



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด
มนุษย์ของส่วนสกัดจากใบขลุ่ยเพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ
เพื่อต้านภาวะหลอดเลือดแข็ง

(Study on anti-inflammatory and anti-oxidant activities on human
vascular endothelial cells of *Pluchea indica* leaf extracts for
development as anti-atherogenic health care product)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 693674

สัญญาเลขที่ 52/2561

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อหลอดเลือด
มนุษย์ของส่วนสกัดจากใบขลู่เพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ
เพื่อต้านภาวะหลอดเลือดแข็ง

(Study on anti-inflammatory and anti-oxidant activities on human
vascular endothelial cells of *Pluchea indica* leaf extracts for
development as anti-atherogenic health care product)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

พฤษภาคม พ.ศ. 2562

บทคัดย่อ

การอักเสบเรื้อรังและความเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญในการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งใน
ระยะเริ่มต้น ซึ่งภาวะหลอดเลือดแข็งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ การศึกษาก่อน
หน้านี้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากใบขลุ้แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำ
ด้วย LPS การวิจัยในครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาว่าใบขลุ้สามารถยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุลที่ใช้ในการยึด
เกาะของเซลล์ คือ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion
molecule-1 (VCAM-1) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ (EA.hy 926) ที่กระตุ้นด้วย TNF- α หรือไม่ ทำ
การสกัดใบขลุ้ด้วยเอทานอลและน้ำร้อน ส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำร้อนของใบขลุ้สามารถยับยั้งการ
แสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 จากนั้นทำการสกัดแยกส่วนส่วนสกัดน้ำร้อนได้ส่วนสกัดย่อยเฮ
กเซน (PIH) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต (PIE) และส่วนสกัดย่อยน้ำ (PIW) โดยพบว่า PIE แสดงฤทธิ์ต้านการ
อักเสบดีที่สุดในการยับยั้งโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ดังนั้นจึงทำการเลือก PIE ไปศึกษากลไกการต้าน
อักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย TNF- α PIE สามารถยับยั้งการแสดงออกของ
ICAM-1 และ VCAM-1 ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ยิ่งกว่านั้น PIE
ยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B โดยลดการฟอสโฟรีเลชันของ I κ B และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B
p65 นอกจากนี้ยังพบว่า PIE ไม่สามารถยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของ JNK, ERK and p38 mitogen-
activated protein kinases (MAPKs) การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่า PIE แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อ
หลอดเลือดโดยการยับยั้งวิถีสัญญาณ NF- κ B ดังนั้น PIE อาจนำไปใช้ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือ
เป็นองค์ประกอบของอาหารฟังก์ชันในการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

คำสำคัญ: ขลุ้ ฤทธิ์ต้านอักเสบ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด cell adhesion molecule

Abstract

Chronic vascular inflammation and oxidative stress play an important role in the initiation and development of atherosclerosis which is a major cause of the most cardiovascular diseases (CVDs). Previous studies demonstrated anti-inflammatory effect of the extract from *Pluchea indica* in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. The aim of this research was to determine whether *P. indica* leaves inhibits the expression of cell adhesion molecule, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in TNF- α -stimulated human vascular endothelial cells (EA.hy 926 cell line). *Pluchea indica* leaves were extracted by ethanol and hot water. The ethanolic and hot water extract from *P. indica* leaves showed an inhibitory effect on the expression of ICAM-1 and VCAM-1 proteins. Then, the hot water leaf extract from *P. indica* was fractionated to hexane (PIH), ethyl acetate (PIE) and water (PIW) fractions. Among them, PIE showed the most potent anti-inflammatory effect on ICAM-1 and VCAM-1 expressions. Thus, PIE was selected to clarify the mechanism underlying anti-inflammatory action in TNF- α -stimulated endothelial cells. PIE also inhibited the expression of ICAM-1 and VCAM-1 protein and mRNA in a concentration-dependent manner. Moreover, PIE blocked nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation by suppressing the phosphorylation of inhibitory κ B (I κ B) and nuclear translocation of NF- κ B p65. Furthermore, PIE did not suppress phosphorylation of JNK, ERK and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs). These findings indicate PIE exerts anti-vascular inflammatory activity in endothelial cells by inhibiting blocking NF- κ B signaling pathway. Therefore, PIE might be considered as a dietary supplements and an ingredients of functional food for preventing an early step of atherosclerosis.

Keywords: *Pluchea indica*, anti-inflammatory, endothelial cell, cell adhesion molecule

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำ
วิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ นางสาว
กมลพร โปธิประสาท และนางสาวเพชรรัตน์ ไสว สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
บทนำ	7
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลองและอภิปราย	22
สรุปผลการทดลอง	34
บรรณานุกรม	35
ผลผลิตของโครงการวิจัย	38
ประวัตินักวิจัย	39

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	ความเป็นพิษต่อเซลล์ human endothelial cells EA.hy926 ด้วยสารสกัดน้ำ ของใบชาขลุ่ยและสารสกัดเอทานอลของใบชาขลุ่ย	27
รูปที่ 2	ผลของสารสกัดเอทานอลจากใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1	29
รูปที่ 3	ผลของสารสกัดน้ำจากใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ที่ความเข้มข้น 12.5-50 µg/ml	30
รูปที่ 4	ผลของสารสกัดน้ำจากใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ที่ความเข้มข้น 50-200 µg/ml	31
รูปที่ 5	ผลของส่วนสกัดย่อยของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1	32
รูปที่ 6	ผลของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน หรือ PIH และเอทิลอะซิเตต หรือ PIE ของ สารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1	33
รูปที่ 7	ผลของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน หรือ PIH และเอทิลอะซิเตต หรือ PIE ของ สารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อปริมาณ mRNA ของ ICAM-1 และ VCAM-1	34
รูปที่ 8	ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน p-IKB	36
รูปที่ 9	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน MAPKs ด้วยวิธี Western blot	37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable diseases หรือโรค NCDs) เป็นกลุ่มโรคที่กำลังคุกคามชีวิตและสุขภาพของประชากรทั่วโลก องค์การอนามัยโลก (WHO) ระบุว่า ในปี พ.ศ. 2552 ประมาณ 63% ของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกมีสาเหตุมาจากกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังนี้ และยังเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรไทยอีกด้วยโดยคิดเป็น 73% ของการเสียชีวิตของประชากรไทยทั้งหมดในปี 2552 ตามรายงานสถิติสาธารณสุขของไทย เมื่อประเมินเป็นมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจมีค่าถึง 200,000 ล้านบาทต่อปี กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง (อัมพฤกษ์และอัมพาต) รวมทั้งโรคเบาหวาน เป็นกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญ มีอัตราผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตสูงในอันดับต้นๆ ของกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, ม.ป.ป.) ข้อมูลเปรียบเทียบในรอบ 8 ปี จากปี 2550 ถึงปี 2557 พบว่าอัตราการป่วยด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเพิ่มสูงขึ้น โดยสถิติในปี 2557 มีดังนี้ โรคความดันโลหิตสูงจาก 1,710.89 ต่อประชากรแสนคน โรคหัวใจขาดเลือด 407.70 ต่อประชากรแสนคน โรคหลอดเลือดสมอง 352.30 ต่อประชากรแสนคน และโรคเบาหวาน 1,032.50 ต่อประชากรแสนคน (สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค, ม.ป.ป.) สาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงของโรคกลุ่มนี้มาจากการไม่ดูแลสุขภาพตัวเอง เช่น พักผ่อนไม่เพียงพอ เครียด ไม่ออกกำลังกาย และรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลและไขมันสูง แต่รับประทานผักผลไม้ไม่เพียงพอ (สถาบันวิจัยโรคเรื้อรัง, 2552; ศกสรรณ แก้วกลิ่น และนิตยา พันธุเวท, มปป) นอกจากนี้ยังมีภาวะชราภาพเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเหล่านี้ รวมทั้งโรคเบาหวาน กำลังเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไข เนื่องจากเป็นโรคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง และมีโอกาสเกิดความพิการตามมา ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วย ครอบครัวและประเทศชาติ ทั้งในแง่การเสียรายได้ของตัวบุคคล องค์กร และใช้งบประมาณของประเทศในการดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วยซึ่งมาจากต่างประเทศปี

