

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสมุนไพรป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำเวฬุ

Investigation of anti-inflammatory activity of medicinal plants
from Welu wetland

โดย

ผศ. ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณปี 2554

17 เม.ย. 2555 40504330
301493

เริ่มบริการ
24 พ.ค. 2555

อภิรักษ์นันทนาการ

บทคัดย่อ

ตำมะง่าและเบญจมาศน้ำเค็มเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านในแถบลุ่มน้ำเวพู จังหวัดจันทบุรี เพื่อรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งการอักเสบ การศึกษานี้ทำการตรวจสอบผลของส่วนสกัดย่อยต่างๆ (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ) ของส่วนสกัดเอทานอลของใบตำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็มต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (ค่า IC_{50} เท่ากับ $32.93 \pm 3.95 \mu\text{g/mL}$ และ $54.47 \pm 11.01 \mu\text{g/mL}$ สำหรับตำมะง่าและเบญจมาศน้ำเค็มตามลำดับ) นอกจากนี้ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของใบตำมะง่ายังสามารถยับยั้งการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น รวมทั้งการเคลื่อนที่ของ p65 NF-KB เข้าสู่นิวเคลียสในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ยิ่งไปกว่านั้นส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของตำมะง่ายังแสดงฤทธิ์ลดการผลิตโพรสตาแกลนดิน E_2 ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากใบตำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็มมีคุณสมบัติด้านการอักเสบโดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง

คำสำคัญ : ตำมะง่า, เบญจมาศน้ำเค็ม, ไนตริกออกไซด์, โพรสตาแกลนดิน E_2 , การต้านอักเสบ

ABSTRACT

Clerodendrum inerme (L.) Gaertner and *Wedelia biflora* (L.) DC are medicinal plants which commonly used in traditional medicine in Welu wetlwnd, Chantaburi province to treat various diseases including inflammation. In this study, the various fractions (hexane, ethyl acetate and water) of ethanol extracts of *C. inerme* and *W. biflora* were investigated the inhibitory effects on nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated mouse macrophage cell line RAW 264.7. Among solvent fractions, the ethyl acetate fraction (50 µg/mL) of both plants were the most potent inhibitory activities without cytotoxic effect (IC₅₀ value of 32.93 ± 3.95 µg/mL and 54.47 ± 11.01 µg/mL for *C. inerme* and *W. biflora*, respectively). In addition, the ethyl acetate fraction of *C. inerme* suppressed the mRNA and protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) as well as p65 NF-KB nuclear translocation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Furthermore, ethyl acetate fraction of *C. inerme* could inhibit prostaglandin E₂ production. The obtained results reveal that leaf extracts of *C. inerme* and *W. biflora* possess anti-inflammatory properties through the suppression of nitric oxide production in vitro.

Keywords: *Clerodendrum inerme*, *Wedelia biflora* , nitric oxide, PGE₂, anti-inflammation

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำ วิจัย อาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับการพิสูจน์ เอกลักษณ์พืช ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ห้องปฏิบัติการ โปรตีนโอมิกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับความช่วยเหลือ ในด้านเทคนิคและการอนุเคราะห์ใช้เครื่อง real-time PCR สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) อำเภอลុង จังหวัดจันทบุรี กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและ สิ่งแวดล้อม สำหรับการอนุเคราะห์ให้เก็บพืชตัวอย่าง นอกจากนี้ขอขอบคุณหมอธนู พูลทวี ประธานศูนย์ องค์การประสานงานชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลុង จังหวัดจันทบุรี สำหรับข้อมูลการใช้สมุนไพรพื้นบ้านใน แถบลุ่มน้ำเวฬุ

สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวจิตรรา ทองใบ นางสาวกาญจนาภา วงศ์อยู่ นางสาวจิรภา จันทิมาลัย และ นางสาวดวงนภา บัวพูล นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
ABSTRACT	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	8
ผลการทดลอง	15
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	26
บรรณานุกรม	30

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันยาจากสมุนไพร (Phytopharmaceuticals หรือ Herbal drugs) ซึ่งเป็นยาจากสมุนไพรรักษาโรค เตรียมได้จากสารสกัดจากพืชได้กลายเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการรักษาสุขภาพภายใต้ แนวความคิดของการพัฒนาอย่างยั่งยืนและใช้ทรัพยากรอย่างระมัดระวัง หลายคนที่หันมาบริโภคยาสมุนไพรก็เพราะค้นพบว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ และไม่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพมากนัก อีกทั้งราคาก็ถูกกว่ายาแผนปัจจุบันอย่างมาก แม้แต่หน่วยงานของรัฐฯ เช่น องค์การเภสัชกรรมก็ได้ริเริ่มผลิตยาจากสมุนไพรออกมาจำหน่ายเอง แต่อย่างไรก็ตามปัญหาอย่างหนึ่งของการพัฒนา ยาสมุนไพรจากยาแผนโบราณหรือยาพื้นบ้าน คือการขาดข้อมูลที่เป็นผลวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในด้านการ วินิจฉัยโรคและการแสดงฤทธิ์ที่จะทำให้ยาสมุนไพรเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรในแง่มุมต่างๆ อาทิ ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบสำคัญในสมุนไพร การแยกสกัด การหาสูตรโครงสร้างของ สารออกฤทธิ์ และการศึกษากลไกของสารในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาวิจัยสมุนไพร การพัฒนาการผลิตยาสมุนไพรจะช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นการประหยัดงบประมาณและ อาจนํารายได้เข้าสู่ประเทศได้เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศได้เพิ่มความ สนใจกับยาสมุนไพรไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่ง หนึ่งของโลก แต่กลับต้องนำเข้ายาจากต่างประเทศเกือบทั้งหมดนับเป็นมูลค่ามหาศาล และเป็นสาเหตุ หนึ่งของการเสียดุลทางการค้า เพราะยารักษาโรคเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตที่จะขาดไม่ได้ เพื่อ ความมั่นคงของประเทศและการพัฒนาความเป็นอยู่ของประชาชน ให้สามารถเข้าถึงยารักษาโรคที่ราคา เหมาะสมและสามารถผลิตเองได้ภายในประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ทำการวิจัยศึกษา สารประกอบในพืชสมุนไพรเพื่อพัฒนาการรักษาโรคอย่างจริงจัง โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของ ประเทศไทยที่เป็นเขตป่าดงดิบชื้น และป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของระบบนิเวศน์ และพันธุ์ไม้ ต่างๆ อย่างอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งสำคัญของสมุนไพรมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังมีหมอพื้นบ้านและ องค์ความรู้ที่ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆจนถึงปัจจุบัน

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรง ของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือ ปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบ

ภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัดและทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เซลล์เม็ดเลือดออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดภัยอันตราย ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนหายได้ดีแทบไม่พบความผิดปกติของอวัยวะหรือการทำงานของระบบบกพร่องรุนแรง แต่หากระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมสาเหตุก่อการอักเสบเฉียบพลันไม่ได้ดี ทำให้มีการทำลาย กล้าม ุรุกรานอย่างต่อเนื่องนานออกไปอีก ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างกันจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น และหากการควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ

ในการอักเสบทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบหลายชนิด เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) โพรสตาแกลนดิน (prostaglandins) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้จะเป็นเครื่องมือทำให้เกิดการตอบสนอง และการอักเสบมากขึ้น (Van der Vliet, 2000) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้การอักเสบลดลง เป้าหมายของยาต้านการอักเสบจึงมุ่งยับยั้งหรือลดการหลั่งสารเหล่านี้ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปนี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆที่ไนตริกออกไซด์และโพรสตาแกลนดิน E2 เข้าไปเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบ และประเทศไทยมีการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท ดังนั้นเพื่อเป็นการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาด้านอักเสบจึงมีความจำเป็น นอกจากนี้การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลก็มีความสำคัญเพื่อความเข้าใจและยืนยันการออกฤทธิ์ของสารที่มีศักยภาพจะนำไปเป็นยาด้านการอักเสบ

สารจากพืชสมุนไพรเป็นทางเลือกที่สำคัญ ในการได้มาของสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง และป้องกันการหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบเหล่านี้ ทั้งในแง่ของการรักษาชีวิตผู้ป่วย และการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากการอักเสบแบบเรื้อรัง จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากนายธนู พูลทวี ประธานศูนย์องค์กรประสานงานชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำดวน จังหวัดจันทบุรี และเป็นหมอยาพื้นบ้านในอำเภอลำดวน จังหวัดจันทบุรี มีประสบการณ์ในการใช้สมุนไพรรักษาโรคนานกว่า 50 ปี พบว่าพืชสมุนไพรป่าชายเลนบริเวณลุ่มน้ำแหวพุที่ใช้ในการรักษาอาการอักเสบที่อยู่ในตำรายาของหมอยาพื้นบ้าน

แถบลุ่มน้ำเวพู มีตัวอย่างเช่น ใบสำมะง่า (*Clerodendrum inerme*) และใบเบญจมาศน้ำเค็ม (*Wedelia biflora*) ดังนั้นเพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านเหล่านี้ และเพื่อลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ จากการอักเสบเหล่านี้ต่อไป จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ด้านอักเสบที่อยู่ในใบสำมะง่า และใบต้นเบญจมาศน้ำเค็ม ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านและยังไม่มีรายงานฤทธิ์ด้านอักเสบจากส่วนของพืชดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะการศึกษาผลของส่วนสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์ด้านอักเสบที่ได้จากใบสำมะง่า และใบต้นเบญจมาศน้ำเค็ม รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดหรือสารออกฤทธิ์ด้านอักเสบจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านเหล่านี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อสกัดสารจากสมุนไพรพื้นบ้าน (ใบสำมะง่า และใบต้นเบญจมาศน้ำเค็ม) ในบริเวณป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำเวพู
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของส่วนสกัดพืชในระดับหลอดทดลอง
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของส่วนสกัดในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

