precipitation assay โดยใช้ Primer set แค่ 2 set หรือ 2 ตำแหน่ง เท่านั้น ถ้าเพิ่มอีก 1 ตำแหน่ง จะทำให้สามารถเพิ่มความมั่นใจกับผลการทดลองมากขึ้น

การทดลองที่ 5 แสดงผลการยืนยันว่า CRE-Ter แสดงออกของยีนผ่าน NF- κ B signaling pathway

คณะผู้วิจัยได้ใช้ NF- κ B inhibitor เพื่อยืนยันผลว่า CRE-Ter แสดงออกของยีนผ่าน NF- κ B signaling pathway โดยวิธี western blot



รูปที่ 6 ผลการศึกษา แสดงว่า CRE-Ter แสดงออกของยีนผ่าน NF- κ B signaling pathway โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

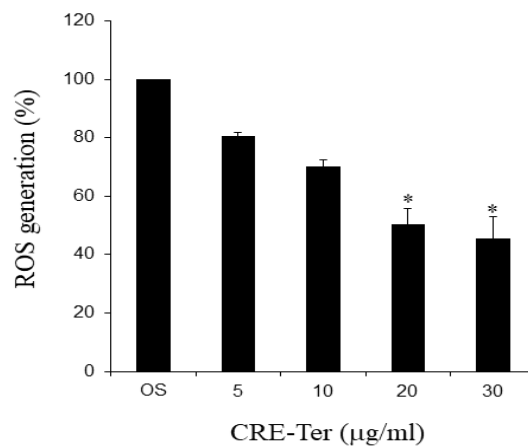
วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้ใช้ signaling pathway inhibitor เพื่อยืนยันการแสดงออกผ่าน signaling pathway นี้ ถ้าใช้ inhibitor จะทำให้ protein ใน signaling pathway แสดงออกได้เพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าจะ cells จะถูก treat ด้วย CRE-

Ter ก็ตาม ซึ่งผลการใช้ inhibitor ตามภาพที่ 6 กราฟ C มีการแสดงออกของ p-NF-kB-p65 มากขึ้น เมื่อเทียบกับกราฟ B ที่ไม่ได้ใช้ inhibitor

การทดลองที่ 6 แสดงผลการยับยั้ง oxidative stress (ROS) ของ CRE-Ter dose dependent

จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดต่างๆ สามารถยับยั้ง oxidative stress ที่อยู่ใน cells ซึ่ง oxidative stress เป็น first signal จากนั้นจะส่ง signal ต่อไปยัง protein signaling pathways ต่างๆ เพื่อจะกระตุ้นการแสดงออกของยีนรวมถึง miR-21 ของการศึกษาครั้งนี้

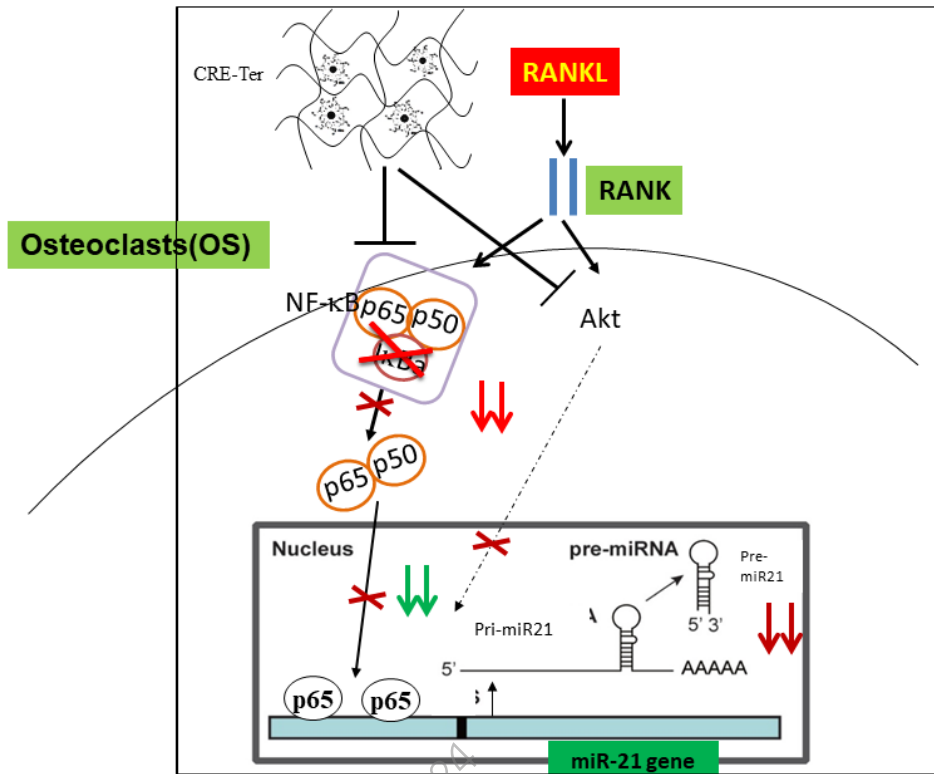


รูปที่ 7 ผลการศึกษา แสดงว่า CRE-Ter dose dependent สามารถยับยั้ง oxidative stress (ROS) ใน osteoclasts ได้ (*P-value < 0.05) โดย OS คือ osteoclasts (control) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

ROS เป็น first signal ในเซลล์ ซึ่งสามารถส่งต่อ signal นี้ไปกระตุ้น signaling pathways ต่อไป จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า CRE-Ter dose dependent สามารถยับยั้ง ROS ที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งสามารถอธิบายต่อว่าทำไม CRE-Ter จึงสามารถยับยั้ง signaling pathways ต่อๆ ไปได้

สรุปผลการศึกษาโดยภาพรวมทั้งหมด



ผลการศึกษา สรุปว่า CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออกของ miR-21 ผ่าน Akt-NF-κB signaling pathway ซึ่งเป็น de novo mechanism และตีพิมพ์ได้ในวารสารนานาชาติ Pengjam Y, Prajantasen T, Tonwong N, Panichayupakaranant P Downregulation of miR-21 gene expression by CRE-Ter to modulate osteoclastogenesis: De Novo mechanism. Biochem Biophys Res Commun. 2021; 513:101002. (First and Corresponding author) ซึ่งผลงานนี้ทำให้นักวิจัยหลัก ได้รับรางวัลคุณค่าสงขลานครินทร์ ประเภท **นักวิจัยที่ค้นพบสิ่งใหม่ของโลกหรือสิ่งมีชีวิตใหม่ของโลก (Novel Finding)** ประจำปี 2564 รหัสรางวัล 640100001 เข้ารับรางวัลในวันที่ 13 มีนาคม 2565 (online)

ค. การศึกษาเกี่ยวกับการด้านการทำลายเซลล์กระดูกของสารสกัด โดยทำให้สาร curcuminoid มีความเสถียรมากขึ้นด้วย liposome

บททวนวรรณกรรม

จากการศึกษาที่ผ่านมาเบื้องต้นจากการที่ได้รับทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรมทางการแพทย์ (medical hub) ในปี 2561-2562 รหัสทุน RDG6150075 ทางคณะผู้วิจัยพบว่ากลุ่มสารสกัดเคอร์คูมินอยด์ที่ได้จากคิดค้นกรรมวิธีการเตรียมสารสกัดรูปแบบใหม่ มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ที่ทำหน้าที่สลายเนื้อกระดูก (osteoclasts) เมื่อทดลองวิจัยในห้องทดลอง (cell culture base) โดยสารสกัดเคอร์คูมินอยด์มีความเสถียรน้อยเมื่อเข้าไปในร่างกาย หรือขณะทำการทดลอง เพื่อเพิ่มความเสถียรจึงได้นำ liposome มาห่อหุ้มสารสกัดเคอร์คูมินอยด์ชนิด CRE-Ter และเพื่อเป็นการต่อยอดการทดลองที่ผ่านมา ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจการเลี้ยงเซลล์ผ่านตัวกลางที่มีความคล้ายคลึงกับกระดูก ซึ่งเรียกว่า bone tissue engineering scaffolds ซึ่งผลิตโดยกลุ่มวิจัยของ รศ.ดร.วราภรณ์ ตันรัตนกุล และคณะ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้รับทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559-2560 รหัสโครงการ SCI5901465 เรื่องการเตรียมและสมบัติของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพเตรียมจาก Polylactic acid, โคลโตซาน ผสมกับอนุภาคซีลี้อย โดยจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า เซลล์กระดูก osteoblasts ชนิด MG-63 cells สามารถเจริญเติบโตใน bone tissue engineering scaffolds ที่ผลิตขึ้นได้ โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ที่สังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการผลิตจาก Polylactic acid (PLA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า bone tissue engineering scaffolds ชนิดนี้น่าจะนำไปใช้เพื่อเป็นกระดูกจำลองในการเลี้ยงเซลล์ osteoclasts และใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาของสารสกัด เคอร์คูมินอยด์ที่ห่อหุ้มด้วย liposome เพื่อเพิ่มความเสถียรของสารสกัด ต่อการยับยั้งเซลล์ที่ทำหน้าที่สลายเนื้อกระดูก (osteoclasts)