หลายพันล้านบาท แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดคือปรับเปลี่ยนพฤติกรรม และดูแลตนเองมากขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีบรรณคดีให้มีการรักษาสุขภาพให้แข็งแรง เช่น การออกกำลังกาย การเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์

ภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) เป็นภาวะที่นำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดต่างๆ รวมทั้งการเกิดอาการแทรกซ้อน (complication) ในผู้ป่วยเหวน และยังพบในภาวะชราภาพ (ageing) สูงกว่าช่วงวัยอื่น สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง คือการอักเสบเรื้อรังของหลอดเลือด (Libby, 2002; Stoner et al., 2013) ร่วมกับภาวะไขมันในเลือดสูง และภาวะที่เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือด (endothelial dysfunction) เมื่อมีสิ่งกระตุ้นให้มีการอักเสบ เซลล์เยื่อหลอดเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงให้มีการสังเคราะห์ pro-inflammatory cytokines และ cell adhesion molecule เพิ่มขึ้น ทำให้มีการเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาว (leukocyte emigration) มายังบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้เซลล์เยื่อหลอดเลือดยังมีความเครียดจากออกซิเดชันเพิ่มขึ้นจากการสังเคราะห์ superoxide radical อันจะนำไปสู่การเพิ่มการอักเสบและภาวะหลอดเลือดแข็งได้มากขึ้น ในอดีตที่ผ่านมาการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งทำโดยความพยายามลดปริมาณไขมันในเลือด แต่ก็ยังมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งถึง 70-80% (Charo and Taub, 2011) จากข้อมูลในปัจจุบันที่พบว่าการอักเสบเรื้อรังและภาวะความเครียดจากออกซิเดชันเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาสารที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบของหลอดเลือดและต้านออกซิเดชัน เพื่อนำมาใช้ป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

ปัจจุบันความนิยมในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่างๆ มีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสุขภาพที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากแนวโน้มการใช้ชีวิตแบบใส่ใจสุขภาพของคนรุ่นใหม่ และการเตรียมความพร้อมในการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (ageing society) โดยในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารถึง 7 % มูลค่าของตลาดมีมากกว่า 100,000 ล้านบาทต่อปีจากการจำหน่ายทั้งในประเทศและนอกประเทศ (ข่าวสภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย, 2559) อย่างไรก็ตาม การศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดใหม่ๆ ที่มีพืชสมุนไพรเป็นส่วนผสมที่สำคัญ ยังคงมีความจำเป็นเพื่อให้มีการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพิ่มขึ้น และทำให้ประชาชนมีทางเลือกใน

การรักษาแบบป้องกัน (chemopreventive therapy) ได้มากยิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยเล็งเห็นศักยภาพของต้นขลุ (Pluchea indica Less.) ในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เนื่องจากขลุมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย อาทิ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ glucosidase (Sen et al., 2002; Choi and Hwang, 2005; Biswas et al., 2007; Roslida et al., 2008; Srisook et al., 2012; Arsiningtyas et al., 2014) ในปัจจุบันมีการผลิตชาใบขลุโดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำลูก จัหวัดจันทบุรี ซึ่งมีกรรมวิธีการผลิตแบบดั้งเดิมที่เฉพาะตัว กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชาใบขลุมาอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าสารสกัดน้ำจากใบชาขลุมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านอักเสบในหลอดทดลอง (Srisook et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบขลุมีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยง และในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำการอักเสบด้วย carrageenan (Buapool et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มี การรายงานผลของขลุต่อการอักเสบและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดเลือด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดจากชาใบขลุในการต้านอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อหลอดเลือด และกลไกในการแสดงฤทธิ์นี้เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านจากขลุในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของหลอดเลือด เพื่อใช้ป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง โดยเฉพาะโรคหัวใจและหลอดเลือด เพื่อลดการนำเข้ายาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากต่างประเทศ และอาจนำไปสู่รายได้เข้าประเทศ นอกจากนี้จะทำการแยกสารประกอบในชาใบขลุที่เป็นสารออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นสารที่ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบขลุที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ของส่วนสกัดจากชาใบขลุ
2. เพื่อศึกษากลไกระดับโมเลกุลของการต้านการอักเสบของส่วนสกัดจากชาใบขลุในเซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำส่วนสกัดน้ำจากขาใบขลุ่ยมาทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ โดยใช้เซลล์ไลน์ EA.hy926 เป็นโมเดลในการศึกษา นำความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไปใช้ในศึกษาต่อไป

ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด โดยศึกษาผลของส่วนสกัดต่อปริมาณโปรตีน และ mRNA ของโมเลกุลที่เป็น Inflammatory biomarkers ได้แก่ intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1)

ศึกษาผลของส่วนสกัดจากใบขลุ่ยต่อการกระตุ้นวิถี NF- κ B โดยศึกษา nuclear translocation ของ NF- κ B และปริมาณ p-I κ B

ศึกษาผลของส่วนสกัดจากใบขลุ่ยต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ MAPKs ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวะหลอดเลือดแข็งเป็นผลมาจากการอักเสบเรื้อรังของหลอดเลือด นำไปสู่โรคในกลุ่มหัวใจและหลอดเลือดอันเป็นส่วนหนึ่งของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ในขณะที่เกิดการอักเสบจะมีการเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากเซลล์เยื่อหลอดเลือดมีการสังเคราะห์โมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะกับเม็ดเลือดขาวมากขึ้น โมเลกุลเหล่านี้ คือ ICAM-1, VCAM-1 และ E-selectin การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวออกมาบริเวณที่มีการอักเสบนี้ เป็นขั้นตอนสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ นอกจากนี้เซลล์เยื่อหลอดเลือดในบริเวณที่มีการอักเสบจะสังเคราะห์ inflammatory cytokine IL-1 β ที่เป็นสารที่ส่งสัญญาณให้เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มขึ้น และยังทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด ส่งผลให้มีการผลิต superoxide สูงขึ้น ดังนั้นถ้ามีสารที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุล ICAM-1, VCAM-1 และ E-selectin จะช่วยลดการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาวกับเซลล์เยื่อหลอดเลือด ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดน้อยลงและเกิดการอักเสบน้อยลง การลดการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase จะช่วยทำให้ปริมาณ superoxide และ reactive species ชนิดอื่นลดลงด้วย ทำให้ลดออกซิเดชันบนโมเลกุล LDL (ปัจจัยร่วมที่ทำให้เกิดการสะสมของคราบไขมันในบริเวณที่มีการอักเสบ) และยังทำให้ปริมาณชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดเพิ่มขึ้น คณะผู้วิจัยเห็นว่าส่วนสกัดจากใบขลุ่ยแสดงฤทธิ์การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 รวมทั้งลดการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPKs ในเซลล์แมคโครฟาจ ดังนั้นส่วนสกัดจากใบขลุ่ยอาจจะลดการแสดงออกและการทำงานของโปรตีน ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, IL-1 β และ NADPH oxidase ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ได้ เนื่องจากการแสดงออกของโมเลกุลเหล่านี้ถูกควบคุมโดยการทำงานของ NF- κ B และ MAPKs ส่งผลทำให้ลดการอักเสบของหลอดเลือดและลดโอกาสเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งรวมทั้งลดอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดและหัวใจต่างๆ ในที่สุด