นำสมุนไพรในเขตบริเวณป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำเวพูที่หมอสุมไพรพื้นบ้านใช้รักษาด้านด้านการอักเสบ ได้แก่ใบสำมะง่า และใบเบญจมาศน้ำเค็ม นำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ให้ได้ส่วนสกัด จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง และนำตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงมาทดสอบการยับยั้งการผลิตโปรสตาแกลดิน E2 และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของส่วนสกัดในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ

1.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาอันซับซ้อนที่เนื้อเยื่อต่างๆ ตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และโปรสตาแกลดิน E2 ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ โดยไนตริกออกไซด์มีฤทธิ์ส่งเสริมการอักเสบ ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) ในปัจจุบันพบว่า NOS มี 3 isoform ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และinducible NOS (iNOS) โดยที่ nNOS และ eNOS เป็น constitutive form ในขณะที่ iNOS เป็น inducible form การเร่งปฏิกิริยาของ NOS ต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin

mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH₄) และฮีม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF-KB ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-KB จะถูกจับโดย IKB และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวภาพให้มีการสลาย IKB ส่งผลให้ NF-KB เกิด translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS

ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Coleman, 2001) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อกจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็น inflammatory mediator ที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้จะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) การยับยั้งการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ iNOS (iNOS regulator) หรือยีนสำหรับสร้างโคแฟกเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์เพื่อนำไปสู่การผลิตรายด้านการอักเสบต่อไป

โพรสตาแกลนดิน เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อหลอดเลือด ระบบประสาท และเซลล์ ในการตอบสนองต่อการอักเสบ ในการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase (COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินเพื่อควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร และอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดิน E2 ในปริมาณมากและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Katzung, 2001) มียาที่ให้ผลยับยั้ง

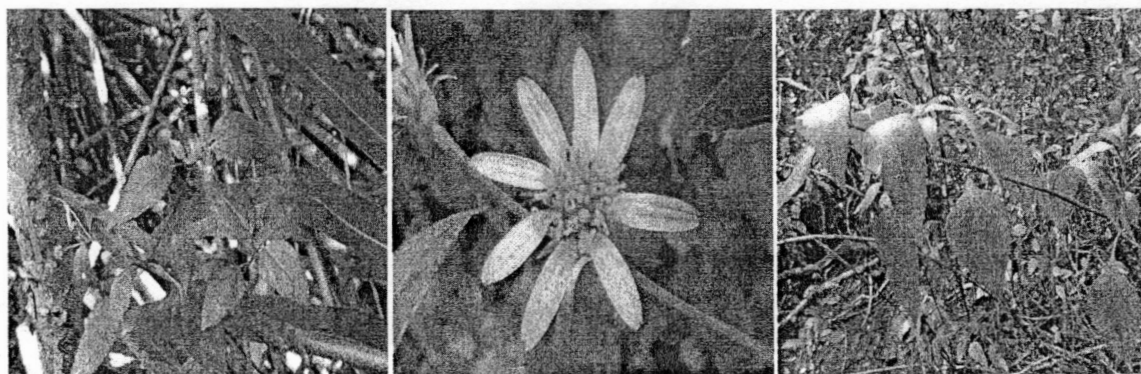
คือ COX-2 อย่างเฉพาะเจาะจงถูกพัฒนาขึ้น และใช้ในการรักษาอาการอักเสบ (Dhikav, 2002) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดต่อการตอบสนองต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (Tunctan, 2003)

ตำมะง่า (*Clerodendrum inerme* (L.) Gaertner) เป็นพืชในวงศ์ Verbenaceae (Lamiaceae) มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ลำต้นทอคนอน แผ่นกระจัดกระจายโดยรอบ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม แผ่นใบเป็นรูปใบหอก หรือรูปรี ขอบใบเรียบ ดอกออกตามง่ามใบและปลายกิ่งเป็นช่อกระจุก มี 3 ดอก มักจะขึ้นตามบริเวณที่ชื้นแฉะและตอนบนของป่าชายเลน (พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 1-1 มีการใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในหลายประเทศ เช่น ไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ใบใช้ตำพอก ต้มน้ำชะล้างบาดแผลเลือดออก หรือต้มเหล้าพอกฝีฝีบริเวณแผลฟกช้ำ จากการกระแทก และบวม แก้แผลอักเสบและแผลพุพอง ใบยังใช้รักษาอาการไข้ อาการไข้ช้ออักเสบ รากมีฤทธิ์แก้ลม ไชหวัด ตับอักเสบ ตับมีมอดแผลบวมจากการกระแทก (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, มปป.; Wijesundara, 2004; Shrivastava and Patel, 2007)



รูปที่ 1-1 ต้นตำมะง่า
(ภาพถ่ายโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

เบญจมาศน้ำเค็ม (*Wedelia biflora* (L.) DC. หรือ *Wollastonia biflora* (L.) DC.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย มีกิ่งมาก มักแผ่ทอดยอดคลุมพื้นดิน ขาว 1-5 เมตร กิ่ง ใบและช่อดอก มีขนสั้นสีขาว สากมือ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม แผ่นใบเป็นรูปไข่แกมรูปขอบขนานถึงรูปหอก ปลายเรียวแหลม ฐานใบรูปลิ้น ขอบใบหยักคล้ายฟันเลื่อย ดอกออกเบียดชิดกันแน่น คล้ายดอกเดี๋ยวนบนปลายก้านช่อตามง่ามใบใกล้ยอด สีเหลือง เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปตามพื้นที่ป่าชายเลนที่ชื้นแฉะอยู่เสมอ (พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 1-2 เบญจมาศน้ำเค็มเป็นสมุนไพรพื้นบ้านใช้ใบบดละเอียด พอกที่ท้องหญิงหลังคลอดบุตร รักษารอยปริแตกตามผิวหนัง รักษาอาการอักเสบบวม รักษาไข้ช้ออักเสบ อาการปวดกระดูก ดอกใช้เป็นยาถ่าย ส่วนรากใช้รักษากามโรค ชนิดหนองในและนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, มปป.; Chen และคณะ, 2007)



รูปที่ 1-2 ต้นเบญจมาศน้ำเค็ม
(ภาพถ่ายโดย กล้าขวัญ ศรีสุข)

สำมะง่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง เช่น ส่วนสกัดจากใบและดอกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Shrivastava and Patel, 2007) ส่วนสกัดจากต้นแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี (Mehdi และคณะ, 1997) ส่วนสกัดจากใบยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Masuda และคณะ, 1999), ฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (Manoharan และคณะ, 2006), ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในคนและพืช (Anitha and Kannan, 2006) และฤทธิ์ป้องกันตับจากพิษของ CCl_4 (Gopal and Sengottuvelu, 2008) นอกจากนี้มีการรายงานสารสกัดที่ได้จากใบเบญจมาศน้ำเค็มว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ BELL-7402 (Chen และคณะ, 2007) ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านอักเสบจากส่วนสกัดจากใบสำมะง่า และใบเบญจมาศน้ำเค็ม อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยของประกอบทางเคมีของสำมะง่า ดังนี้

1. iridoid glycosides ได้แก่ (2'-O-(beta-D-apiofuranosyl)-mussaenosidic acid (inermynoside A1), 2'-O-(5"-O-(8-hydroxy-2,6-dimethyl-2(E)-octenoyl)-beta-D-apiofuranosyl)-gardoside (inermynosides C) และ 2'-O-(5"-O-(p-hydroxy-benzoyl)-beta-D-apiofuranosyl) (inermynosides D) (Calis et al., 1994)
2. megastigmane glucoside (sammangaosides A และ B) และ iridoid glucoside (sammangaoside C) (Kanchanapoom et al., 2001)
3. strol (4 α -methyl-24 β -ethyl-5 α -cholesta-14, 25-dien-3 β -ol, 24 β -ethylcholesta-5, 9(11), 22E-trien-3 β -ol) aliphatic ketone (11-pentacosanone) และ diterpene (clerodermic acid) (Pandye et al., 2003)
4. neo-clerodane diterpenoids (inermes A, B) และ 14,15-dihydro-15b-methoxy-3-epicaryoptin (Pandye et al., 2005)
5. phenylethanoid glycoside 2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) ethyl-O-2",3"-diacetyl-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-->3)-4-O-(E)-feruloyl-beta-D-glucopyranoside, monomelittoside,

melittoside, inermynoside A1, verbascoside, isoverbascoside, campneoside I (Nan et al., 2005)