ดังนั้นการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นการร่วมมือกันระหว่างนักวิจัยของคณะเทคนิคการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเคอร์คูมินอยด์ที่เพิ่มการละลายน้ำ ที่ห่อหุ้มโดย liposome ทำให้มีความเสถียรมากขึ้น ต่อการยับยั้งเซลล์ที่ทำหน้าที่สลายเนื้อกระดูก โดยใช้วัสดุสังเคราะห์ bone tissue engineering scaffolds ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับกระดูกของมนุษย์เป็นแบบจำลอง (model) เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในการศึกษาต่อยอดทางคลินิก และสำหรับการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุนต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัด curcuminoids จากขมิ้นชัน

เตรียมสารสกัด curcuminoids CRE-Ter ตามกรรมวิธีที่ระบุในคำขอสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร (คำขอสิทธิบัตร เลขที่ 1701001846, 31 มีนาคม 2560 และ คำขออนุสิทธิบัตรเลขที่ 1703001404, 2 สิงหาคม 2560) โดย รศ.ดร. ภาควิชา ภาณัชชูปการนันท์ และคณะ จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การเตรียม bone tissue engineering scaffolds

เตรียม bone tissue engineering scaffolds ด้วยการใช้น้ำ Polylactic acid ตามวิธีการในโครงการวิจัย เรื่องการเตรียมและสมบัติของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพเตรียมจากวัสดุผสม Polylactic acid ที่ไม่เติมโคลโตซานและซีลี้อย โดย รศ.ดร. วราภรณ์ ตันรัตนกุล ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์

เปรียบเทียบกับ gelatin cryogel ตามเอกสารอ้างอิง ซึ่งอาจารย์ที่ปรึกษาวิจัยหลักเคยใช้ขณะเรียนปริญญาเอกที่ญี่ปุ่นในปีพ.ศ. 2559 (37)

3. การศึกษาผลของสารสกัด Liposomal CRE-Ter ต่อการยับยั้งการกักตรอนเซลล์กระดูกผ่าน bone tissue engineering scaffolds

1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

RANKL ที่ซื้อจากบริษัท R&D ประเทศไทย, DMEM cell culture medium ที่ซื้อจากบริษัท Gibco ประเทศไทย, Leukocytes acid phosphatase activity kit ที่ซื้อจากบริษัท sigma ประเทศไทย, anti-NF- KB -p65, anti-p.NF- KB -p65, anti- $\text{IKB}\alpha$, anti-p. $\text{IKB}\alpha$, และ Anti β -actin ที่ซื้อจากบริษัท cell signalling, น้ำยาและสารเคมีอื่นๆ ที่ซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศไทย, บริษัท อีระเทรคดิง และบริษัท Gilbthai จำกัด

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน bone tissue engineering scaffolds

นำ RAW 264.7 cells (ได้จาก ATCC cell lines ประเทศไทย) มาเลี้ยงใน DMEM cell culture medium ที่มี bone tissue engineering scaffolds ขนาดกว้าง 1 ยาว 1 เซนติเมตร และหนา 0.25 เซนติเมตร โดยมีส่วนผสมของ 10% FBS, 2 mM glutamin, 100 U/mL penicillin G และ 100 μg /streptomycin และ anti-bacterial cocktail (PNS) ใน incubator ที่มี 5% CO_2 ที่ 37°C ในกรณีต้องการเปลี่ยน RAW 264.7 cells ให้กลายเป็น osteoclasts ต้องเติม 20 ng/mL RANKL และเลี้ยงเซลล์นาน 5 วัน (38)

3. การตรวจการสร้าง TRAP enzymes ของ osteoclast โดย TRAP assays

ปรับ RAW 264.7 cells ให้มีความเข้มข้น 3×10^3 cells/mL ใน 6 well plate ที่มี bone tissue engineering scaffolds ผสมเซลล์กับสารสกัด curcuminoids ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/mL RANKL เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจการสร้าง leukocyte acid phosphatase ของ osteoclasts โดยใช้ TRAP staining reagent kit

4. การตรวจการสร้าง cathepsin K ของ osteoclasts โดยวิธี RT-PCR

ผสม RAW 264.7 cells กับสารสกัด curcuminoids ใน 6 well plate ที่มี bone tissue engineering scaffolds ในความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/mL RANKL เป็นเวลา 5 วัน สกัด RNA โดยใช้ QAIGEN reagent kit จากนั้นเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ ReverTraAce qPCR reagent kit และใช้ primer ที่จำเพาะยีน cathepsin K เหล่านี้เพื่อทำ PCR

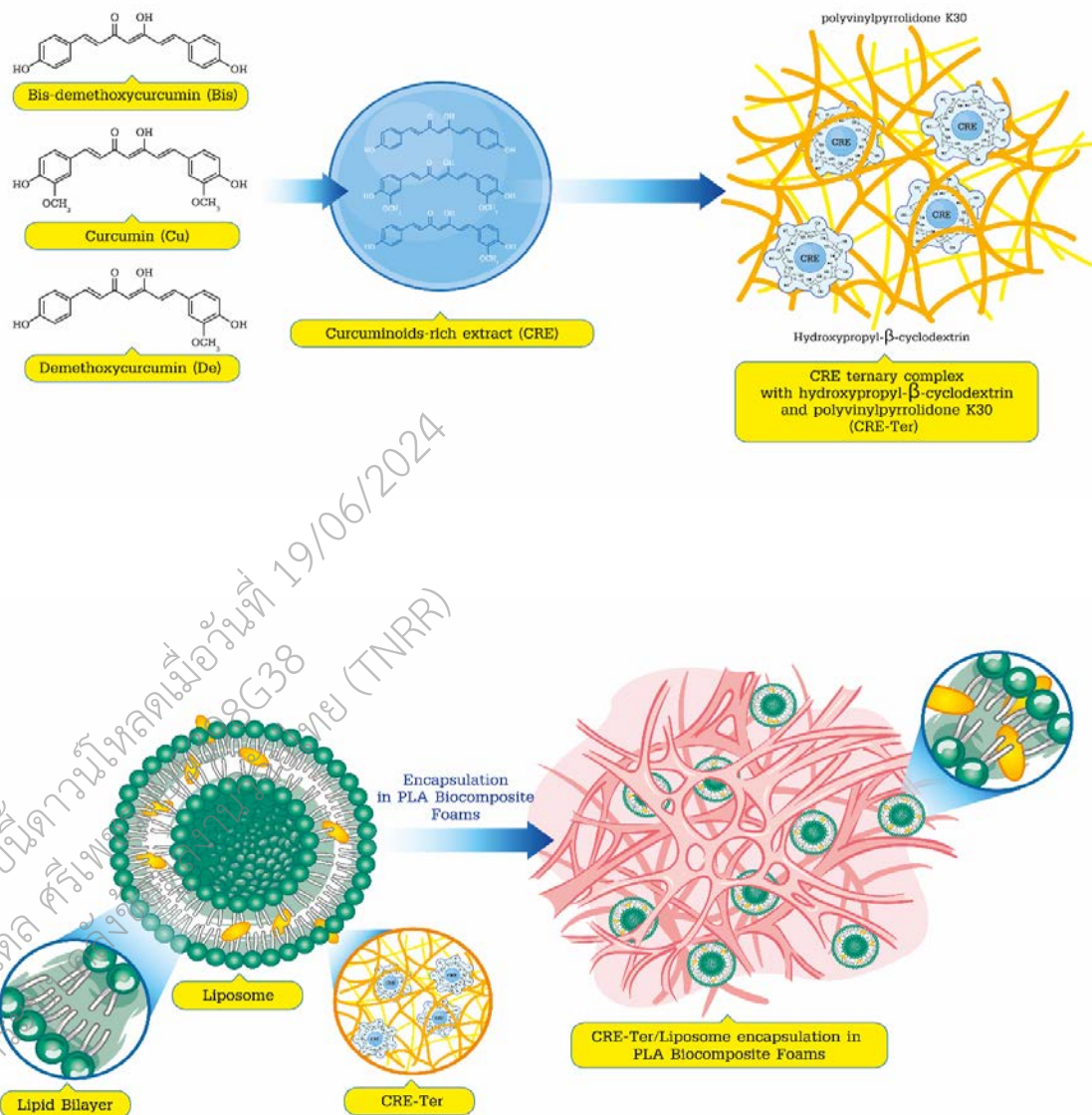
5. การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี western blotting