ภาวะหลอดเลือดแข็ง เป็นภาวะที่มีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดจากคราบสะสมไขมันและการเกิดพังผืด (Fibrosis) ก่อให้เกิด atherosclerotic plaque เกาะบริเวณภายในผนังหลอดเลือด ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดคือ การมีระดับ LDL-คอเลสเตอรอล ในกระแสเลือดสูง ทำให้มีการเคลื่อนของ LDL ผ่านผนังหลอดเลือดออกมายังบริเวณชั้นใต้ผนังหลอดเลือด หรือชั้น intima ได้มากขึ้น LDL-คอเลสเตอรอลที่อยู่ในกระแสเลือดสามารถแทรกผ่านเยื่อผนังหลอดเลือดได้ดี นอกจากนี้มีปัจจัยบางประการที่เอื้อให้ LDL ออกมานอกหลอดเลือดได้มากขึ้น เนื่องจากมีความเสียหายของชั้นเยื่อผนังหลอดเลือด ซึ่งมีสาเหตุมาจากความดันโลหิตสูง การสูบบุหรี่ โรคเบาหวาน มีการติดเชื้อหรือการอักเสบเกิดขึ้น และเมื่อ LDL เข้าไปในผนังหลอดเลือดแล้วจะถูกออกซิไดซ์เกิด lipid peroxidation ที่กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบของ LDL โดยอนุมูลอิสระที่ผลิตขึ้นภายในผนังหลอดเลือด เป็น oxidized-LDL ซึ่งจะถูกจับกินโดยเซลล์ macrophage อย่าง จากนั้น oxidized-LDL ที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์ macrophage จะถูกสะสมไว้ในเซลล์ ในลักษณะเป็นหยดไขมันเล็กๆ เมื่อมีปริมาณมากขึ้น เซลล์จะเปลี่ยนไปเป็น foam cell (Cholesterol-rich macrophage) ภายใน foam cell จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยผลิสารต่างๆ ดังนี้ในปริมาณที่มากขึ้น เช่น มีการผลิตอนุมูลอิสระ, cytokine และเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) สาร cytokine ที่ถูกหลั่งออกมาจะทำให้มีเซลล์เม็ดเลือดขาว monocyte เข้ามายังบริเวณนี้มากขึ้น และเปลี่ยนเป็น macrophage จากนั้นจะกลืนกิน oxidized-LDL ที่มีมาก เมื่อ foam cell ตายทำให้มีการสะสมของเซลล์บริเวณนี้มากขึ้นเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า fatty streak และมีพังผืดเกิดขึ้นคลุมเซลล์ที่ตายรวมทั้งเศษเนื้อเยื่อที่ได้จากการสลายเซลล์ที่ตาย นั่นคือการเกิด plaque ที่บริเวณรอยโรคเอนไซม์ MMP ที่หลังจาก foam cell จะย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ทำให้มีการแตกหรือฉีกขาดของ plaque จึงเกิดการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่บริเวณ plaque เกร็ดเลือดเหล่านี้จะหลั่งสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด เช่น platelet-derived growth factor (PDGF) การเกิด plaque เป็นขั้นตอนที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และไฟโบรบลาสต์ ส่วนเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดก็จะหลั่งสารที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบออกมารวมทั้งสารที่ชักนำให้เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocytes เข้ามารวมกันมากขึ้น และถูกกระตุ้นให้เจริญไปเป็น macrophage ส่งเสริมให้รอยโรคนี้นขยายใหญ่และลุกลามเข้าไป

ทางด้านในของหลอดเลือด ทำให้ทางเดินของเลือดเล็กลง เนื้อเยื่อปลายทางขาดอาหารและออกซิเจน ส่งผลทำให้เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดรุนแรงหรือกล้ามเนื้อหัวใจตาย รวมทั้งเกิดเส้นเลือดในสมองอุดตัน (Bhagavan, 2015)

เมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด คือ มีการขยายตัวของหลอดเลือด และมีการเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเองก็มีการเปลี่ยนแปลงเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ทำให้มีการรั่วของโปรตีนและสารน้ำออกนอกหลอดเลือด รวมทั้งมีการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวออกนอกหลอดเลือด (leukocyte extravasation) มายังบริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้น เพื่อจะทำการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ก่อให้เกิดการอักเสบและอันตรายต่อเนื้อเยื่อ การเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาวเริ่มต้นจากการที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (adhesion) ได้แน่นขึ้น และเคลื่อนตัวผ่านช่องรอยต่อระหว่างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดออกมานอกหลอดเลือด (transmigration) กระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยโมเลกุลที่อยู่บนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด คือ adhesion molecule เช่น intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1), และ E-selectin เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผ่านออกมาอยู่บริเวณที่มีการอักเสบจะหลั่ง inflammatory cytokine เช่น $IL-1\beta$ และ $TNF-\alpha$ ออกมา และกลับไปทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสังเคราะห์ adhesion molecule เพิ่มขึ้นรวมทั้งกระตุ้นให้มีการผลิต inflammatory cytokine มากขึ้น (Stoner et al., 2013) จึงมีเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาบริเวณรอยโรคมากขึ้น นอกจากนี้ทั้งเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการผลิต superoxide radical จากเอนไซม์ NADPH มากขึ้น (Nathan and Cuninghame-Bussel, 2013) ยิ่งทำให้มีการออกซิไดซ์โมเลกุล LDL-คอเลสเตอรอล เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการพัฒนาการเกิด atherosclerotic plaque มากขึ้นและนำไปสู่ภาวะหลอดเลือดแข็งในที่สุด

มีการรายงานที่ TNF- α กระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ชนิดหนึ่งภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและก่อให้เกิดการแสดงออกของ ICAM-1, VCAM-1, E-selectin และ pro-inflammatory cytokines (Rahman et al., 2002; Hung et al., 2014)

ในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จับกับโปรตีน inhibitor of κ B (IKB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF- κ B ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นจะเกิดการจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor) ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ inhibitor of κ B kinase (IKB kinase) ทำให้เกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) จากนั้น IKB จะถูกทำลายด้วยการกระบวนการ proteasome-mediated proteolytic ทำให้ NF- κ B อยู่ในรูป heterodimer ของ p65 ที่รวมกับ p50 หรือ p52 (Tak and Firestein, 2001) ทำให้สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF- κ B binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน