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

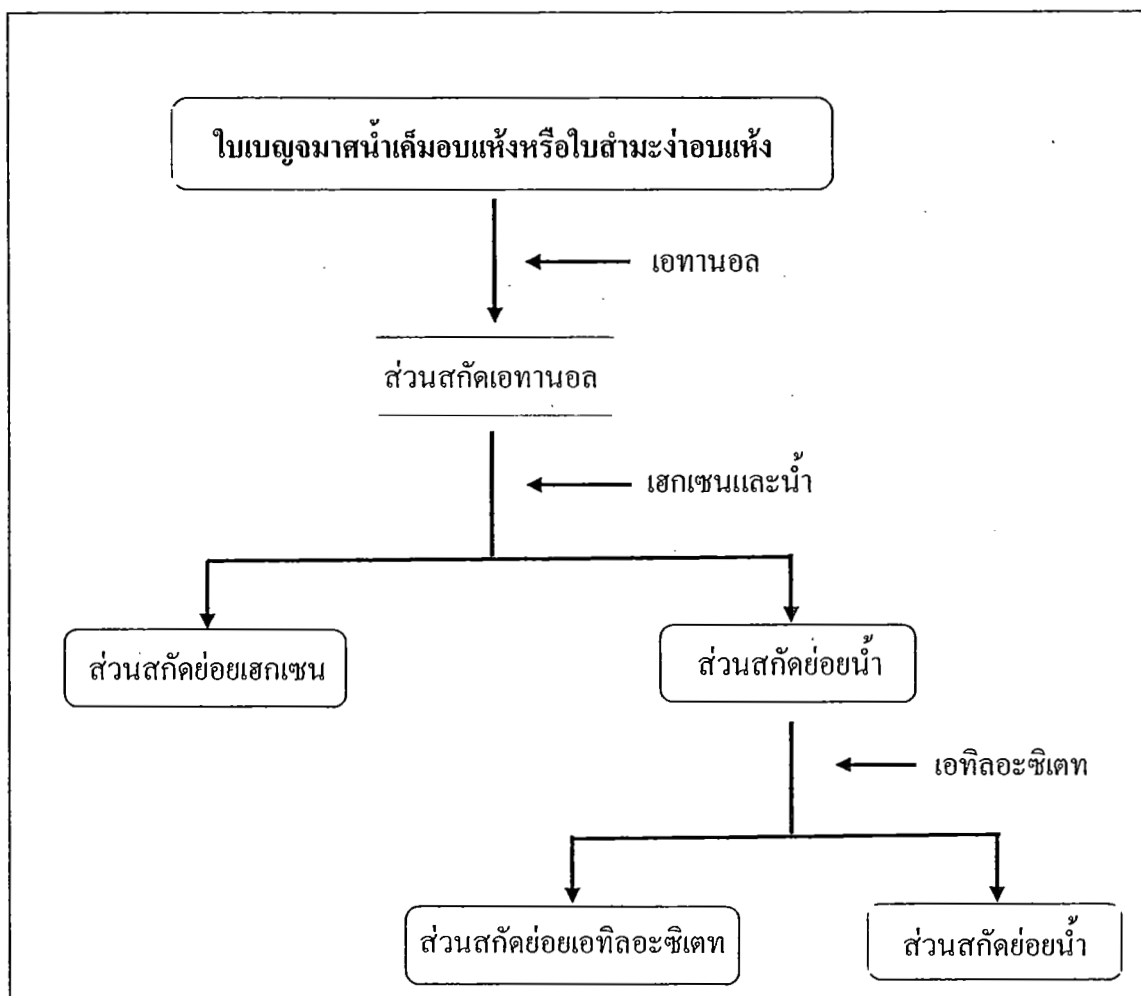
2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ใบเบญจมาศน้ำเค็ม และใบสามเงา จากศูนย์การเรียนรู้และการท่องเที่ยวเชิงนิเวศป่าชายเลนกลุ่มน้ำหวุ่ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (บ้านท่าสอนอำเภอคลองจังหวัดจันทบุรี) และระบุชนิดของพืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำใบสดมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด และอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง ก่อนนำใบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งน้ำหนักใบพืชหลังจากที่ปั่นได้ทั้งหมด

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำใบเบญจมาศน้ำเค็มที่บดละเอียด 435 g และใบสามเงา 1200 g ใส่ลงในถุงผ้า มัดปากถุงให้แน่น จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 4.4 และ 12 L ตามลำดับ ในขวดแก้วเป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเขย่าสารให้ผสมกันวันละ 2 ครั้ง จากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยใช้เครื่องดูดลดความดันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำผงของพืชทั้งสองชนิดไปทำการสกัดด้วยเอทานอล ปริมาตร 4.4 และ 12 L ซ้ำอีก 2 ครั้ง และทำการรวมส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมด ก่อนที่จะนำไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ และเก็บไม่ให้โดนแสงไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ทำการสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอลของพืช โดยนำส่วนสกัดเอทานอลของใบเบญจมาศน้ำเค็มมา 83 g และใบสามเงามา 195 g ละลายด้วยเอทานอล 800 และ 2000 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการแบ่งสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลมา 400 mL ใส่ลงในกรวยแยก ขนาด 1000 mL ตามแผนผังการสกัด (รูปที่ 2-1) เติมน้ำ 100 mL และเติมเฮกเซน 400 mL แยกส่วนที่เป็นชั้นเฮกเซนออก (ชั้นบน) นำส่วนที่เป็นชั้นน้ำมาสกัดด้วยเฮกเซน 400 mL อีกครั้ง นำชั้นเฮกเซนที่ได้มารวมกัน จากนั้นนำส่วนชั้นน้ำสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท 2 ครั้งๆละ 400 mL นำชั้นเอทิลอะซิเตทที่ได้รวมกัน เก็บชั้นน้ำ และนำแต่ละชั้นที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ให้โดนแสง เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป



รูปที่ 2-1 แผนผังการสกัดแยกส่วนของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มะง่าโดยสรุป

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี CO_2 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

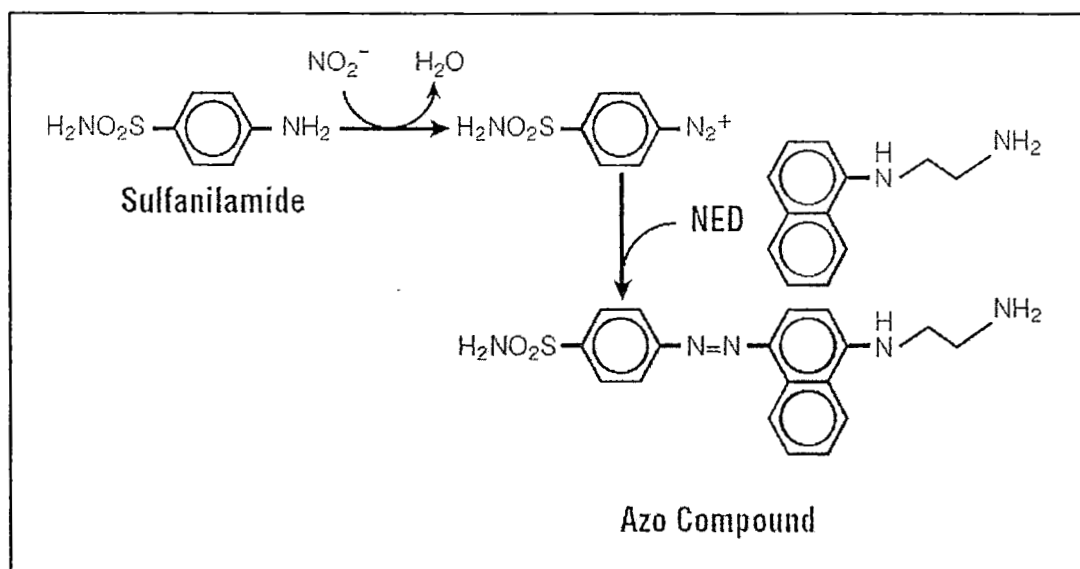
2.4 การ subculture โดยวิธี scraping

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำบัฟเฟอร์ HBSS [5 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 0.3 mM Na_2HPO_4 , 5.6 mM Glucose, 4 mM NaHCO_3] ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ใช้ cell scraper ขูดเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) FBS-DMEM ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue และ

นับเซลล์บนเครื่อง hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วแบ่งเซลล์ลงในภาชนะอันใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการ

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์โดยปฏิกิริยา Griess

ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนไตรต์เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์ iNOS โดยในขั้นตอนแรก ไนไตรต์จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound เป็นสารสีชมพูที่มีความเสถียร (รูปที่ 2-2) ดังนั้นปริมาณไนไตรต์จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ iNOS ทำการทดลองโดยการแบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ $100\text{ }\mu\text{L}$ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน $100\text{ }\mu\text{L}$ และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น $0\text{--}50\text{ }\mu\text{M}$



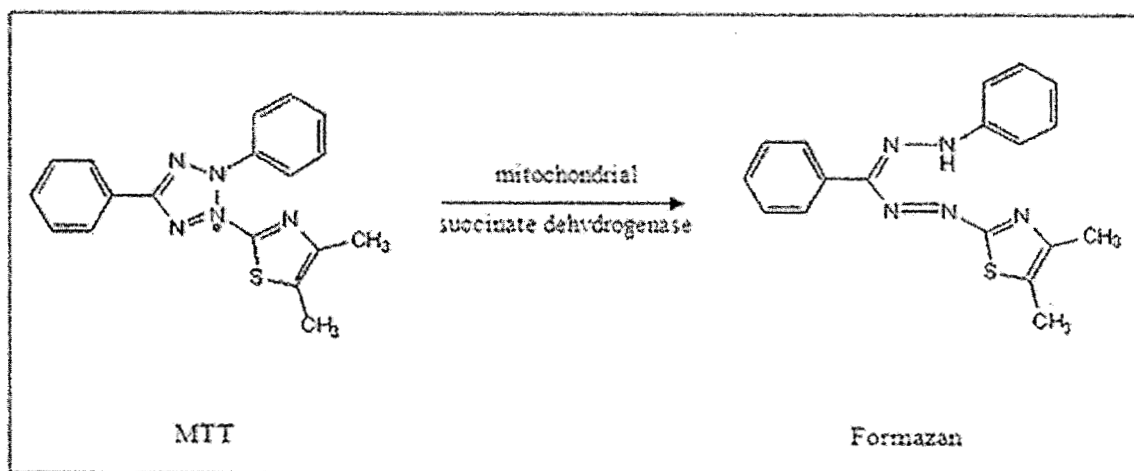
รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยา Griess