ผสม RAW 264.7 cells กับสารสกัด curcuminoids ใน 6 well plate ที่มี bone tissue engineering scaffolds ที่มี ความเข้มข้นต่างๆ และเติม 20 ng/mL RANKL เป็นเวลา 5 วัน สกัดโปรตีน โดยใช้ RIPA buffer จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ที่มี 2-mercaptoethanol ทำการต้มสารละลายโปรตีนที่ 95°C นาน 5 นาที แล้วนำมาแยกใน 10% polyacrylamide gel ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนที่อยู่ใน gel ลงใน PVDF membrane หลังจากทำการ block nonspecific binding ด้วย non-fat milk in TBST (TBS และ 0.1% Tween 20) จากนั้น incubate membranes ใน specific antibody แต่ละชนิดซึ่งได้แก่ anti-NF- KB -p65, anti-p.NF- KB -p65, anti- $\text{IKB}\alpha$, anti-p. $\text{IKB}\alpha$, anti-cathepsin K และ anti β -actin ที่ซื้อจากบริษัท cell signalling ประเทศไทย จากนั้น incubate ใน secondary antibody ที่ conjugate ด้วย horseradish peroxidase จากนั้นตรวจสอบผลโดยใช้ digital imaging system

6. Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบ mean \pm SD จากนั้นเปรียบเทียบค่าต่างๆ โดยใช้ one-way ANOVA with student T-test ที่ทำซ้ำ 3 การทดลอง โดยค่า statistical significance คือ $p < 0.05$

คณะผู้วิจัยได้ใช้สารเคอคูมินอยด์ชนิด CRE-Ter ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำสูง และมีประสิทธิภาพที่สุด encapsulate เข้าไปใน liposome โดยมีหลักการคิดว่า liposome จำทำให้ CRE-Ter มีความเสถียรเมื่อเข้าไปในร่างกายมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ดังรูปที่ 1

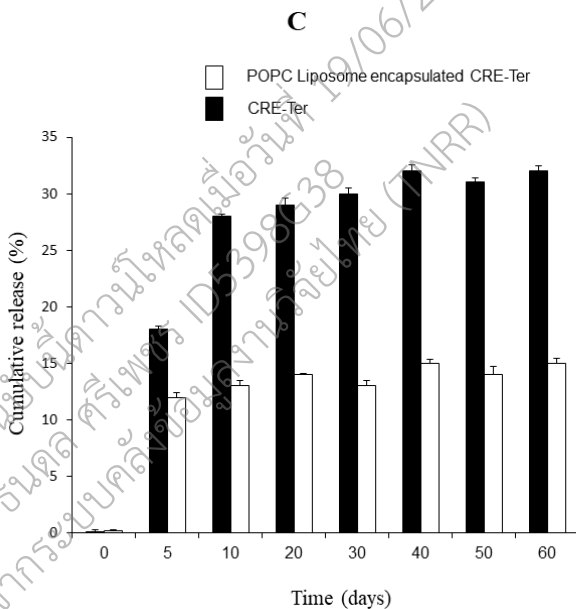
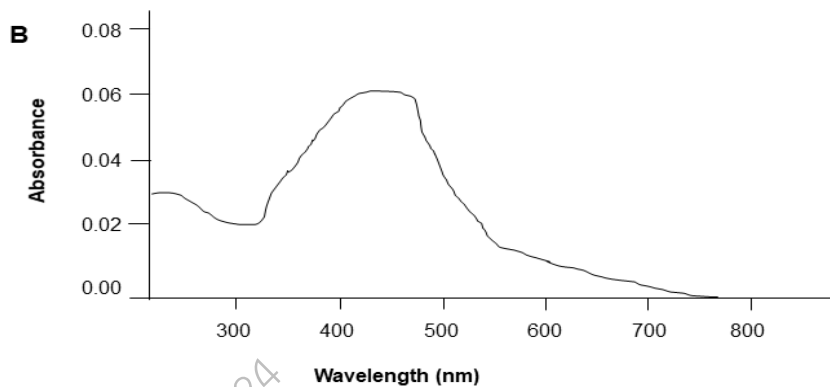


รูปที่ 1 แสดงภาพการ encapsulation ของ CRE-Ter ใน liposome

การทดลองที่ 1 คุณสมบัติของ liposome และการ encapsulation liposome ด้วย CRE-Ter

คณะผู้วิจัยเลือกใช้ liposome ชนิด POPC liposome มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยได้ศึกษาคุณสมบัติของ liposome เช่น dimension, polydispersity และ Z-potential ของ POPC liposome และ POPC liposome ที่ encapsulate ด้วย CRE-Ter แสดงผลดังรูป A และ B ข้างล่าง จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ใช้ scaffolds (PLA foams) เพื่อจำลองว่า PLA foams จะมีคุณสมบัติคล้าย bone artificial จากนั้นศึกษาการ release ของ encapsulated liposome CRE-Ter เทียบกับ CRE-Ter ปกติ ผ่าน scaffolds (PLA foams) แสดงดังรูป C และ D

A	Systems	Dimension/nm	Polydispersity	Z-potential/mV
	POPC liposomes	330.0 ± 15.2	0.42 ± 0.01	- 24.38 ± 0.81
	CRE-Ter POPC liposomes	386.6 ± 26.2	0.42 ± 0.01	- 30.55 ± 1.62



D

Samples	Seeding efficiency (%)
PLA foams	55.22 ± 1.45
PLA foams with POPC Liposome	63.55 ± 1.99

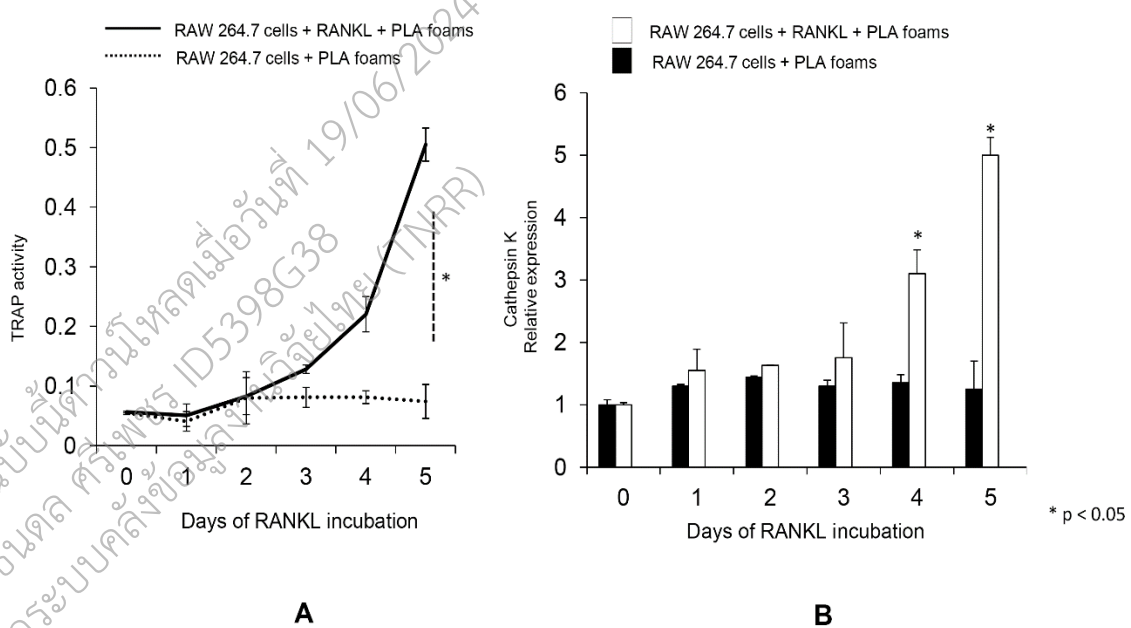
รูปที่ 2 แสดงคุณสมบัติของ liposome และการ encapsulation liposome ด้วย CRE-Ter (A และ B) และแสดงผลการ release ของ encapsulated liposome CRE-Ter เมื่อนำมาเลี้ยงใน scaffolds (PLA foams) C และ D โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือก liposome ชนิด POPC liposome ซึ่งมีรายงานมาก่อนว่าสามารถให้ความเสถียรต่อ curcumin ดังนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาความเสถียรของ liposome ที่มี CRE-Ter พบว่ามีความเสถียรสูง โดยได้ศึกษาคุณสมบัติของ liposome เช่น dimension, polydispersity และ Z-potential ของ POPC liposome และ POPC liposome ที่ encapsulate ด้วย CRE-Ter และศึกษาการ release ของ encapsulated liposome CRE-Ter เมื่อนำมาเลี้ยงใน scaffolds (PLA foams) ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจก่อนนำไปศึกษาผลของ POPC liposome ที่ encapsulate ด้วย CRE-Ter ต่อการยับยั้งการสร้าง osteoclast ผ่าน scaffolds (PLA foams)

การทดลองที่ 2 แสดงผลการ osteoclasts ต่อการแสดงออกของ TRAP และ Cathepsin K ใน scaffolds (PLA foams)