นอกจาก NF- κ B ยังมี transcription factor ชนิดอื่น เช่น AP-1 ที่ควบคุมการแสดงออกของ ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ (Yan et al., 2015) ซึ่ง AP-1 นี้มี upstream signaling มาจาก MAPKs (Hung et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ reactive species เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโมเลกุล ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด (Cook-Mills et al., 2011) แหล่งของ superoxide และ reactive species ที่สำคัญภายในเซลล์ คือ การผลิตโดยเอนไซม์ NADPH oxidase (NOX) เอนไซม์ NOX2 และ NOX4 เป็นรูปเอนไซม์ NADPH oxidase หลักที่ผลิต superoxide ภายในเซลล์เยื่อหลอดเลือด มีการรายงานที่เอนไซม์ NADPH oxidase นี้ถูกกระตุ้นได้ด้วย TNF- α และถูกควบคุมการแสดงออกโดย NF- κ B (Yan et al., 2015)

ขลุ้ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอบนบป่าชายเลน เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้วยสมุนไพรในทุกละเอียดของต้น เช่น การใช้ขลุ้ทั้งต้นต้มน้ำแล้วนำน้ำมาดื่ม สามารถรักษาอาการ ชัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ใบของขลุ้ใช้แก้ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้จับแห่ง และแก้เบาหวาน ใบขลุ้ที่ผึ่งแห้ง หรือคั่วแห้งแล้ว มาทำเป็นชาขลุ้ขงดื่มเพื่อลดน้ำหนักตัว ลดระดับน้ำตาลในเลือด บรรเทาอาการปวดเมื่อย ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ เปลือกต้นของ

ขลุ่ยนิยมนำมาต้มกับน้ำเพื่อเอาไอน้ำใช้ในการบรรเทาอาการอักเสบของริดสีดวงทวาร ขูดผิวด้านนอกออก ให้เหลือเปลือกบางๆ ชั้นในไม่ให้เห็นติดกัน ล้างให้สะอาดทำเป็นเส้นคล้ายเส้นยาสูบตากแดดให้แห้ง มวนใบยาหรือใบตองแห้งสูบแก้ริดสีดวงจมูก ดอกของขลุ่ย ใช้ต้มกับน้ำเพื่อต้มในการขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะ (พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย, 2549)

ขลุ่ยเป็นพืชที่ถูกลำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ เช่น ส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ย แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของอุ้งมือหนูที่ถูกกระตุ้นโดย arachidonic acid, platelet activation factor หรือ compound 48/80 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ย มีฤทธิ์ป้องกันแผลเย็บอุกระเพาะอาหารของหนูที่ได้รับเอทานอล และ indomethacin (Sen et al., 1993) ในปี 2002 ผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ย แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยการเหนี่ยวนำของ hydrogen peroxide ยับยั้งการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดย carbon tetrachloride และยับยั้งการอักเสบของอุ้งมือหนูที่ถูกกระตุ้นโดย glucose oxidase (Sen et al., 2002) ส่วนสกัดเมทานอลของใบขลุ่ยมีฤทธิ์ลดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้มากกว่า 50% (Choi และ Hwang, 2005)

Biswas et al. (2006) รายงานผลของสารบริสุทธิ์ R/J/3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ย พบว่าสาร R/J/3 ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อโปรโตซัว *Entamoeba histolytica* สายพันธุ์ HM1 และสามารถทำให้ trophozoites ของเชื้อโปรโตซัวนี้แตก สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ย คือ β -sitosterol และ stigmasterol แสดงฤทธิ์ในการต้านพิษงูในหนูที่ได้รับพิษงูแมวเซา โดยยับยั้งอัตราการตายจากพิษงู และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูแมวเซา ในปี ค.ศ. 2008 Ohtsuki และคณะ สกัดสาร quinic acid ester และ quercetin จากใบของต้นขลุ่ย และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ในขณะที่สาร quinic acid ester ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 และ matrix metalloproteinase-9

ในปี ค.ศ. 2012 Srisook และคณะ ได้รายงานว่าส่วนสกัดน้ำร้อนจากใบชาชูลู่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในระดับหลอดทดลอง และยังสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังทำการศึกษาพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบชูลู่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบทั้งในระดับเซลล์แมโครฟาจเพาะเลี้ยงและในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยส่วนสกัดจากใบชูลู่ไปลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ผ่านทางการยับยั้งวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPKs (Buapool et al., 2013)

สารประกอบเคมีที่พบในใบชูลู่ประกอบด้วย terpenes, terpenic glycosides, benzenoids, phenyl propanoids, lignans glycosides, steroids, , caryophyllene oxide, sabinene, limonene, α -carene, azulene, Cis-caryophyllene, α -humulene , isopropyl myristate and γ -cadinene, stigmasterol, stigmasterol glycoside, 2-(Prop-1-ynyl)-5(5,6-dihydroxyhexa-1, 3-diyanyl)-thiophene, และcatechin (Uchiyama et al., 1989; 1991; Karttisi, 2002; Biswas et al., 2005; Traithip, 2005).

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมใบขลุ้และการสกัดสารจากใบขลุ้

ชาใบขลุ้ที่ใช้เตรียมโดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อ.ขลุ้ จ.จันทบุรี จากนั้นนำไปดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร นำใบชาขลุ้ที่บดละเอียด มาต้มในน้ำเดือด ในอัตราส่วน 1: 10 นาน 30 นาที ก่อนกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดลดความดันที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำผงใบขลุ้ไปต้มในน้ำเดือดซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสกัดน้ำของใบขลุ้มาทำการระเหยน้ำด้วยเครื่อง lyophilizer ตามวิธีที่รายงานโดย Srisook et al. (2012) จัดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบขลุ้โดยวิธี MTT

เซลล์ที่ใช้ศึกษา คือ เซลล์ไลน์ EA.hy926 ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ (human umbilical vein endothelial cells) ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

จากนั้นทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของส่วนสกัดต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อนำช่วงความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบในการทดลองต่อไป วิธีการโดยย่อ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook et al., 2015) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สาร

ทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.3 การทดสอบการต้านอักเสบในหลอดเลือดของสารสกัดจากใบขลุ่ย

ให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ EA.hy926 สัมผัสกับ TNF- α เพื่อจำลองการอักเสบของหลอดเลือด และให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัด ก่อนทำการวิเคราะห์โปรตีนและ mRNA ของ inflammatory biomarkers คือ ICAM-1 และ VCAM-1 โดยเทคนิค Western blot และ real time-reverse-transcription polymerase chain reaction (real time-RT-PCR) ตามลำดับ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real time-RT-PCR โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัดในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และสกัด RNA ทั้งหมด ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A₂₆₀ เท่ากับ 40 μ g/mL ของ RNA สังเคราะห์ cDNA จาก RNA ทั้งหมดที่ได้การทำปฏิกิริยากับ 5x RT supermix ซึ่งประกอบด้วย (iScript MMLV-RT (RNaseH+), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primer, buffer, MgCl₂) ปริมาตร 4 μ l และเติมน้ำที่ปราศจาก Nuclease ปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 25 °C นาน 5 นาที, 42 °C นาน 30 นาทีและ 82 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่จะทดสอบ และ GAPDH ปฏิกริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย (2X) iTaq™ Universal SYBR® Green supermix [antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers และ blend of passive reference dyes] จำนวน 10 μ l, 10 μ M Forward primer จำนวน 0.5 μ l, 10 μ M Reverse primer จำนวน 0.5 μ l, cDNA ที่สังเคราะห์ จำนวน 2 μ l และปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase ในสภาวะที่เหมาะสม ในปฏิกริยา Real-time PCR ของยีนเป้าหมายและ GAPDH และวิเคราะห์หา cycle of threshold