(ที่มา : www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf)

2.6 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) จำนวน $10\text{ }\mu\text{L}$ แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จำนวน $500\text{ }\mu\text{L}$ และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่ง MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง (รูปที่ 2-3) ปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์ตรงกับจำนวนเซลล์

$$\% \text{ การมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}}$$



รูปที่ 2-3 ปฏิกริยาการรีดักชันของ MTT

(ที่มา : www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=91)

2.7 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1×10^6 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการชูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมีวิธีดังนี้ เติมน้ำคลอโรฟอร์มจำนวน 0.2 mL

และผสมให้เข้ากัน โดยการกลับลดลงมาเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลจำนวน 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดบรรจุ RNA เข้าเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อระเหย เอทานอล ก่อนเติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 µL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ RNA ละลายได้ดีขึ้น ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A₂₆₀ เท่ากับ 40 µg/mL ของ RNA

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

ปฏิกิริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย RNA จำนวน 2 µg, 3U AMV reverse transcriptase, 5X buffer [250 Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM spermidine และ 50mM DTT], 0.083 mM oligo (dT)₁₅ primer, 0.67 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor และเติมน้ำปราศจาก RNase และ DNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 µL สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 42°C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-Time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์จำเพาะ iNOS และ elongation factor-2 (EF-2) ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ขนาดของผลผลิต และเลข Accession ในการทำปฏิกิริยา Real time RT-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดของ ผลผลิต (bp)	เลข Accession
iNOS	5' GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC 3'	156	NM_010927.2
	5' AGCCAGCATACCGGATGAGC 3'		
EF-2	5'CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA 3'	155	NM_007907.2
	5'GGGTCAGATTCTTGATGGGGATG 3'		

ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย 2X Prime Q-Master Mix with SYBR Green I จำนวน 10 µL, 10 µM Forward primer จำนวน 0.4 µL, 10 µM Reverse primer จำนวน 0.4 µL, cDNA จำนวน 1 µL และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 25 µL ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 95 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 °C นาน 30 วินาที, 60 °C นาน 30 วินาที, 72

°C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ในเครื่อง real-time PCR และวิเคราะห์หาค่า cycle of threshold (C_T) ของแต่ละปฏิกิริยา (Giulietti et al., 2001) จากนั้นนำมาคำนวณหา copy number ของ mRNA สำหรับยีน iNOS และ EF-2 จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่มีชิ้น cDNA เป้าหมายของยีน iNOS และ EF-2 ซึ่งแสดงผลในรูปของอัตราส่วนของ copy number ของ iNOS ต่อ EF-2

2.9 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm. (1×10^6 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของไบเบญจมาศน้ำเต็ม และไบสามง่าที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS [137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , $1.8 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$] ที่เย็น 1 ครั้ง ก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl , 150 mM NaCl , 5 mM EGTA , $0.1\% \text{ SDS}$, $1\% \text{ sodium deoxycholate}$, $1\% \text{ Nonidet P-40}$ และ protease inhibitors] ที่เย็น จำนวน 150 μL และใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 mL ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g นาน 5 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic acid (BCA)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารตัวอย่างด้วยวิธี BCA ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Pierce) โดยนำสารตัวอย่าง 2 μL และน้ำกลั่น 8 μL ผสมกับสารละลาย working BCA (อัตราส่วนของสารละลาย A:B เท่ากับ 50:1) จำนวน 200 μL แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จะได้สารเชิงซ้อนสีม่วงที่เสถียรและละลายน้ำได้ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ปริมาณ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 μg โดยแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และแกน x เป็นค่าปริมาณของโปรตีน

2.11 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

เตรียม SDS-polyacrylamide gel ที่มี separating gel 10% และ stacking gel 4% จากนั้นหยอดโปรตีนลงในปริมาณเท่ากันหลุมละ 60 μg ลงในเจลและผ่านกระแสไฟฟ้าใน (1X) running buffer [0.025 M Tris , 0.192 M glycine , 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) SDS] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วย้ายแถบโปรตีนลงบนแผ่น PVDF ใน transfer buffer [192 mM glycine , 25 mM Tris , 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) methanol] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 25 โวลต์ และที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน ก่อนทำการบ่ม membrane ด้วยสารละลาย blocking [5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) nonfat dry milk ในบัฟเฟอร์ TBS-T] ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl , pH 7.5, 150 mM NaCl , 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] นาน 5 นาที จำนวน

3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย mouse anti-iNOS antibody (1:500) ที่ละลายในตัวทำละลาย [1X PBS, 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) BSA, 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน หรือสารละลาย mouse anti β -actin (1:5,000) ที่ละลายในสารละลาย blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:5,000 สำหรับ iNOS, และ 1:10,000 สำหรับ β -actin ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane บ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ECL) นาน 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ iNOS และ β -actin กับโปรตีนมาตรฐาน

2.12 การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส

NF-KB เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึงทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ NF-KB/p65 ใน nuclear extract โดยวิธี Western blot analysis และเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้จากสถานะที่ไม่ได้เดิมสารทดสอบ กับสถานะที่เดิมสารสกัดวิธีแยกโปรตีนจาก nuclear extract อธิบายไว้ใน Srisook และคณะ (2011)

2.13 การวิเคราะห์ปริมาณโปรสตาแกลนดิน E2 โดยปฏิกิริยา Griess

แบ่งเซลล์แมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 μL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรสตาแกลนดิน E2 ที่ถูกผลิตในแมคโครฟาจ และหลังจากออกจากเซลล์มาสะสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ การวิเคราะห์ทำโดยใช้ ELISA kit (R&D system, USA.) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองที่อิสระต่อกัน ทำ 3 ซ้ำ สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่ม เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ Student's t test สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันของ 2 กลุ่มข้อมูล โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากพืช

จากการสกัดใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มเงาะด้วยเอทานอล และสกัดแยกส่วนด้วยสารละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ตามลำดับ พบว่า ส่วนสกัดย่อยน้ำของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มเงาะที่ได้มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-1

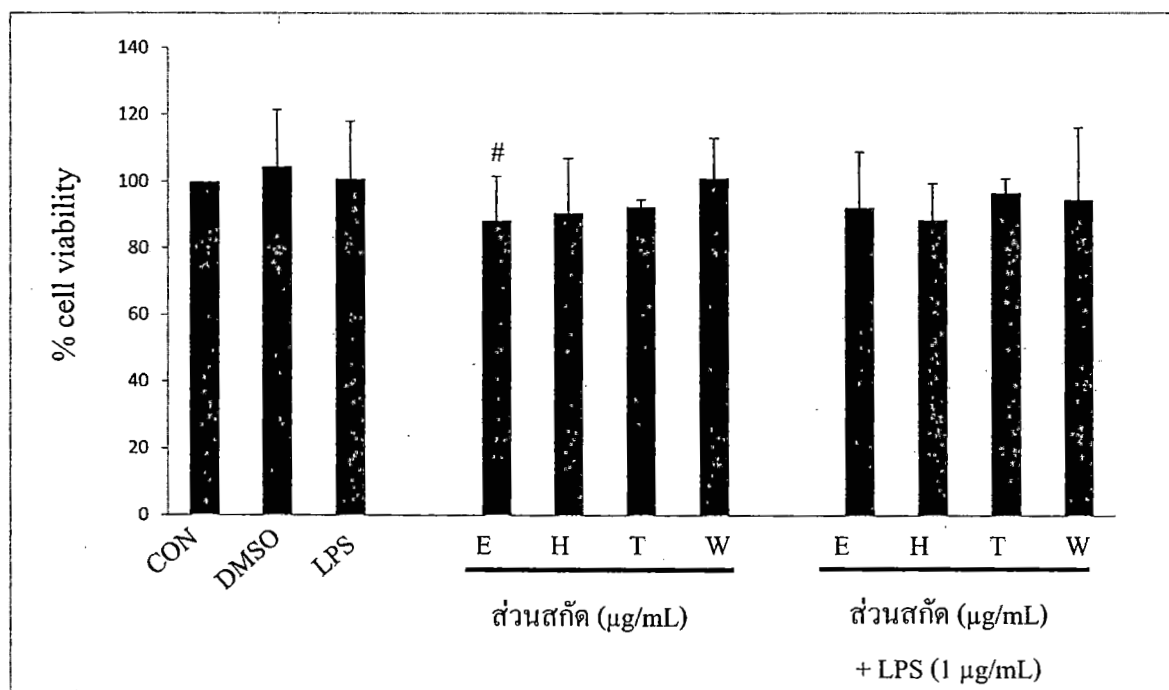
ตารางที่ 3-1 น้ำหนักและร้อยละน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มเงาะ

ส่วนสกัดย่อย	ใบส้มเงาะ		เบญจมาศน้ำเค็ม	
	น้ำหนักสาร (กรัม)	ร้อยละ ของน้ำหนักแห้ง	น้ำหนักสาร (กรัม)	ร้อยละ ของน้ำหนักแห้ง
เฮกเซน	36.69	21.69	26.17	33.81
เอทิลอะซิเตท	36.69	15.78	4.16	5.37
น้ำ	98.55	58.26	36.74	33.31