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ osteoclast markers คือ TRAP และ cathepsin K ผ่าน ใช้ scaffolds (PLA foams) ของ osteoclasts (induced RAW 264.7 cells ด้วย RANKL)



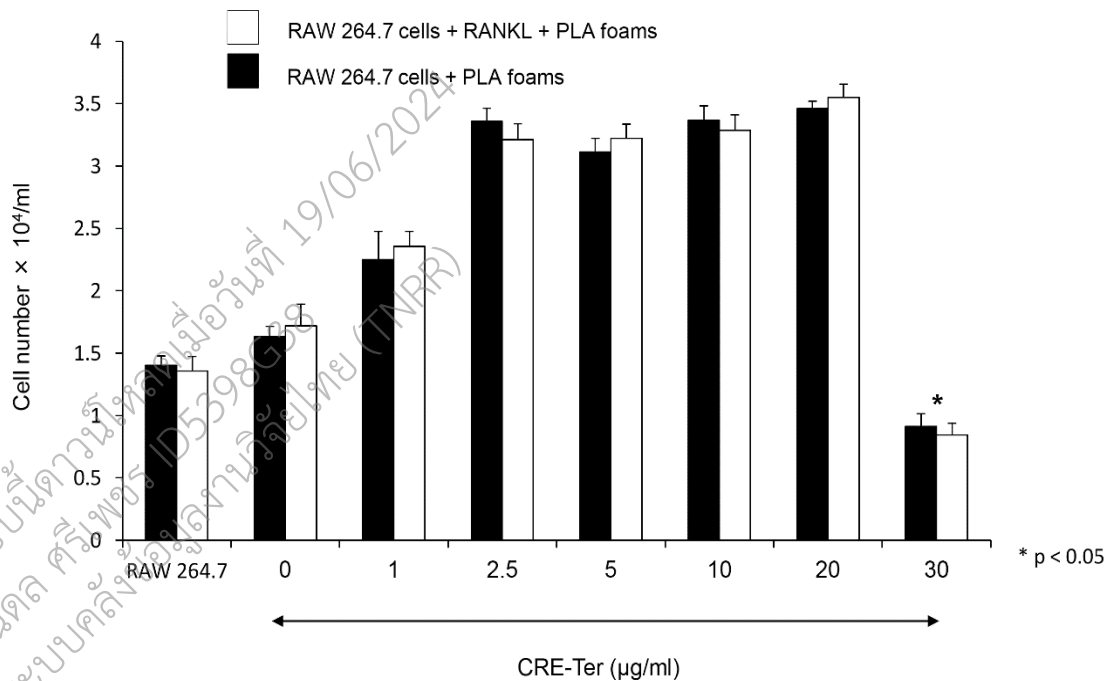
รูปที่ 3 แสดงว่า osteoclasts สามารถเจริญเติบโตใน scaffolds (PLA foams) ได้ปกติโดยวัด TRAP activity และ Cathepsin K (*P-value < 0.05) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ osteoclast markers คือ TRAP และ cathepsin K ผ่าน ใช้ scaffolds (PLA foams) ของ osteoclasts (induced RAW 264.7 cells ด้วย RANKL) โดย POPC liposome พบว่าสามารถ สร้าง osteoclasts ได้เพราะมีการแสดงออกของ osteoclast marker ทั้ง TRAP และ cathepsin K มากขึ้น

การทดลองที่ 3 แสดง cell viability ของ osteoclasts เมื่อเติม encapsulation liposome ด้วย CRE-Ter และเลี้ยงเซลล์ใน scaffolds (PLA foams)

คณะผู้วิจัยได้ ศึกษา cell viability ของ osteoclasts เมื่อเติม encapsulation liposome ด้วย CRE-Ter และเลี้ยงเซลล์ใน scaffolds (PLA foams) พบว่าปริมาณ encapsulation liposome CRE-Ter ที่ไม่ทำให้เซลล์ ผิดปกติคือ 20 $\mu\text{g/ml}$



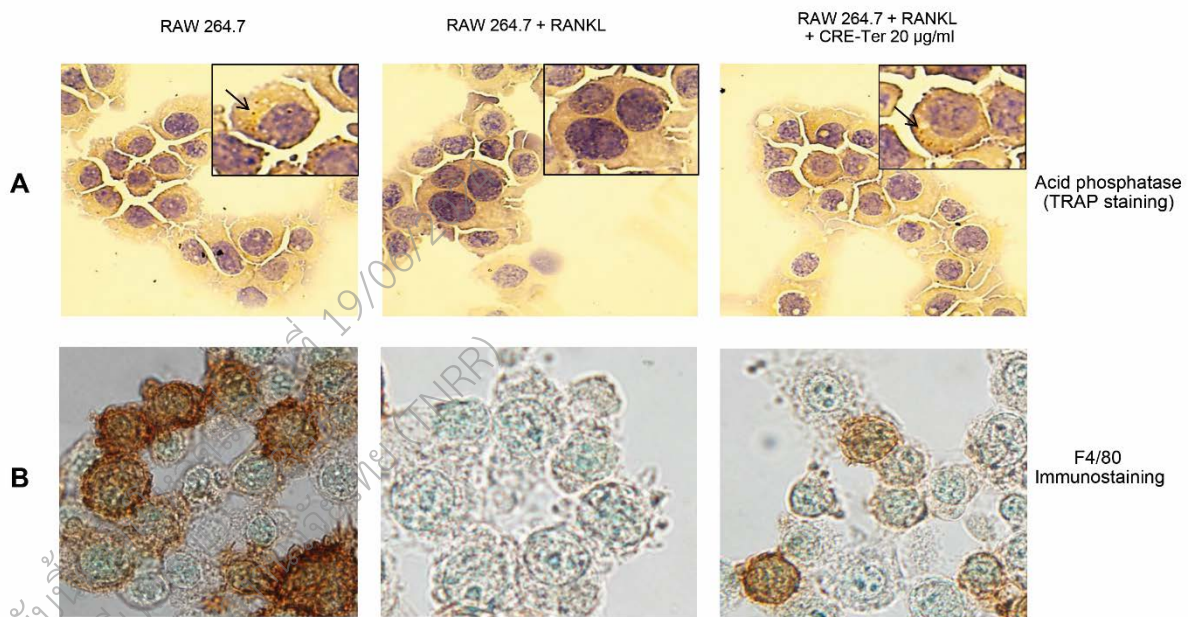
รูปที่ 4 แสดง cell viability ของ encapsulation liposome CRE-Ter ที่เลี้ยงผ่าน scaffolds (PLA foams) (*P-value < 0.05) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

ผลของ cell viability ของ osteoclasts เมื่อเติม encapsulation liposome ด้วย CRE-Ter และเลี้ยงเซลล์ใน scaffolds (PLA foams) พบว่าปริมาณ encapsulation liposome CRE-Ter ที่ไม่ทำให้เซลล์ผิดปกติคือ 20 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้สามารถใช้ความเข้มข้นที่ 20 $\mu\text{g/ml}$ ไปใช้เพื่อทดลองต่อไป

การทดลองที่ 4 การศึกษา TRAP staining และ F4/80 marker

คณะผู้วิจัยศึกษา encapsulation liposome CRE-Ter ต่อการสร้าง osteoclasts (induced RAW 264.7 cells ด้วย RANKL) ผลการศึกษาพบว่า encapsulation liposome CRE-Ter (20 $\mu\text{g/ml}$) สามารถ inhibit multinucleated cells ของ osteoclast ได้ (A) และ ศึกษา F4/80 ซึ่งเป็น marker ของ RAW 264.7 cells พบว่า encapsulation liposome CRE-Ter (20 $\mu\text{g/ml}$) สามารถ induce การสร้าง F4/80 marker ใน osteoclasts มากขึ้น (B)