(Ct) ของแต่ละปฏิกิริยาจากนั้นนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณหาโดยเปรียบเทียบเชิงสัมพัทธ์กับตัวอย่างควบคุม ตามสมการด้านล่าง

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ตัวอย่างทดสอบ}) - \Delta Ct (\text{ตัวอย่างควบคุม})$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ of target gene} - Ct \text{ of housekeeping gene}$$

ในการศึกษานี้ใช้ GAPDH เป็น housekeeping gene ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

การทดสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธี Western blot analysis โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี ส่วนสกัดในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% (v/v) SDS, 1% (v/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40] ปริมาตร 50 μL ที่เติมสารละลาย 1X protease inhibitors จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอด พลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อน นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ ก่อนหยอดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า คงที่ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนจะย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่าง ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมา

บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย anti-mouse IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีนเป้าหมาย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ในการศึกษาที่ใช้ GAPDH เป็น housekeeping protein ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.4 การทดสอบผลของส่วนสกัดจากไขขลุ่ต่อการกระตุ้นวิถี NF- κ B

วิถี NF- κ B เป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของยีนสำหรับ inflammatory biomarkers คือ ICAM-1 และ VCAM-1 การทดสอบผลของส่วนสกัดจากไขขลุ่ต่อการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดจากไขขลุ่ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนใส่ TNF- α เป็นระยะเวลา 30 นาที และแยกโปรตีนจาก cytosolic extract และ nuclear extract ตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Buapool et al. (2013) วัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay วิเคราะห์ปริมาณ p-I κ B โดยวิธี Western blot analysis และเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้จากสภาวะที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ กับสภาวะที่เติมสารสกัด

3.5 การทดสอบผลของส่วนสกัดจากไขขลุ่ต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs

วิถี MAPKs เป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของยีนสำหรับ inflammatory biomarkers จึงทำการศึกษามลของสารทดสอบต่อการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ MAPKs โดยใช้เทคนิค Western blotting

analysis โดยใช้แอนติบอดี anti-pERK, anti-pJNK, anti-p-p38 MAPK, anti-total ERK, anti-total JNK, anti-total p38 MAPK ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

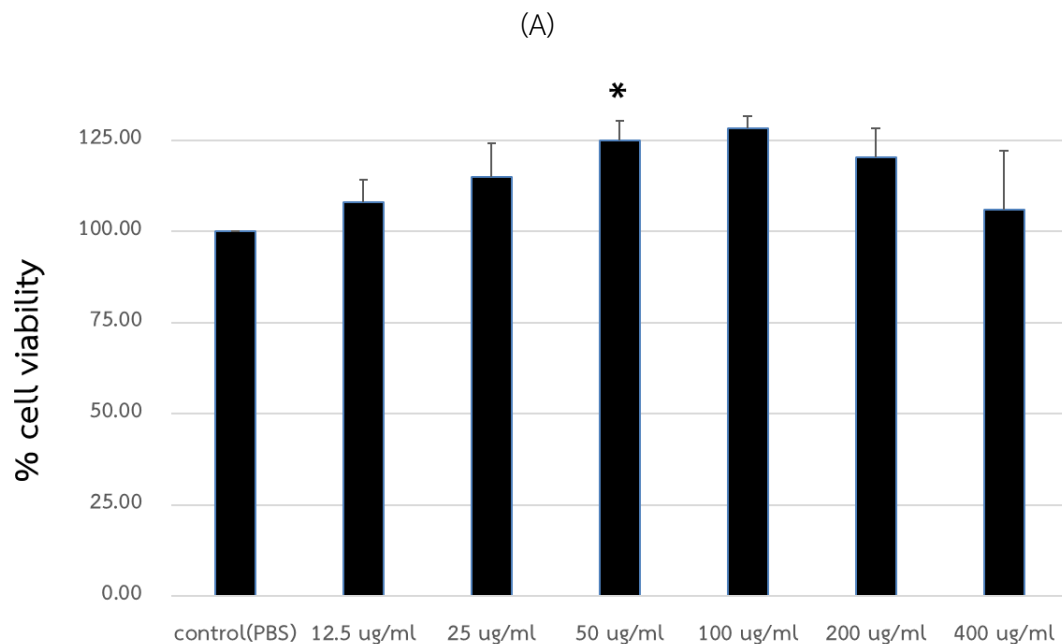
ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

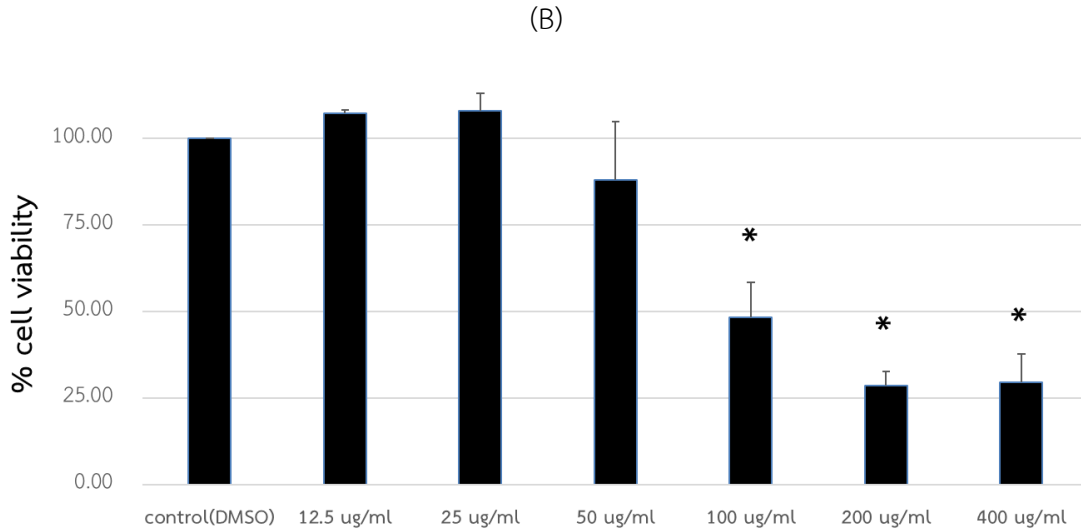
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลของส่วนสกัดจากขลุ่ยต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7

สารสกัดจากเอทานอลและสารสกัดน้ำ เมื่อสกัดสารแล้วจึงนำสารมาทดสอบความเป็นพิษต่อ human endothelial cells EA.hy926 ที่ความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มเซลล์ที่ 37°C พบว่าสารสกัดจากน้ำทุกความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay ในขณะที่สารสกัดจากเอทานอลตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการทดสอบถัดไปใช้ความเข้มข้นของสารสกัดไม่เกิน 50 $\mu\text{g/ml}$