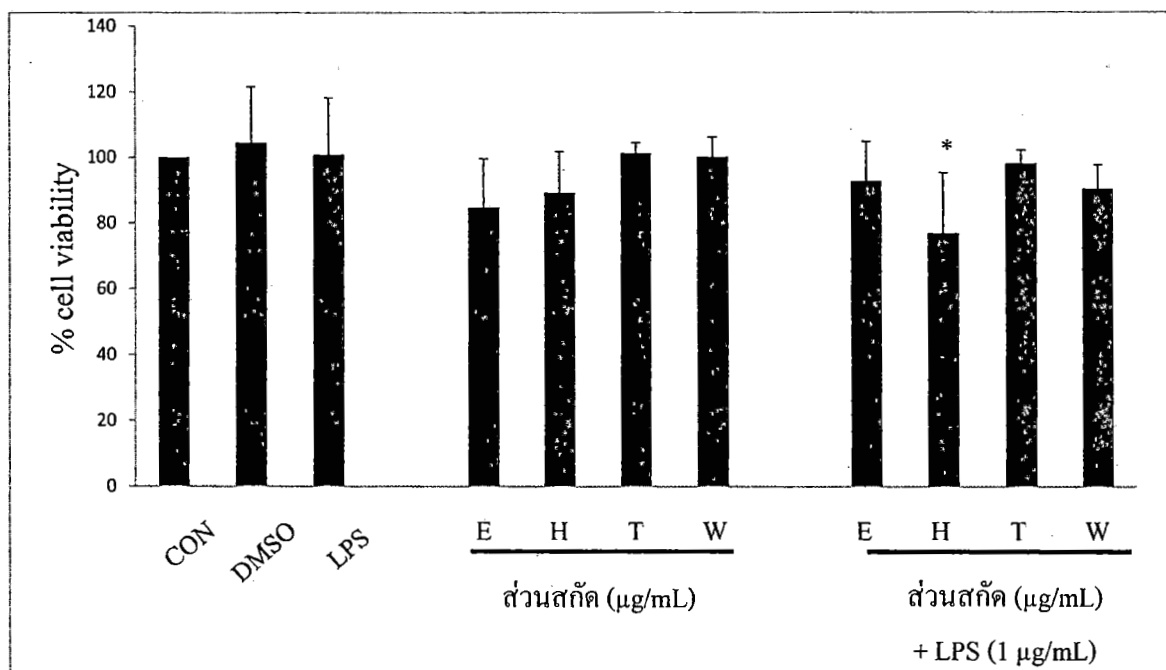
3.2 การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์

ผลจากการศึกษาค่าการอยู่รอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มเงาะ ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบเบญจมาศน้ำเค็มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO เพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นตัวทำลายส่วนสกัดสำหรับทดสอบ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของส่วนสกัดเอทานอลของใบเบญจมาศน้ำเค็ม ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3-1) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดต่างๆ ของใบส้มเงาะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO แต่ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือ $76.92 \pm 18.34\%$ เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและ LPS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ

LPS เพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 3-2 นอกจากนี้ LPS ที่ความเข้มข้น $1\mu\text{g/mL}$ และ DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



รูปที่ 3-1 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่สัมผัสกับส่วนสกัดของใบเบญจมาศ น้ำเค็ม ทั้งที่มีและไม่มี LPS ($1\mu\text{g/mL}$) ที่ความเข้มข้น $50\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ E = ส่วนสกัดเอทานอล, H = ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน, T = ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท, W = ส่วนสกัดย่อยน้ำ, CON = เซลล์ควบคุม, DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และ $\# p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO

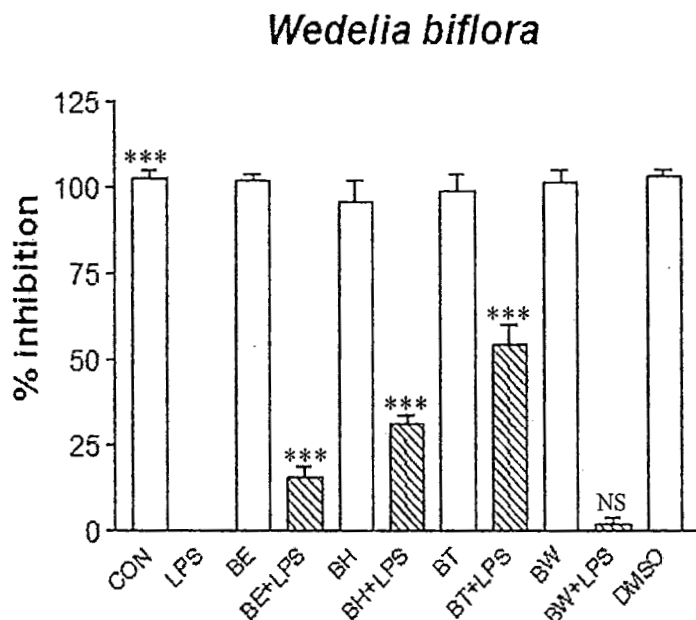


รูปที่ 3-2 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่สัมผัสกับส่วนสกัดของใบส้มเงาะ ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 µg/mL) ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ E = ส่วนสกัดเอทานอล, H = ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน, T = ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท, W = ส่วนสกัดย่อยน้ำ, CON = เซลล์ควบคุม, DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS

3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มเงาะ

ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำของพืชทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ $54.64 \pm 7.86\%$ และ $61.3 \pm 30.23\%$ สำหรับใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มเงาะ ตามลำดับ รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดเอทานอล และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ (รูปที่ -3-3 และรูปที่ 3-4) โดยที่เซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสส่วนสกัด และเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO มีเปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ เท่ากับ -2.64 ± 6.27 และ -3.59 ± 5.20 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ เท่ากับ 100% และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเพียงอย่าง

เดี่ยวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO เพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 3-3 และรูปที่ 3-4

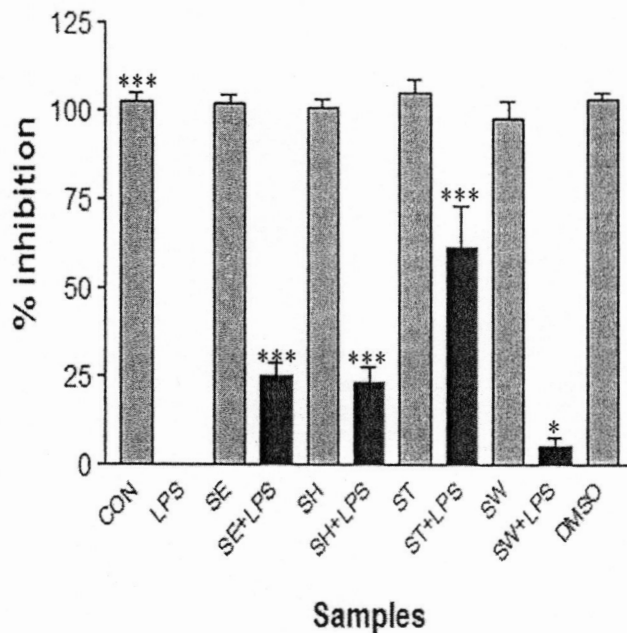


Samples

รูปที่ 3-3 ผลของส่วนสกัดของใบเบญจมาศน้ำเค็ม ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 50 ug/ml และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ค่าการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของแต่ละส่วนสกัดเปรียบเทียบกับปริมาณไนไตรท์ที่ได้จากเซลล์ที่สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว (LPS) *** $P < 0.001$ vs LPS, NS= $P > 0.05$

- BE= ส่วนสกัดเอทานอลของใบเบญจมาศน้ำเค็ม
- BH= ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของใบเบญจมาศน้ำเค็ม
- BT= ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบเบญจมาศน้ำเค็ม
- BW= ส่วนสกัดย่อยน้ำของใบเบญจมาศน้ำเค็ม

Clerodendrum inerme



รูปที่ 3-4 ผลของส่วนสกัดของใบส้มเงาะ ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ค่าการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของแต่ละส่วนสกัดเปรียบเทียบกับปริมาณไนไตรท์ที่ได้จากเซลล์ที่สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว (LPS)

* $P < 0.05$ vs LPS, *** $P < 0.001$ vs LPS

SE= ส่วนสกัดเอทานอลของใบส้มเงาะ

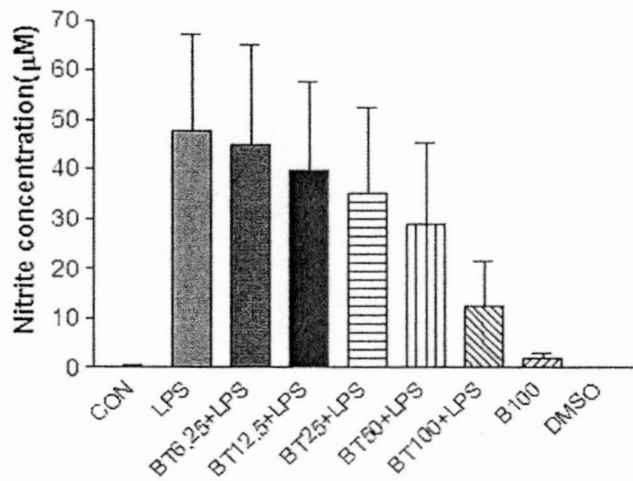
SH= ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของใบส้มเงาะ