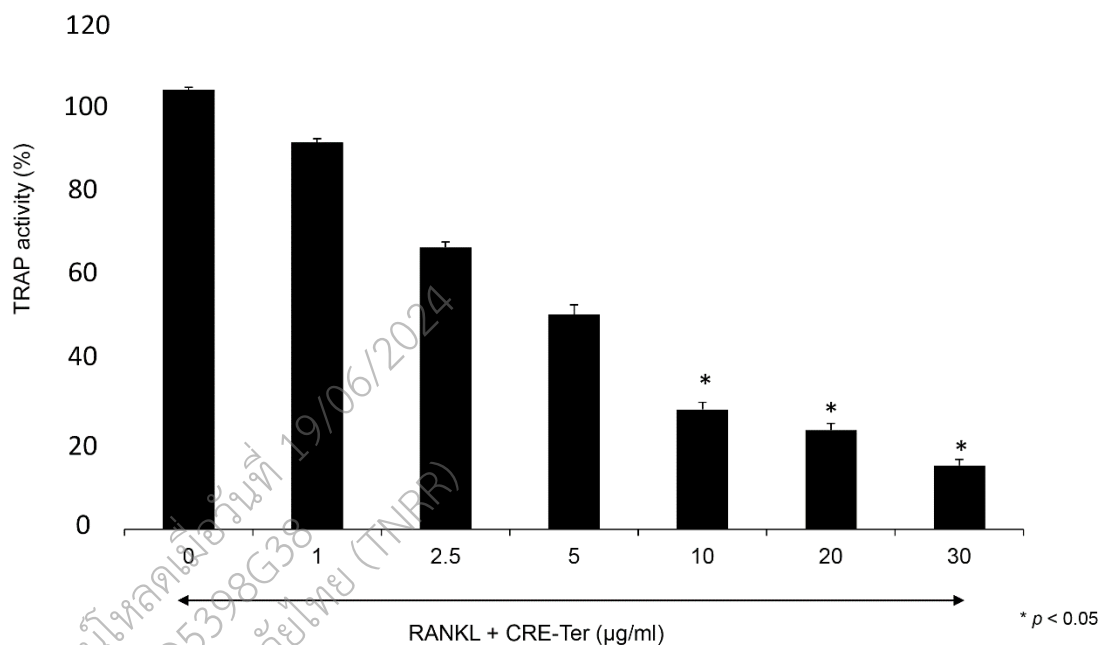
รูปที่ 5 แสดงผลของ TRAP staining (A) และ F4/80 marker (B) ต่อ encapsulation liposome CRE-Ter (20 $\mu\text{g/ml}$) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การทดลองแสดงให้เห็นว่า encapsulation liposome CRE-Ter สามารถยับยั้งการสร้าง osteoclasts ได้ ซึ่งแสดงโดยการวัดปริมาณ cells ที่มีนิวเคลียสตั้งแต่ 2 นิวเคลียสขึ้นไป และเพิ่ม cells ที่สามารถแสดงออก F4/80 ซึ่งเป็น marker ของ monocytes

การทดลองที่ 5 ผลการศึกษา TRAP activity

นอกจาก TRAP staining แล้ว คณะวิจัยยังได้ศึกษา TRAP activity เมื่อเติมสารสกัด encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent



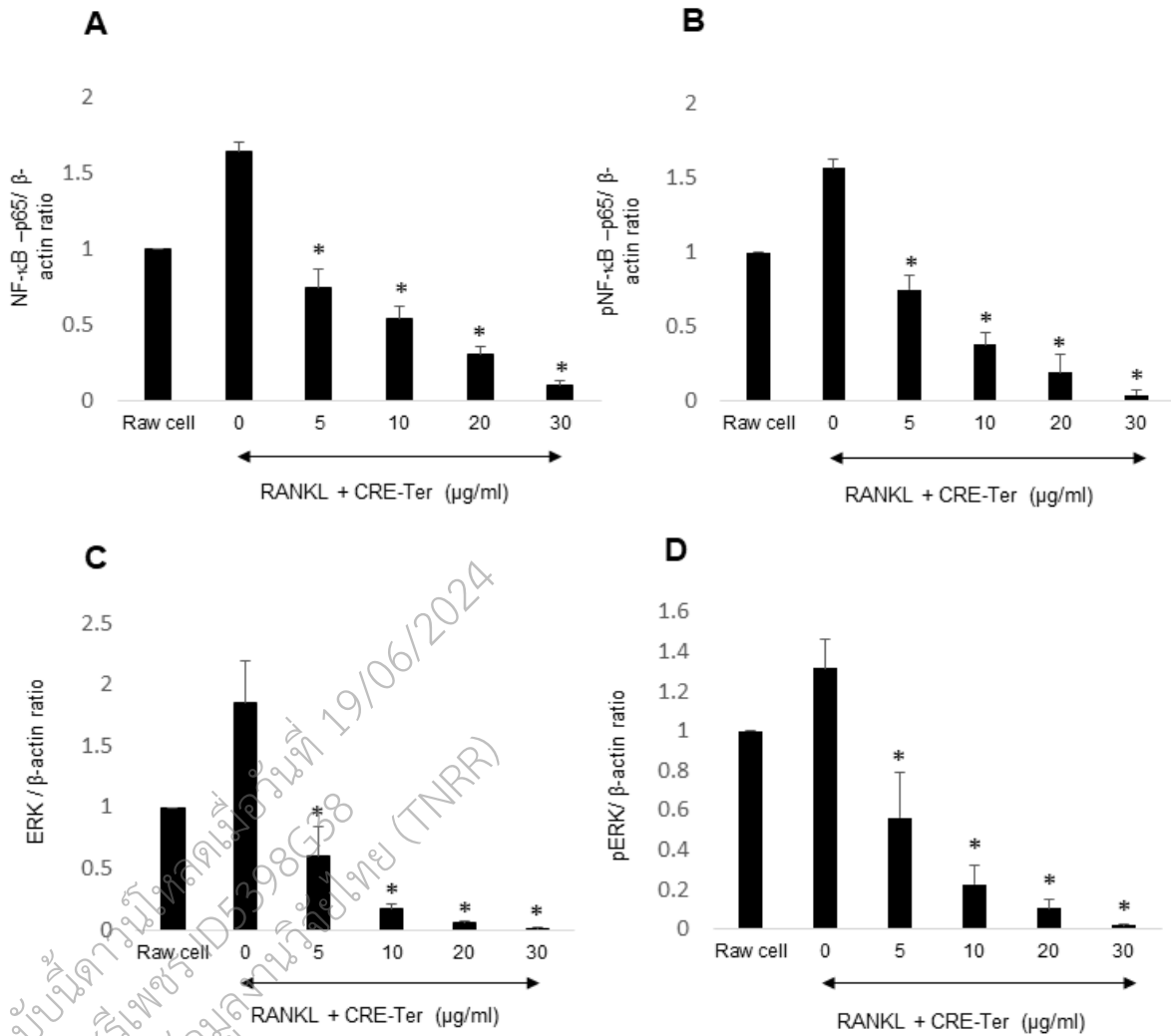
รูปที่ 7 แสดงผลของ encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถ inhibit TRAP activity ของ osteoclasts ได้ (*P-value < 0.05) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

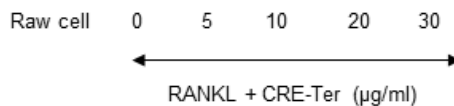
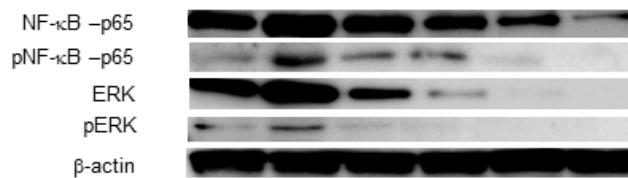
คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ osteoclast markers คือ TRAP activity scaffolds (PLA foams) ของ encapsulation liposome CRE-Ter พบว่า encapsulation liposome CRE-Ter สามารถยับยั้งการสร้าง TRAP ได้

การทดลองที่ 6 การศึกษา signaling pathways

Signaling pathways ที่สำคัญต่อการสร้าง osteoclasts คือ NF- κ B และ ERK signaling pathways คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของ encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent ต่อ NF- κ B และ ERK signaling pathways พบผลดังรูป A, B, C และ D