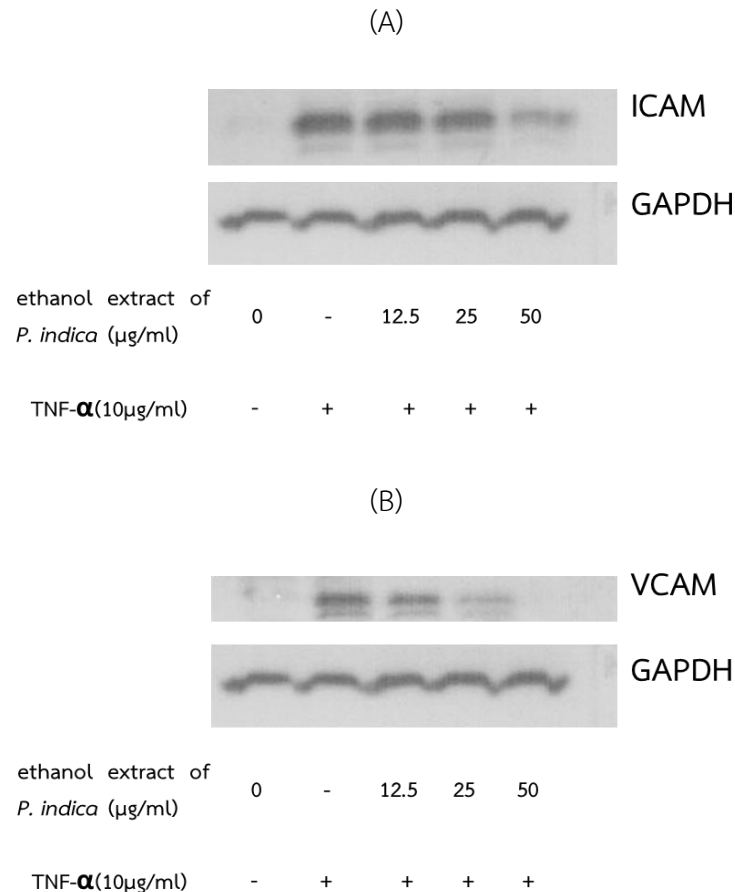


รูปที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ human endothelial cells EA.hy926 ด้วยสารสกัดน้ำของใบชาขลุ่ย (A) และ สารสกัดเอทานอลของใบชาขลุ่ย (B) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-400 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมา ตรวจสอบผลด้วย MTT assay * $P < 0.05$ vs control

4.2 ผลของส่วนสกัดจากขลุ่ยต่อการแสดงออกของ ICAM-1 และ VCAM-1

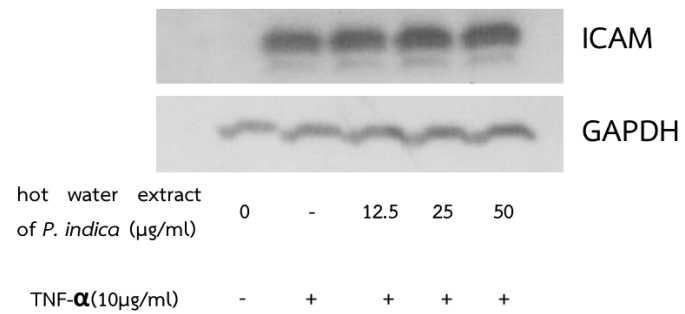
เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เรียบร้อยแล้ว จึงทำการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอักเสบของ สารสกัดจากใบชาขลุ่ยทั้งสองโดยใช้เทคนิค Western blot เริ่มจากการทดสอบสารสกัดทั้งสองกับ endothelial cells EA.hy926 โดยทำการบ่มสารสกัดทั้งสองกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 0, 12.5, 25, และ 50 $\mu\text{g/ml}$ (เลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์) นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบ ด้วย $\text{TNF-}\alpha$ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์ที่ได้รับการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ ทดสอบมาสกัดโปรตีน พบว่าเซลล์ที่สัมผัส $\text{TNF-}\alpha$ เพียงอย่างเดียวทำให้มีระดับโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ ส่วนสารสกัดเอทานอลที่ความ เข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 ในขณะที่สารสกัดน้ำใบ ชาขลุ่ยที่ความเข้มข้น 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถลดโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3 แต่

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดน้ำใบชาขลุ้เป็น 50-200 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดน้ำใบชาขลุ้ที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 ได้ แต่ไม่สามารถลดปริมาณโปรตีน VCAM-1 (รูปที่ 4) จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบขลุ้แสดงความสามารถในการต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของเราที่แสดงถึงฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลุ้ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Buapool et al., 2013)

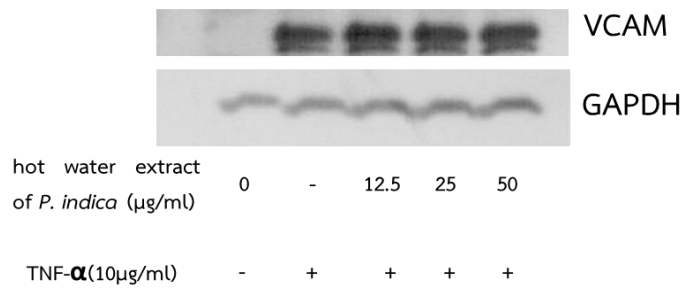


รูปที่ 2 ผลของสารสกัดเอทานอลจากใบชาขลุ้ต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ทำการบ่มสารสกัดกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยใช้เทคนิค western blot

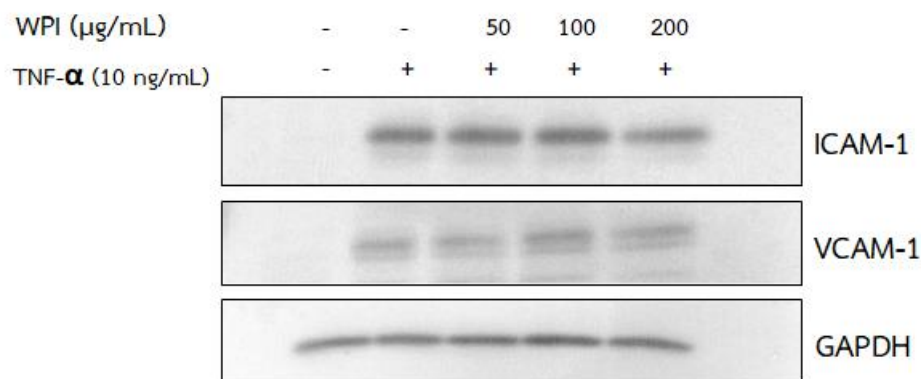
(A)



(B)