ST= ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มเงาะ

SW= ส่วนสกัดย่อยน้ำของใบส้มเงาะ

ต่อมาจึงทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้ง 2 ชนิด โดยให้เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ (6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$) พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3-5 และรูปที่ 3-6) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบเบญจมาศน้ำเค็มมีค่า IC_{50} เท่ากับ 54.47 ± 11.01 $\mu\text{g/mL}$ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32.93 ± 3.95 $\mu\text{g/mL}$ โดยที่ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้ง 2 ชนิดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 3-7 และรูปที่ 3-8)

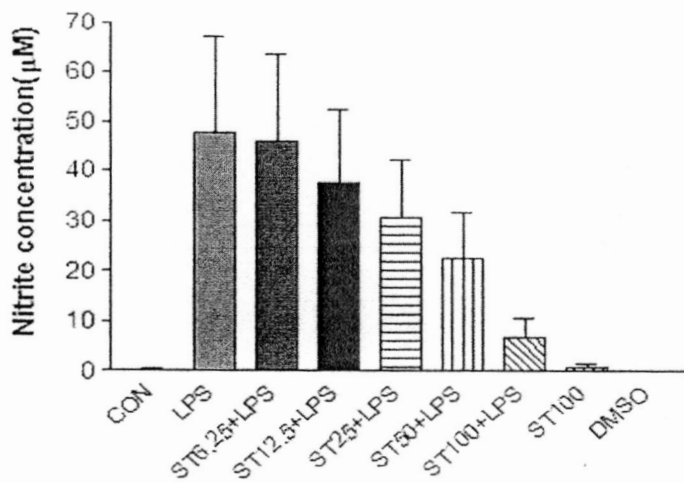
Wedelia biflora



Samples

รูปที่ 3-5 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบเบญจมาศน้ำเค็ม ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 6.25-100 µg/mL และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์ ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

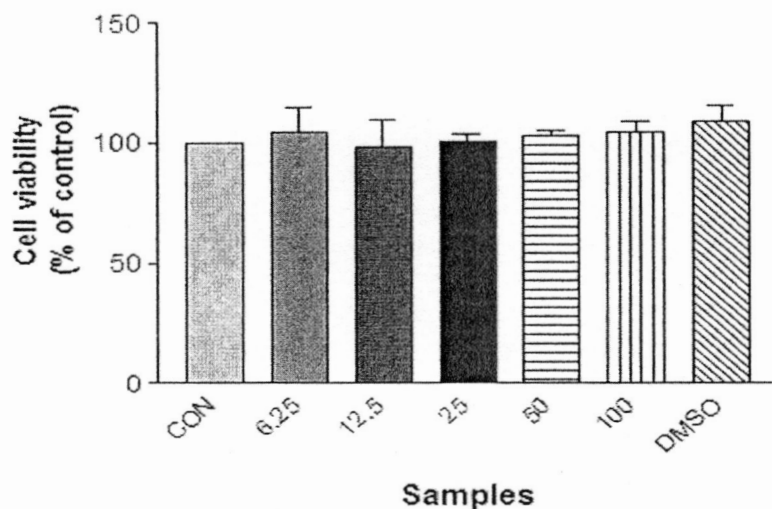
Clerodendrum inerme



Samples

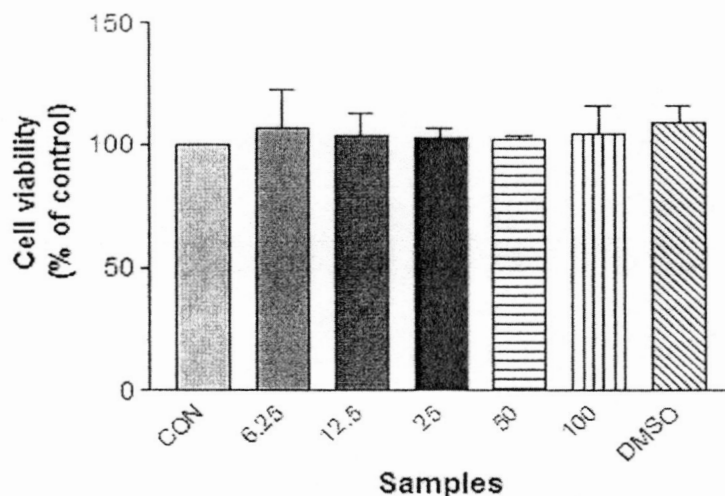
รูปที่ 3-6 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสามเงา ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 6.25-100 µg/mL และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

Wedelia biflora



รูปที่ 3-7 ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดจากใบเบญจมาศน้ำเค็ม ที่ความเข้มข้น 6.25-100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับความมีชีวิตรอดของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารใด (CON)

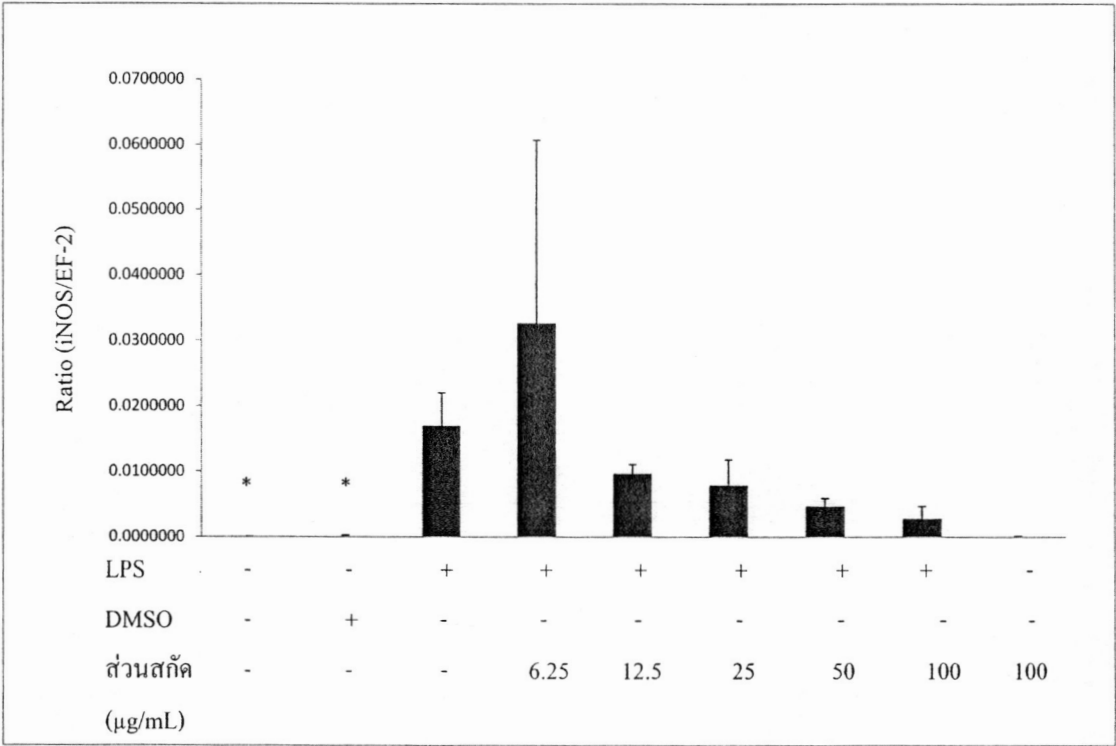
Clerodendrum inerme



รูปที่ 3-8 ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดจากใบสามเงา ที่ความเข้มข้น 6.25-100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับความมีชีวิตรอดของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารใด (CON)

3.4 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าต่อการแสดงออกของยีน iNOS ในระดับ mRNA

จากผลการศึกษาการข้างต้นพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงกว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบเบญจมาศน้ำเค็ม ดังนั้นจึงเลือกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่ามาทดสอบกลไกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่าการแสดงออกของยีน iNOS ในระดับ mRNA ของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL ในสถานะที่มีและไม่มี LPS พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้มีปริมาณ mRNA ของ iNOS เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท พบว่า สกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าสามารถลดปริมาณ mRNA ของ iNOS ได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัด นอกจากนี้ส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ไม่สามารถทำให้ปริมาณ mRNA ของ iNOS เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด หรือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.4% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 3-9

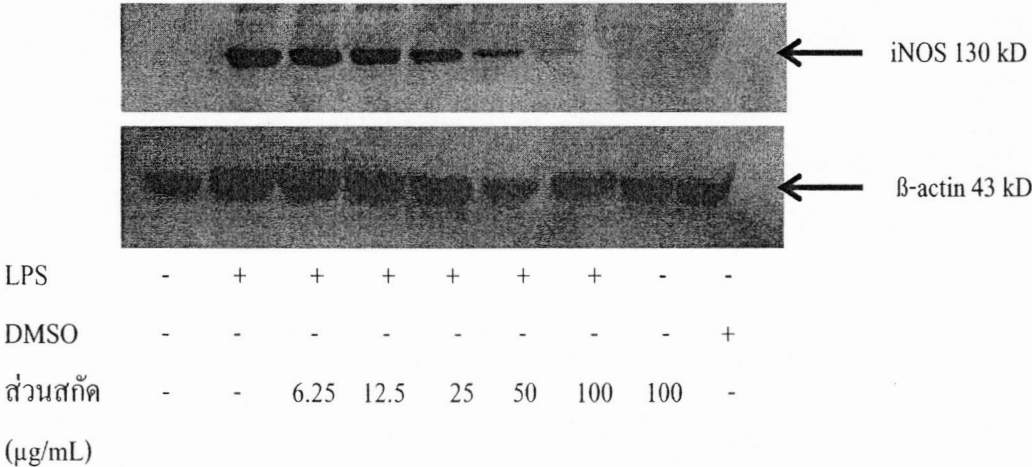


รูปที่ 3-9 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน iNOS ระดับ mRNA ในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่า ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 µg/ml) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (6.25-100 µg/mL) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม, DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.4% DMSO