* p < 0.05



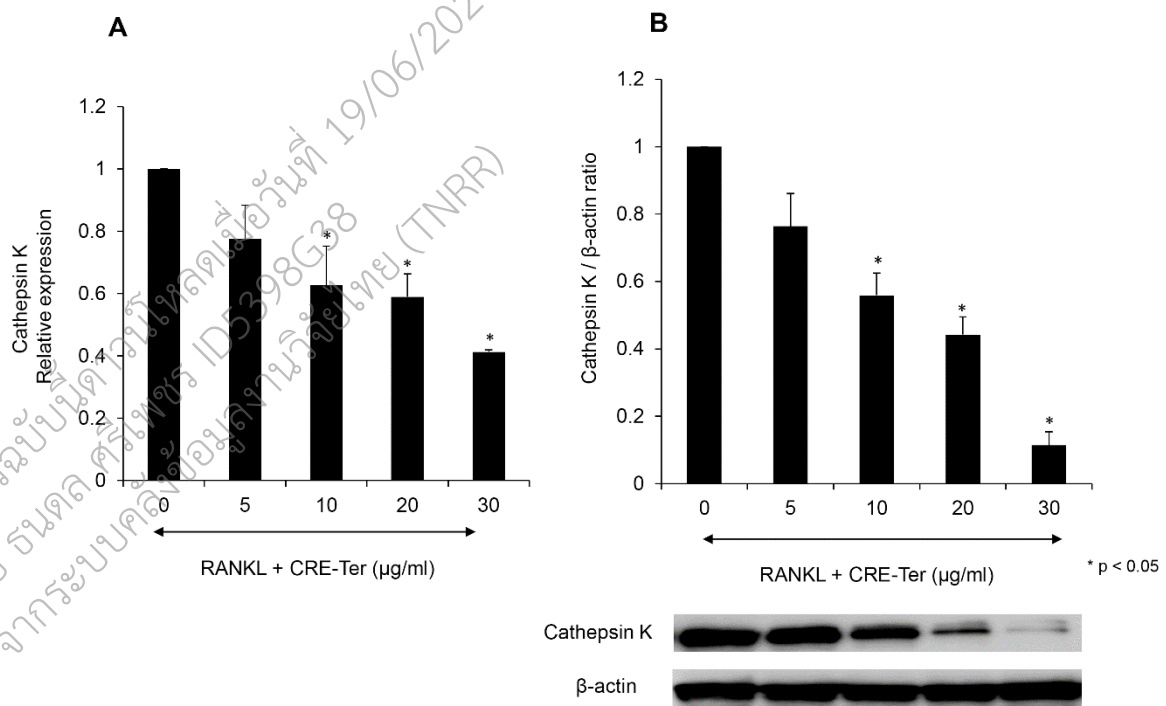
รูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่า encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนใน NF- κ B และ ERK signaling pathways (A, B, C และ D) (*P-value < 0.05) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า encapsulation liposome CRE-Ter สามารถยับยั้งการแสดงออก ERK และ NF- κ B signaling pathways ของ osteoclasts เนื่องจากการทดลองนี้แสดงเฉพาะโปรตีนของ NF- κ B บางตัวเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาอย่างละเอียดพบว่าใน signaling pathway นี้ประกอบด้วยโปรตีนหลายตัว การศึกษาเพิ่มขึ้นจะทำให้มั่นใจในผลการทดลองในครั้งนี้น่ามากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลการรายงานมาก่อนว่า encapsulation liposome CRE-Ter สามารถยับยั้งผ่านทั้งสอง signaling pathways

การทดลองที่ 7 การศึกษาการแสดงออกของ Cathepsin K

Cathepsin K เป็นอีก osteoclast marker ดังนั้นคณะผู้วิจัย ได้ศึกษาผลของ encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent ต่อการแสดงออกของ Cathepsin K



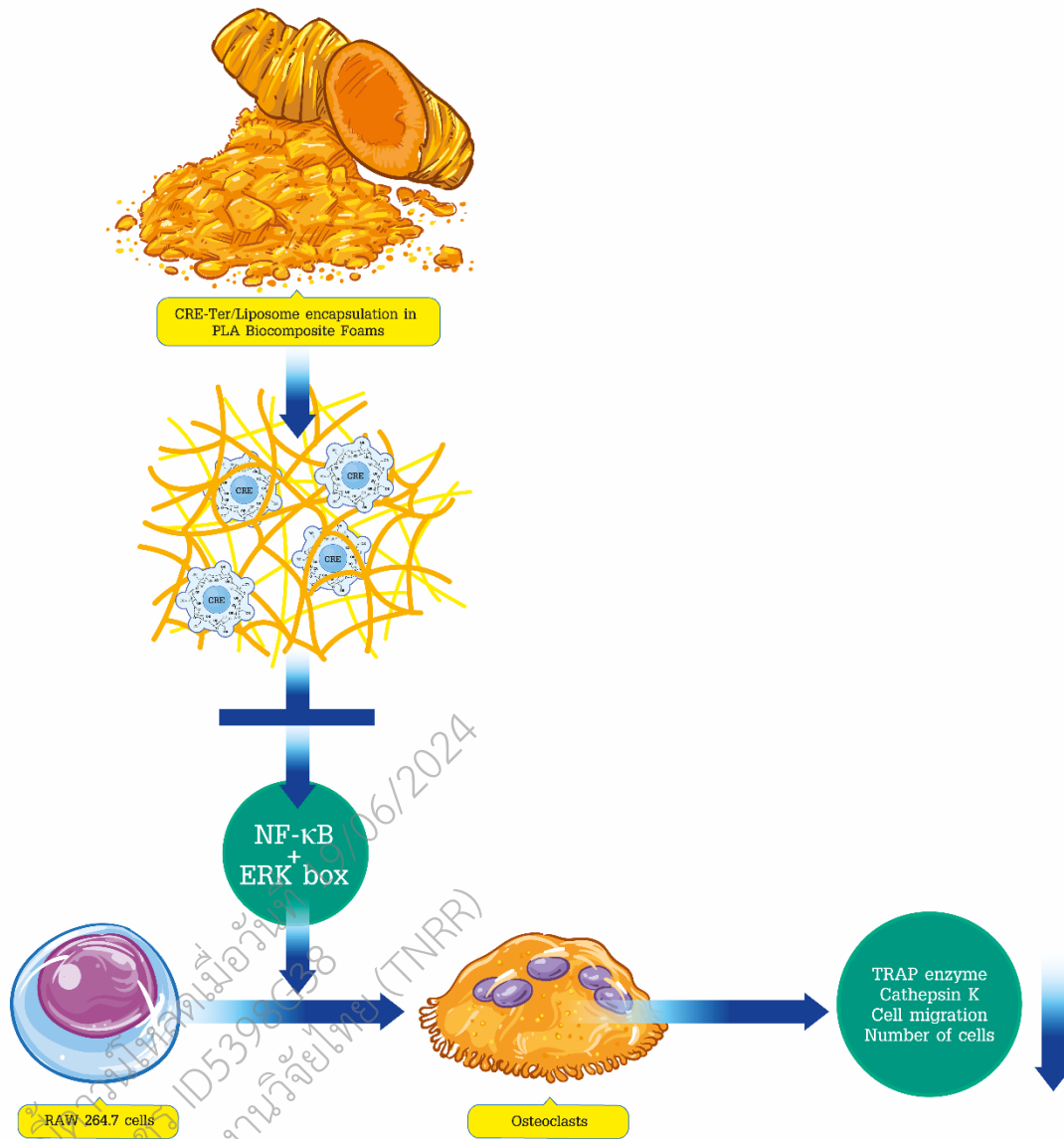
รูปที่ 9 แสดงผลของ encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ Cathepsin K (A และ B) (*P-value < 0.05) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาแสดงว่า encapsulation liposome CRE-Ter แบบ dose dependent สามารถยับยั้งการแสดงออกของ cathepsin K ซึ่งเป็น osteoclast marker ทั้งโปรตีนและอาร์เอ็นเอ อย่างไรก็ตามยังคงมี osteoclast marker อื่นๆ เช่น c-Fos ถ้าสามารถศึกษาได้จะยืนยันผลการทดลองนี้ได้

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการทบทวนเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

สรุปผลการศึกษาโดยภาพรวม



รูปที่ 10 ผลการศึกษาสรุปว่า encapsulation liposome CRE-Ter ที่เลี้ยงผ่าน scaffolds สามารถยับยั้งการสร้าง osteoclasts โดยผ่าน NF- κ B และ ERK signaling pathways ทำให้ osteoclast marker ซึ่งได้แก่ TRAP, Cathepsin K ลดลง และผลงานวิจัยนี้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Pengjam Y, Panichayupakaranant P, Tanrattanakul V. Curcuminoid (CRE-Ter)/Liposome as delivery platform for anti-osteoclastogenesis via NF- κ B/ERK pathways in RANKL-induced RAW 264.7 cells through PLA foams. Heliyon. 2021 Aug 18;7(9): e07823. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021.e07823. (First and Corresponding author)

5.4 เอกสารอ้างอิง

1. Deschaseaux, F., et al. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol. Med*, 2009. 15: p.417- 429.
2. Nevitt, M, C., et al. The association of radiographically detected vertebral fractures with back pain and function: a prospective study. *Ann Intern Med*, 1998. 128: p.793 - 800.
3. Kado, D, M., et al. For the Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Vertebral fractures and mortality in older women; a prospective study. *Arch Intern Med*, 1999. 159: p.1215-1220.
4. Khosla, S., et al. American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: p.1479-1491.
5. Shane, E., et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for bone and mineral Research. *J Bone Miner Res*, 2014. 29: p.1-23.
6. Camisasca, M., et al. Parenteral calcitonin for metabolic bone disease associated with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 1994. 20(3): p.633-7.
7. Baby, C., et al. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *J Adv Pharm Technol Res*, 2013. 4(1): p. 4–8.
8. Tae-Hun, K., et al. Herbal Medicines for Parkinson's disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE*. 2012. 7(5): p. e35695.
9. Simin, Z., et al. Acupuncture plus Herbal Medicine for Alzheimer's disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Chin. Med*, 2017. 45: p. 1327.
10. Mizutani, K., et al. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1998. 253: p.859-863.
11. Chen, K. M., et al. Icaritin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. *Pharmazie*, 2005. 60: p 939-942.
12. Yonezawa, T., et al. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2011. 409: p.260-265.
13. Sugimoto, E., & Yamaguchi, M. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int. J. Mol. Med*, 2000. 5: p. 515-520.
14. Pengjam. Y., et al. Anthraquinone Glycoside Aloin Induces Osteogenic Initiation of MC3T3-E1 Cells: Involvement of MAPK Mediated Wnt and Bmp Signaling. *Biomol Ther*, 2016. 24(2): p.123-131.