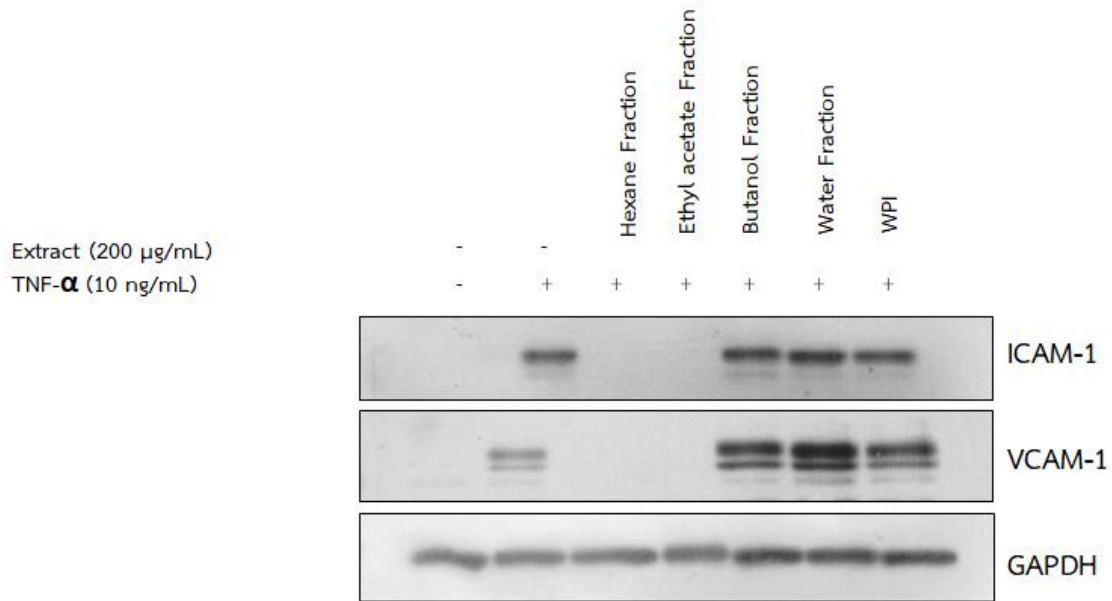
รูปที่ 3 ผลของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ทำการบ่มสารสกัดกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5-50 µg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยใช้เทคนิค western blot



รูปที่ 4 ผลของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ทำการบ่มสารสกัดกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 50-200 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยใช้เทคนิค western blot

จากผลการทดลองในรูปที่ 4 พบว่าสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ มีแนวโน้มที่สามารถลดโปรตีน ICAM-1 ได้ จึงนำสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ มาสกัดแยกส่วนย่อยด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ ได้เป็นส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (PIH) เอทิลอะซิเตต (PIE) บิวทานอล (PIB) และน้ำ (PIW)

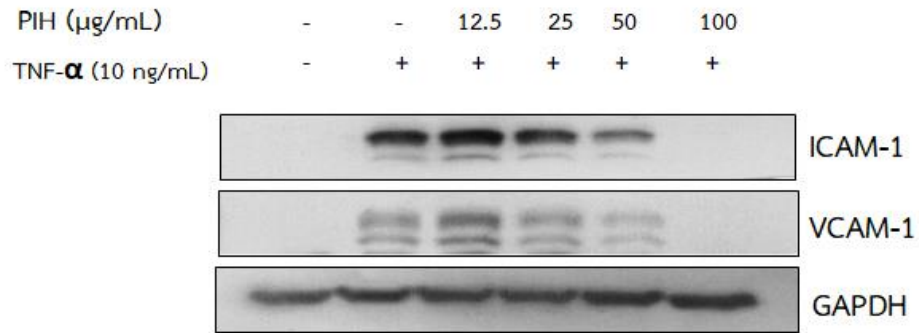
นำส่วนสกัดย่อยทั้ง 4 ส่วนมาทดสอบผลของส่วนสกัดย่อยจากใบชาขลุ่ต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 พบว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยบิวทานอลและน้ำของใบชาขลุ่ไม่สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ (รูปที่ 5)



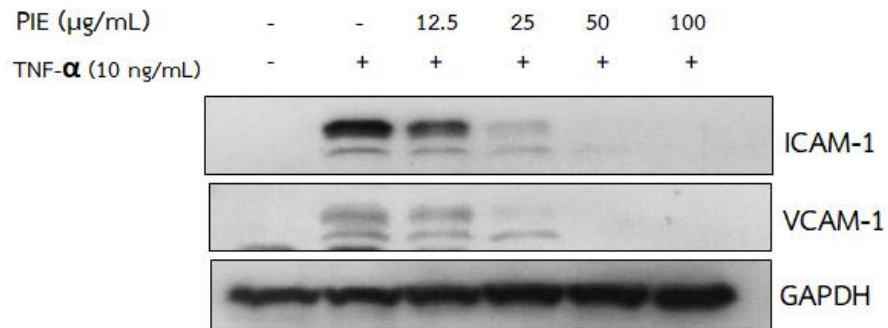
รูปที่ 5 ผลของส่วนสกัดย่อยของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ต่อปริมาณโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ทำการบ่มสารสกัดกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยใช้เทคนิค western blot PIH = ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน, PIE = ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต, PIB = ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล, และ PIW = ส่วนสกัดย่อยน้ำของใบชาขลุ่, HPI = สารสกัดน้ำใบชาขลุ่

ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต พบว่าทั้งสองส่วนสกัดสามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัดย่อย (รูปที่ 6) โดยที่ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซน

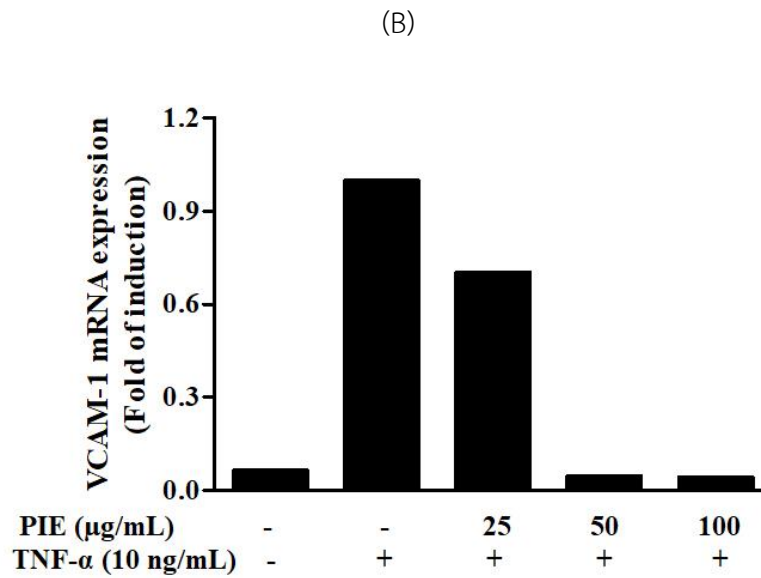
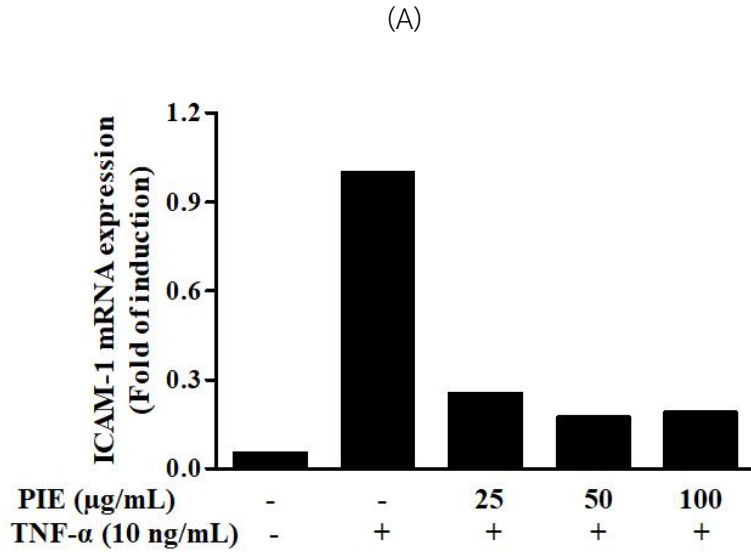
(A)