เพียงอย่างเดียว, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

3.5 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าต่อปริมาณโปรตีน iNOS

จากผลการศึกษาปริมาณโปรตีน iNOS ของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่บ่มด้วยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่า ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในสภาวะที่มีและไม่มี LPS พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้มีปริมาณโปรตีน iNOS เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่า พบว่า ปริมาณโปรตีน iNOS ลดลง เมื่อความเข้มข้นของส่วนสกัดเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ -3-10) ส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ทำให้ปริมาณโปรตีน iNOS เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด หรือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.4% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ -3-10

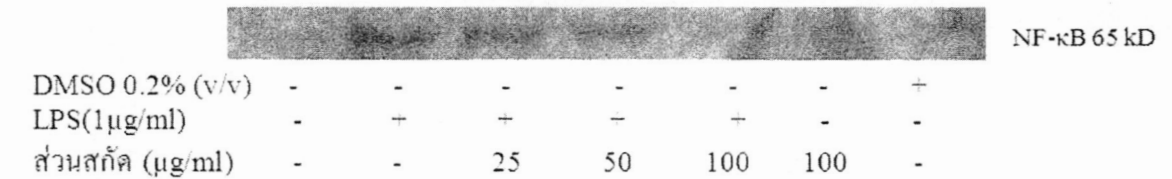


รูปที่ 3-10 การวิเคราะห์ระดับโปรตีน iNOS โดยเทคนิค Western blot analysis ในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่า ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 2 ครั้งที่ได้ผลเหมือนกัน

3.6 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าต่อการเคลื่อนที่ของ NF-KB p65 subunit

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าต่อ transcription factor NF-KB ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ซึ่งในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-KB จะจับอยู่กับโปรตีน I-KB ทำให้อยู่ในไซโทซอล แต่เมื่อมีการกระตุ้นโดย LPS จะทำให้ I-KB ถูกสลายตัว และ NF-KB เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีน NF-KB p65 subunit จาก

นิวเคลียส โดยเทคนิค Western blotting ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน p65 ที่เป็นหน่วยย่อยของ NF-KB เนื่องจาก NF-KB มักจะปรากฏอยู่ในรูป heterodimer ระหว่าง p65 และ p50 จากการทดลองพบว่า LPS ทำให้มีการเคลื่อนที่ของ NF-KB p65 subunit เข้าสู่นิวเคลียส และส่วนสัปดาห์ย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะ สามารถลดปริมาณโปรตีน p65 NF-KB ในนิวเคลียสในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสัปดาห์ (รูปที่ 3-11)



รูปที่ 3-11 ผลการวิเคราะห์ผลของส่วนสัปดาห์ย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะต่อการเคลื่อนที่สู่นิวเคลียสของโปรตีน p65 NF-KB บ่มเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 กับส่วนสัปดาห์ย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μg/mL ในสภาวะที่มี LPS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากนิวเคลียสมาวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blotting

3.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 ของส่วนสัปดาห์ย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะ

โพรสตาแกลนดิน E2 เป็น inflammatory mediator อีกตัวหนึ่งที่ถูกหลั่งออกมาในขณะที่มีการอักเสบขึ้น ดังนั้นจึงนำเซลล์ RAW 264.7 บ่มกับส่วนสัปดาห์ย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะ และ LPS พบว่าปริมาณโพรสตาแกลนดิน E2 ที่พบในอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 176.23 ± 36.37 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 10655.62 ± 479.21 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสัปดาห์ และ LPS จะมีปริมาณโพรสตาแกลนดิน E2 ลดลงในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ตารางที่ 3-2) ในการทดลองนี้ใช้ยา Indomethacin เป็นตัวควบคุมแบบเบวกสำหรับเอนไซม์ COX-2 โดยเซลล์ที่สัมผัสกับ Indomethacin (10 μM) และ LPS มีปริมาณโพรสตาแกลนดิน E2 ลดลงเหลือเท่ากับ 202.06 ± 55.92 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 74.43 ± 5.87

ตารางที่ 3-2 แสดงการยับยั้งการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 (PGE₂) ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของใบส้ม
มะง่าในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของส้มมะง่า		ความเข้มข้นของ PGE ₂ (พิโคกรัมต่อมิลลิตร) ^a	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^b
ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)			
+LPS	12.5	4270.66± 1939.28	59.92±18.20
	25	1325.90 ± 688.60	87.56±6.46
	25	200.47 ± 31.25	98.12±0.29
	100	277.65 ± 69.90	97.39±0.66
-LPS	100	329.43 ± 150.86	-
Control		176.23± 36.37	-
LPS (1 ug/ml)		10655.62± 479.21	0.00
Indomethacin 10 μM + LPS		202.06± 55.92	74.43 ± 5.87
Indomethacin 10 μM		121.63± 68.86	-

^a ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละ
ครั้งทำ 3 ซ้ำ

^b ค่าการยับยั้งการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 ของแต่ละส่วนสกัดเปรียบเทียบกับปริมาณโพรสตาแกลน
ดิน E2 ที่ได้จากเซลล์ที่สัมผัส LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เพียงอย่างเดียว

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบส้มะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม ซึ่งเป็นพืชที่ถูกใช้ในการแพทย์พื้นบ้านของไทยภาคตะวันออก (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, มปป) ในการรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งโรคจากการอักเสบ การศึกษาทำในเซลล์ไลน์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นการจำลองการติดเชื้อจุลินทรีย์ในเซลล์แมคโครฟาจ ทำให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ออกมาในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากใบส้มะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ และสามารถลดการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับโปรตีนและ mRNA ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้าในเรื่องของฤทธิ์ด้านการอักเสบของใบส้มะง่าโดย Gopal and Sengottuvelu, 2007 รายงานว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบส้มะง่าฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยมีฤทธิ์การป้องกันตับอักเสบในหนู ที่เหนี่ยวนำด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ นอกจากนี้ Sharma et al., 1989 ได้รายงานว่า ส่วนสกัดแอลกอฮอล์จากต้นทานตะวันซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกันกับต้นเบญจมาศน้ำเค็มมีฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบในหนูทดลองที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ อย่างไรก็ตามรายงานนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาผลกระทบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบส้มะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม

การวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบส้มะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม (ส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ) ที่ความเข้มข้นของส่วนสกัดเท่ากับ 50 $\mu\text{g/mL}$ พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนสกัดอื่น โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 4-1 ถึง 4-4) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณไนไตรท์เป็นผลมาจากการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ ไม่ได้มาจากการตายของเซลล์ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารประกอบฟีนอล หลายชนิดแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (Shin et al., 2010 และ Ci et al., 2010) และจากการศึกษาของสุภารัตน์ คุริพันธ์ และอัจฉราพรรณ ละมูล (2553) พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้งสองชนิดนั้นอาจเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอล อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการแยกสาร

บริสุทธิ์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ผลที่ได้จากการศึกษาในส่วนสกัดของใบเบญจมาศน้ำเค็มนี้ คล้ายกับการศึกษาในใบขลุ่ย ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับเบญจมาศน้ำเค็ม ที่พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของส่วนสกัดเอทานอลใบขลุ่ย มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่สัมผัสกับ LPS (ดวงนภา บัวพุด และคณะ, 2553) จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบสามเงาที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่าสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 3-5 และรูปที่ 3-6 โดยใบสามเงามีประสิทธิภาพสูงกว่าใบเบญจมาศน้ำเค็ม โดยมีค่า IC_{50} ของส่วนสกัดจากใบสามเงาเท่ากับ $32.93 \pm 3.95 \mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ส่วนสกัดจากใบเบญจมาศน้ำเค็มมีค่าเท่ากับ $54.47 \pm 11.01 \mu\text{g/mL}$

ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจอยู่ที่ระดับการถอดรหัสพันธุกรรม (Aktan, 2004) และระดับของไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นจากการผลิตโดย iNOS ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของ iNOS ในแมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นโดยตัวเหนี่ยวนำที่จำเพาะและมีส่วนร่วมในพยาธิวิทยาของโรคอักเสบต่างๆ (Buttery et al., 1994) ดังนั้นจึงศึกษาผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสามเงา ต่อการปริมาณ mRNA ของ iNOS โดยเทคนิค real time RT-PCR พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสามเงาสามารถยับยั้งการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน iNOS ได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ขึ้นต่อมาทำการศึกษาผลของส่วนสกัดต่อปริมาณโปรตีน iNOS พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสามเงาสามารถลดปริมาณโปรตีน iNOS ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด ในเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใดพบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน iNOS ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน (รูปที่ 3-9 และ 3-10) แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จึงมีการแสดงออกของ iNOS และเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวไม่มีการแสดงออกของยีน iNOS ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ได้เป็นผลมาจากการลดปริมาณของ iNOS ซึ่งแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ไม่ใช่การลดปริมาณของ eNOS และ nNOS ซึ่งจะมีการแสดงออกอยู่ตลอดเวลาในไซโตซอล จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสามเงาสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้โดยยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ทั้งในระดับ mRNA และนำไปสู่การลดลงของโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