15. Yoshiki, M., et al. Potential anti-osteoporotic effects of herbal extracts on osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, p.14-29.
16. Pengjam, Y., et al. NF- κ B pathway inhibition by anthrocylic glycoside aloin is key event in preventing osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Phytomedicine*, 2016, 23: p. 417-428.
17. Yallapu, M.M., et al. Curcumin nanomedicine: a road to cancer therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, 2013. 19(11): p. 1994-2010.
18. Gryniewicz, G., & Slifirski, P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochimica Polonica*, 2012. 59(2): p.201-212.
19. Esatbeyoglu, T., et al. Curcumin – from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2012. 51(22): p.5308-5332.
20. Dhillon, N., et al. (2008). Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 2008. 14 (14): p. 4491-4499.
21. Kunnumakkara, A.B., et al. Curcumin sensitizes human colorectal cancer xenografts in nude mice to gamma-radiation by targeting nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Clinical Cancer Research*, 2008. 14 (7): p. 2128-2136.
22. Weir, N.M., et al. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. *Cancer Biology & Therapy*, 2007. 6(2): p.178-184.
23. Woo, J.H., et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis*, 2003 24(7): p.1199-1208.
24. Dae-Chul, C., et al. Therapeutic Advantages of Treatment of High-Dose Curcumin in the Ovariectomized Rat. *J Korean Neurosurg Soc*, 2013. 54: p.461-466.
25. Riva, A., et al. Effects of a curcumin-based supplementation in asymptomatic subjects with low bone density: a preliminary 24-week supplement study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. 21 (7): p.1684-1689.
26. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. 3(suppl 3); p s131-s139.
27. Florencio - silva, R., et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: 421746.
28. Baron, R., and Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatment. *Nat. Med*, 2013. 19: p. 179-192.
29. Caetano-Lopes, J., et. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol*, 2007. 32(2): p.103-110.
30. Klein- Nulend, J., et al. Osteocyte and bone structure. *Curr Osteoporos Rep*, 2003. 1(1): p.5-10.
31. Boyle, W.J., et al. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423: p. 337-342.

32. De la Rica, L., et al. PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome Biol*, 2013.14(9): R99.
33. Jung Ha, K., & Nacksung, K. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab*, 2014. 21(4): p. 233-241.
34. Viquet – Carrin S., et al. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 2006.17(3): p.319-336.
35. Morinobu, M., et al. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*, 2003.18(9): p.1706-15
36. Lumachi, F., et al. Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2009.1173 Suppl 1: E60-3.
37. Zipkin, I. The Inorganic Composition of Bones and Teeth. *Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects* p. 69-103.
38. Wood, M.A., et al. Correlating cell morphology and osteoid mineralization relative to strain profile for bone tissue engineering applications. *J R Soc Interface*, 2008. 5(25): p. 899-907.
39. Vali, B., et al. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J. Nutr. Biochem*, 2007.18: p. 341-347.
40. Yang, M.W., et al. Curcumin improves bone microarchitecture and enhances mineral density in APP/PS1 transgenic mice. *Phytomedicine*, 2011. 15; 18(2-3): p.205-213.
41. Li, C., et al. Curcumin improves bone microarchitecture in glucocorticoid-induced secondary osteoporosis mice through the activation of microRNA-365 via regulating MMP-9. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015; 8(12): p. 15684-15695.
42. Chen, Z., et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway. *INT. J. MOL. MED*, 2016. 37: p. 329-338.
43. Hu, S.C., et al. Artocarpin Induces Apoptosis in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma HSC-1 Cells and Its Cytotoxic Activity Is Dependent on Protein-Nutrient Concentration. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2015;2015:236-159.
44. Garcia-Nino WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological research*. 2015;97: p. 84-103.
45. Cruz-Jentoft, A.J., et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing*. 2010;39(4): p. 412-423.
46. Chen, L.K., et al. Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian Working Group for Sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2014;15(2): p.95-101.
47. Septama, A.W., et al. In vitro Immunomodulatory Effect of Lawsone Methyl Ether on Innate Immune Response of Human Phagocytes. *Journal of Young Pharmacists*. 2018;11(1): p. 62-66.

48. Bundeasomchok, K., et al.. Extraction of α -mangostin from *Garcinia mangostana* L. using alternative solvents: Computational predictive and experimental studies. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;65: p. 297-303.
49. I. J. The epidemiology of sarcopenia. *ClinGeriatr Med*. 2011;27(3): p. 355-63.
50. von Haehling, S., et al. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachex Sarcopenia Muscle*. 2010;1(2): p. 129-33.
51. Gumucio, J.P.M. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine*. 2013;43(1):12-21.
52. Pongchaiyakul, C. et al. Prevalence of sarcopenia and associated factors among Thai population. *J Bone Miner Metab*. 2013;31(3): p. 346-350.
53. Shafiee, G., et al. Identification of candidate genes and proteins in aging skeletal muscle (sarcopenia) using gene expression and structural analysis. *PeerJ*. 2018;6:e5239.
54. Xia, Z., et al. Targeting Inflammation and Downstream Protein Metabolism in Sarcopenia: A Brief Up-Dated Description of Concurrent Exercise and Leucine-Based Multimodal Intervention. *Frontiers in physiology*. 2017;8: 434.
55. Egerman MA GD. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;49: p. 59–68.
56. Hanaoka, B.Y et al. Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;8: p. 448–457.
57. Rommel, C., et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology*. 2001;3:1009–13.
58. Bonaldo P SM. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*. 2013;6: p.25–39.
59. Yu, R., et al. Suppression of muscle wasting by the plant-derived compound ursolic acid in a model of chronic kidney disease. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2017;8(2): p. 327-341.
60. Sun, L.J., et al. Resveratrol attenuates skeletal muscle atrophy induced by chronic kidney disease via MuRF1 signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*; 2017;487(1): p.83-89.
61. Cho, S., et al. An herbal formula consisting of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, *Lycium chinense* Mill and *Eucommia ulmoides* Oliv alleviates disuse muscle atrophy in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2018;213: p.328- 339.
62. Diaz-Castro J, et al. *Phlebodium decumanum* is a natural supplement that ameliorates the oxidative stress and inflammatory signalling induced by strenuous exercise in adult humans. *European journal of applied physiology*. 2012;112(8): p. 3119-3128.
63. Alamdari, N., et al. Curcumin and muscle wasting: a new role for an old drug? *Nutrition*. 2009;25(2): p.125-129.
64. Moongkamdi, P., et al. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *ournal of Ethnopharmacology*. 2004;90: p. 161-166.

65. Sakagami, Y., et al. Antibacterial activity of a-mangostin against vancomycin resistant enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine*. 2005;12: p.203-208.
66. Cui. J., et al. New medicinal properties of mangostins: analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010;95: p. 166-172.
67. Nganlasom, J., et al. *Srinagarind Medical Journal*, 23, 402-407. Effects of *Centella asiatica* Linn. leaves and *Garcinia Mangostana* Linn. hull on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Srinagarind Medical Journal* 2008: 23: p. 402-407.
68. Horiba, T., et al. Alpha-mangostin promotes myoblast differentiation by modulating the gene-expression profile in C2C12 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2014;78(11): p. 1923-1929.
69. Chiang, T., et al. Chemistry and Pharmacology of Artocarpin: An Isoprenyl Flavone from *Artocarpus* Species. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2018;9(1): p. 58-63.
70. Soong, P.J.B. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem*. 2006;97: p.524-530.
71. Türk, M.S, et al. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. *Int Immunopharmacol*. 10 (2010) 177-182.
72. Espin, J.C., et al. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013: 270418.