โพรสตาแกลนดิน E2 เป็นสารสื่อกลางในการอักเสบที่สำคัญอีกชนิดนอกเหนือจากไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจในขณะที่เกิดกระบวนการอักเสบ โดยเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในขณะที่มีการอักเสบ ในการศึกษาพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสามเงาสามารถลดการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นดัง

แสดงผลในตารางที่ 3.12 ดังนั้นฤทธิ์ด้านการอักเสบของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มเง่าส่วนหนึ่งเกิดจากความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และโปรสตาแกลนดิน E2

NF-KB เป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน NF-KB อยู่ในกลุ่มโปรตีน Rel มีลักษณะเป็น homodimer หรือ heterodimer ที่เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF-KB1) และ p52 (NF-KB2) โดยที่การจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูปที่พบบ่อย (Luqman and Pezzuto, 2010) NF-KB ที่พบในแมคโครฟาจในสภาวะปกติเซลล์จะจับกับโปรตีน inhibitory-kappaB (IKB) ทำให้ NF-KB คงอยู่ในไซโทซอล (Bauerle and Baltimore, 1996) แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน IKB จะถูกฟอสโฟรีเลชันโดยเอนไซม์ IKB kinase (IKK) เป็นผลให้ IKB สลายตัว (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้น NF-KB จึงเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและจับกับโปรโมเตอร์ของยีน iNOS และ COX-2 และเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมของ iNOS และ COX-2 นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของไนตริกออกไซด์ และโปรสตาแกลนดิน (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้นเราจึงทดสอบผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มเง่าต่อปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียสเนื่องจากการจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูป NF-KB ที่พบบ่อย จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มเง่าสามารถลดปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียสได้ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลไกหนึ่งที่สาร ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มเง่าลดการผลิตไนตริกออกไซด์และโปรสตาแกลนดิน E2 ได้คือสามารถลดปริมาณ p65 NF-KB และนำไปสู่การลดลงของระดับ mRNA ของ iNOS รวมทั้งระดับโปรตีนของ iNOS ตามลำดับ และสุดท้ายเกิดการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และโปรสตาแกลนดิน E2

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดของใบส้มเง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็มมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และโปรสตาแกลนดิน E2 ข้อมูลที่ได้จะนำมาซึ่งหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะสนับสนุนการนำสมุนไพรใบส้มเง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็มไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เช่น โรคไขข้ออักเสบ และโรคตับอักเสบ รวมทั้งรักษาอาการอักเสบที่เกิดจากการบาดเจ็บต่างๆ เป็นต้น และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการค้นหายาต้านอักเสบชนิดใหม่จากสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้

4.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดที่ได้จากใบส้มเง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ

2. ส่วนสัณคัทยอยเอทิลอะซิติเตทจากใบสำมะงำมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยยับยั้งที่การแสดงออกของ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสัณคัค

3. ส่วนสัณคัทยอยเอทิลอะซิติเตทจากใบสำมะงำมีฤทธิ์ในการลดปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียสได้ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสัณคัค

4. ส่วนสัณคัทยอยเอทิลอะซิติเตทจากใบสำมะงำมีฤทธิ์ในยับยั้งการผลิตโปรสตาแกลนดิน E2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสัณคัค

เอกสารอ้างอิง

- ดวงนภา บัวพุด, กล่าวขวัญ ศรีสุข, เอกรัฐ ศรีสุข, จิรภา จันทิมลย์ (2553).ฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัดจากขลุ่ยในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccheride (LPS). รายงานสืบเนื่องจากการประชุมการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 19 วันที่ 23-24 ธันวาคม 2553. หน้า 617-625.
- พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย. (2549). สำนักงานอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน. (มปป.). สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง) จังหวัดจันทบุรี ส่วนบริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- สุภารัตน์ คุริพันธุ์ และ อัจฉราพรณ ละมุล (2553). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบส้มอ่องาและใบเบญจมาศน้ำเค็ม. ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., & Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357,593-615.
- Anitha, R., and Kannan, P. (2006). Antifungal activity of *Clerodendrum inerme* and *Clerodendrum phlomidis*. *Turk. J. Biol.* 30, 139-142.
- Bauerle, P.A., Baltimore, D. (1996). NF-KB: ten years after, *Cell*. 87 13-20.
- Calis I., Hosny M., Yürüker A., Wright A.D., Sticher O. (1994). Inerminosides A and B, two novel complex iridoid glycosides from *Clerodendrum inerme*. *Journal of Natural Products*. 57: 494-500.
- Ci X., Liang X., Luo G., Yu Q., Li H., Wang D., Li R., Deng X. (2010). Regulation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by 2"-hydroxy-3"-en-anhydrocaritin involves down-regulation of NF-kappaB and MAPK expression. *International Immunopharmacology*. 10: 995-1002.
- Chen, W., Tang, W., Zhang, R., et. al. (2007). Cytotoxic germacrane-type sesquiterpenes, pimarane-type diterpenes, and a naphthalene derivative from *Wollastonia biflora*. *J. Nat. Prod.* 70: 567-570.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Inter Immunopharm.* 1: 1397-1406.

- Dhikav, V., Singh, S., Anand, K.S., (2002). Newer non-steroidal anti-inflammatory drugs—a review of their therapeutic potential and adverse drug reactions. *J. Ind. Acad. Chem. Med.* 3, 332–338.
- Cross, R. K, Wilson, K. T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 9: 179-189.
- Dorheim, M.A., Tracey, W.R., Pollock, J.S., Grammas, P. (1994). Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 659-665.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods.* 25: 386–401.
- Gopal, N. and Sengottuvelu, S. (2008). Hepatoprotective activity of *Clerodendrum inerme* against CCL4 induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia.* 79: 24-26.
- Grisham, M. B, Jour'd'Heuil, D., Wink, D. A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 276: G315-321.
- Guzik, T.J., Korb, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469-487.
- Kanchanapoom T., Kasai R., Chumsri P., Hiraga Y. and Yamasaki K. (2001). Megastigmane and iridoid glucosides from *Clerodendrum inerme*. *Phytochemistry.* 58: 333–336.
- Katzung, B.G. Basic & Clinical Pharmacology . (2001), International Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Latham, K.A., Whittington, K.B., Zhou, R., Qian, Z., Rosloniec, E.F. (2005). Ex vivo characterization of the autoimmune T cell response in the HLA-DR1 mouse model of collagen-induced arthritis reveals long-term activation of type II collagen-specific cells and their presence in arthritic joints. *Journal of Immunology.* 174, 3978-3985.
- Luqman, S., Pezzuto, J.M. (2010). NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention, *Phytotherapy Research.* 24: 949-963.
- Manoharan, S., Kavitha, K., Senthil, N., Renju, G.L. (2006). Evaluation of anticarcinogenic effects of *Clerodendron inerme* on 7,12-dimethylbenzo(a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med. J.* 47: 1038-1043.
- Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y. et. al. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *J Agri. Food Chem.* 47: 1749-1754.

- Mehdi, H., Tan, G.T., Pezzuto, J.M. et. al. (1997). Cell culture assay system for the evaluation of natural product mediated anti-hepatitis B virus activity. *Phytomedicine*. 3: 369-377.
- Nan H., Wu J, Zhang S. (2005). A new phenylethanoid glycoside from *Clerodendrum inerme*. *Pharmazie*. 60: 798-799.
- Pandey R., Ram K. Verma, Subhash C. Singh, Madan M. Gupta. (2003). 4 α -Methyl-24 β -ethyl-5 α -cholesta-14, 25-dien-3 β -ol and 24 β -ethylcholesta-5, 9(11), 22E-trien-3 β -ol, sterols from *Clerodendrum inerme*. *Phytochemistry*. 63: 415-420.
- Pandey R., Ram K. Verma, Madan M. Gupta. (2005). Neo-clerodane diterpenoids from *Clerodendrum inerme*. *Phytochemistry*. 66: 643-648.
- Sharma A.K., Anand K.K., Pushpangadan P., Chandan B.K., Chopra C.L., Prabhakar Y.S., Damodaran N.P. (1989). Hepatoprotective effects of *Wedelia calendulacea*. *Journal of Ethnopharmacology*. 25: 93-102.
- Shin J.S., Park Y.M., Choi J.H., Park H.J., Shin M.C., Lee Y.S., Lee K.T. (2010). Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF-kappaB in RAW 264.7 murine macrophage cells. *International Immunopharmacology*. 10: 943-50.
- Shrivastava, N. and Patel, T. (2007). Clerodendrum and Healthcare. *Medicinal and Aromatic Plant Science Biotechnology*. 1:142-150.
- Srisook, K., Palachot, M., Mongkol, N. and Srisook, E. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF-KB activation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, 133; 1008-1014.
- Tunctan, B., Altug, S., Uludag, O., Demirkay, B., Abacioglu, N., (2003). Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacological Research* 48, 37-48.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E., 2000. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Research* 1, 67-72.
- Wijesundara, D.S.A. (2004). Inventory documentation and status of medicinal plants research in Sri Lanka. In Pons, B., Kanniah, J. et.al. (eds). *Medicinal Plants Research in Asia*, vol. 1: the framework and project workplans. International Plant Genetic Resources Institute-Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia.

- Wright, C. E., Rees, D.D., Moncada, S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*, 26, 48-57.
- Yates, L.LGórecki, , D.C. (2006). The nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): from a versatile transcription factor to a ubiquitous therapeutic target, *Acta Biochimica Polonica*. 53: 651-662.