6. ภาคผนวก

6.1 แบบสำเนาผลงานตีพิมพ์วารสารนานาชาติ

- Sani A, Hasegawa K, Yamaguchi Y, Panichayupakaranant P, **Pengjam Y**. Inhibitory effects of curcuminoids on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells. *Phytomedicine Plus* 1 (1) 2021, 100012. (Scopus) (Corresponding author)
- **Pengjam Y**, Prajantasen T, Tonwong N, Panichayupakaranant P. Downregulation of miR-21 gene expression by CRE-Ter to modulate osteoclastogenesis: De Novo mechanism. *Biochem Biophys Rep*. 2021 23; 26:101002. (Web of Science) (First and Corresponding author)
- **Pengjam Y**, Panichayupakaranant P, Tanrattanakul V. Curcuminoid (CRE-Ter)/Liposome as delivery platform for anti-osteoclastogenesis via NF- κ B/ERK pathways in RANKL-induced RAW 264.7 cells through PLA foams. *Heliyon*. 2021 Aug 18;7(9):e07823. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021.e07823. (Web of Science) (First and Corresponding author)

6.2. ผลงานวิจัยที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์

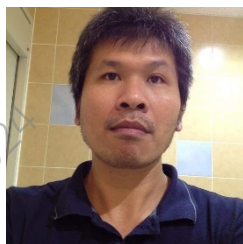
- ไม่มี

6.3 ข้อเสนอแนะสำหรับการทดลองครั้งต่อไป

เนื่องจากสาร curcuminoids ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ curcumin, bis-demethoxycurcumin, demethoxycurcumin, สารสกัด curcuminoids ที่มีสาร curcuminoids รวมไม่น้อยกว่า 85% w/w และ สารสกัด curcuminoids ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มการละลายน้ำ มีจำนวนมาก แต่งบประมาณที่ได้รับด้วยทุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund : FF) ปี 2564 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 มีปริมาณจำกัด ดังนั้นถ้าได้รับทุนต่อเนื่อง จะทำให้นักวิจัยสามารถนำสารสกัด curcuminoids มาใช้เพื่อทดลองต่อไปได้ นอกจากนี้ถ้าสามารถศึกษาต่อด้วยวิธี *in vivo* experiment จะทำให้งานมีคุณค่ามากขึ้น

6.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ

1). International Webinar on MOLECULAR & HUMAN GENETICS Nov 15 - 16, 2021 (GMT+1, London Time) Certificate of Recognition for remarkable and worthy oral presentation on "Downregulation of miR-21 gene expression by CRE-Ter to modulate osteoclastogenesis: De Novo mechanism"



Downregulation of miR-21 gene expression by CRE-Ter to modulate osteoclastogenesis: De Novo mechanism

**Yuthana Pengjam^{a*}, Sompot Jantarawong^b, Thanet Prajantasen^a,
Natda Tonwong^a, Pharkphoom Panichayupakaranant^c**

^a*Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand*

^b*Department of Biological Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand*

^c*Phytomedicine and Pharmaceutical Biotechnology Excellent Center (PPBEC), Faculty of Pharmaceutical Sciences Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand*

ABSTRACT

miR-21 expression stimulates osteoclast cells in the context of osteoclastogenesis. A previous report showed that NFκB-miR-21 pathway could serve as an innovative alternative to devise therapeutics for healing diabetic ulcers. Furthermore, our study demonstrated that a highly water-soluble curcuminoids-rich extract (CRE-Ter) inhibits osteoclastogenesis through NFκB pathway. The interplay between miR-21 and CRE-Ter in osteoclastogenesis has not yet been investigated. In this study, we examined the relation of CRE-Ter and miR-21 gene expression in receptor of the nuclear factor κB (NFκB) ligand (RANKL) - induced murine monocyte/macrophage RAW 264.7 cells, osteoclast cells, in osteoclastogenesis. Effect of

CRE-Ter on generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was estimated by dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). The results reveal that CRE-Ter reduced expression levels of miR-21 gene in osteoclasts. The inhibitory effects of CRE-Ter on in vitro osteoclastogenesis were evaluated by reduction in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) content, and by reduction in expression levels of an osteoclast-specific gene, cathepsin K. Treatment of the osteoclast cells with CRE-Ter suppressed RANKL-induced NF κ B activation including phospho-NF κ B-p65, and phospho I κ B α proteins. Western blot analysis revealed that NF κ B inhibitor up-regulated CRE-Ter-promoted expression of phospho-NF κ B-p65. In addition, CRE-Ter dose-dependently inhibited phospho-Akt expression. CRE-Ter also dose-dependently reduced DNA binding activity of NF κ B and Akt as revealed by EMSA. CHIP assay revealed binding of NF κ B-p65 to miR-21 promoters. In conclusion, our results demonstrate that CRE-Ter downregulates miR-21 gene expression in osteoclasts via a de novo mechanism, NF κ B- Akt-miR-21 pathway.

Biography

Yutthana Pengjam is the Doctor of Philosophy (in Medicine) who was graduated from University of Miyazaki Japan. Now adays, he is a Principal Investigator at Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Thailand. His research is contributions and achievements in Cells and Molecular cell signaling in Bone, Biochemistry, Physiology, Natural products and potential use.

Presenting author details

Full name: Assist. Prof. Dr. Yutthana Pengjam

E-mail address: yutthana.p@psu.ac.th.

Session name/ number: RNA therapeutics

Category: Oral presentation

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการคัดลอกเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)



CERTIFICATE

OF RECOGNITION

Prof./Dr./Mr./Mrs./Ms. **Yutthana Pengjam**

Prince of Songkla University, Thailand

for his remarkable and worthy oral presentation on

“Downregulation of miR-21 gene expression by CRE-Ter to modulate osteoclastogenesis: De Novo mechanism”

at the **“International Webinar on
MOLECULAR & HUMAN GENETICS”**
held during November 05 - 16, 2021

Scientific Committee Members

Melanie Ehrlich
Tulane University, United States

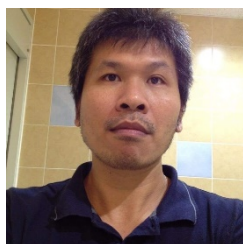
Ute Deichmann
Ben-Gurion University of the Negev, Israel

Dr. Yutthana Pengjam
Prince of Songkla University, Thailand

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยอัตโนมัติเมื่อวันที่ 1-10-2024
โดย ชันดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

2). RECIHF Virtual conference “SAH International Conference 2022 | Allied Health Sciences Natural Products for Health, Innovation & Medical Technologist, 28-29 March 2022, จัดโดย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

เรื่อง “Inhibitory effects of curcuminoids on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells” (Abstract accepted for oral presentation)



Inhibitory effects of curcuminoids on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells

Yutthana Pengjam^a, Asron Sani^a, Sompot Jantarawong^b, Kazuya Hasegawa^c, Yuya Yamaguchi^d, Pharkphoom Panichayupakaranant^e

^aFaculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand,

^bDepartment of Biological Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand, ^cFaculty of Health and Medical Science, Teikyo Heisei University, Tokyo, Japan, ^dDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, Toho University, Tokyo, Japan,

^ePhytomedicine and Pharmaceutical Biotechnology Excellent Center (PPBEC),

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Abstract

Background: Sarcopenia is a disease of progressive loss of muscle mass due to the imbalance of protein synthesis and proteolysis, and tends to emerge with ageing. Currently its treatment consists of non-drug therapies and drug therapies, but some medications can have various side effects. Therefore, it is important to search for effective herbal medicines that can modulate muscle mass.

Purpose: In this study, we investigated the inhibition effects of curcuminoids including, Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter on dexamethasone-induced muscle atrophy in differentiation of C2C12 cells.

Methods: C2C12 cells were cultured and treated with various concentrations of curcuminoids including, Cu, De, Bis, CRE, CRE-SD, CRE-Bin, and CRE-Ter. The inhibitory effects were studied using various methods, including MTT and LDH assays for cell viability and cell cytotoxicity, RT-qPCR for gene expression analysis, and Western blots for protein analysis. In this study, dexamethasone-treated C2C12 myotubes (Dex) are the positive drug control and used as *in vitro* models of muscle atrophy.

Results: The results revealed that treating differentiated C2C12 cells with Cu, CRE, CRE-Bin, and CRE-Ter reduced Atrogin-1 and MuRF-1 expression, whereas CRE-SD reduced only MuRF-1 expression. The Western blot analysis results show that Cu, CRE, CRE-Bin, CRE-

Ter, and CRE-SD upregulated the phosphorylation level of Akt, which is an important protein in the mTOR signaling pathway.

Conclusion: Our results show that Cu, CRE, CRE-Bin, CRE-SD, and CRE-Ter tend to inhibit muscle atrophy by decreasing expression of Atrogin-1 and MuRF-1 inhibiting protein degradation, and to upregulate Phospho-Akt to stimulate protein synthesis. These results provide corroborating evidence of therapeutic potential to treat sarcopenia patients.

Keywords: Curcuminoids; Sarcopenia; Muscle atrophy; C2C12 cells; Atrogin-1; MuRF-1

Biography:

Yutthana Pengjam is the Doctor of Philosophy (in Medicine) who was graduated from University of Miyazaki Japan. Now adays, he is a Principal Investigator at Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Thailand. His research is contributions and achievements in Cells and Molecular cell signaling in Bone, Muscle atrophy, Biochemistry, Physiology, Natural products and potential use.

Presenting author details

Full name: Assist. Prof. Dr. Yutthana Pengjam

E-mail address: yutthana.p@psu.ac.th.

Session name/ number: Natural Medicine

Category: Oral presentation



ลงชื่อ

(ผศ. ดร. ยุทธนา เพ็งแจ่ม)

หัวหน้าโครงการ

วันที่ 27...เดือน พฤษภาคม พ.ศ 2565

เอกสารฉบับนี้ดำเนินการให้หมดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนดล ศรีเพชร ID53398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)