(B)



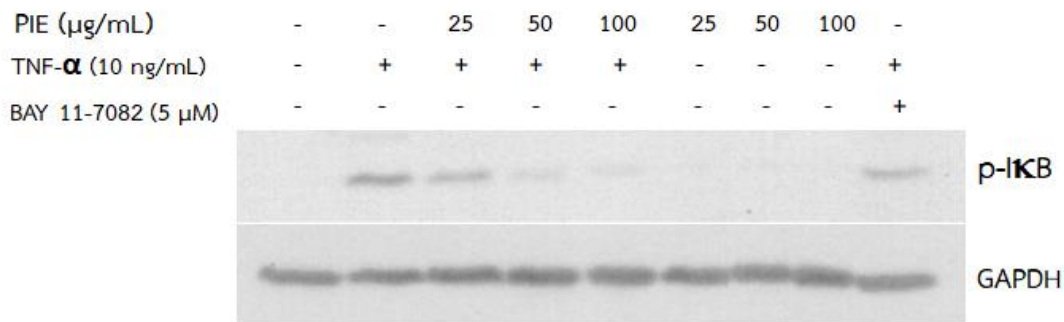
รูปที่ 6 ผลของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน หรือ PIH (A) และเอทิลอะซิเตต หรือ PIE (B) ของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ต่อ ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ทำการบ่มสารสกัดกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5-100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยใช้เทคนิค western blot



รูปที่ 7 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต (PIE) ของสารสกัดน้ำใบชาลู่ต่อปริมาณ mRNA ของ ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ทำการบ่มสารสกัดกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5-100 µg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ mRNA ของ ICAM-1 และ VCAM-1 โดยใช้เทคนิค Realtime-RT-PCR

4.3 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อการกระตุ้น NF- κ B

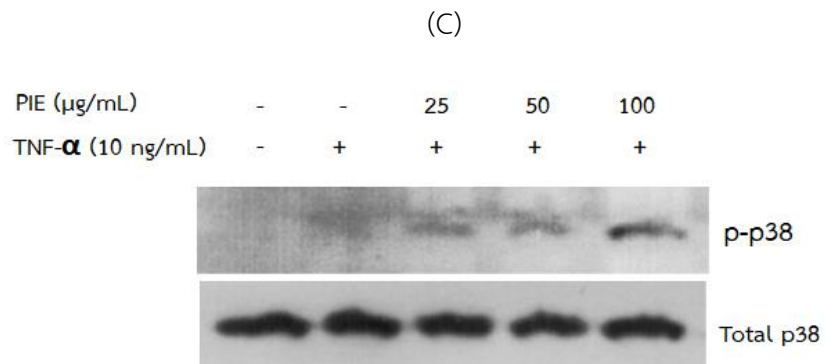
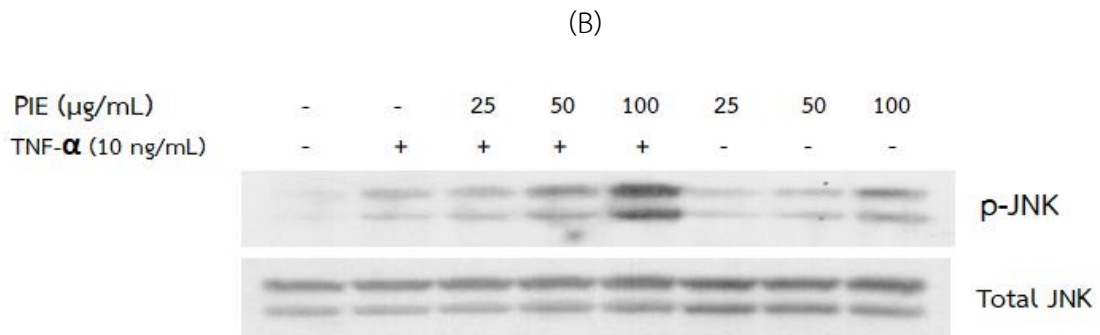
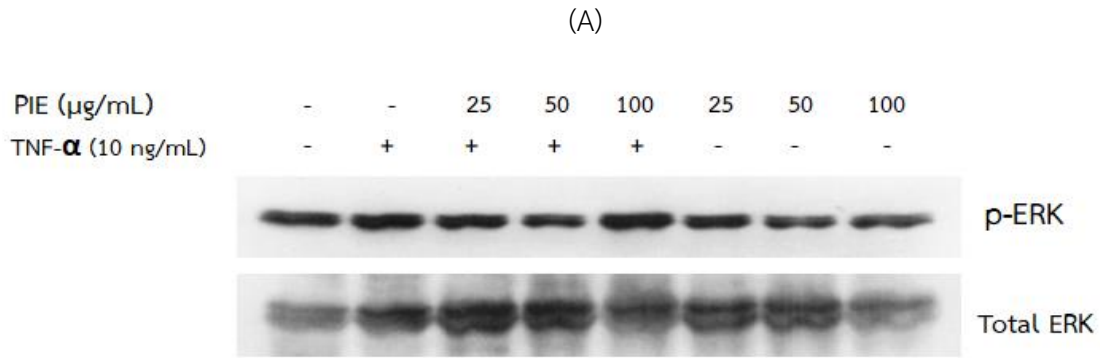
วิธีการส่งสัญญาณ NF- κ B เป็นวิถีหลักในควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย TNF- α (Chen et al., 2001; Ho et al., 2008) โดยในสถานะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น โปรตีน NF- κ B จะอยู่ในไซโทซอลโดยจับกับโปรตีน inhibitor of κ B (IKB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF- κ B ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ต่างๆ เช่น TNF- α จะทำให้เกิดการกระตุ้นเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) บน IKB จากนั้น p-IKB จะถูกทำลายด้วยการกระบวนการ proteasome-mediated proteolytic ทำให้ NF- κ B เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF- κ B binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ รวมทั้ง ICAM-1 และ VCAM-1 เราจึงนำเอาส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของ IKB ซึ่งเป็น inhibitor ของ NF- κ B พบว่าเซลล์ที่สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียวทำให้มีระดับโปรตีน p-IKB เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 25-100 μ g/ml ลดปริมาณโปรตีน p-IKB เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อปริมาณโปรตีน p-IKB ทำการบ่มส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต (PIE) กับเซลล์ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์โปรตีน p-IKB และ GAPDH โดยใช้เทคนิค Western blot

4.4 ผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs

นอกเหนือจาก NF- κB แล้วยังมีการรายงานที่ วิถี MAPKs เป็นวิถีสัญญาณอีกวิถีหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 (Ho et al., 2008) เมื่อให้เซลล์ endothelial cells EA.hy926 สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียว ทำให้ปริมาณโปรตีน p-ERK, p-p38 และ p-JNK เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเซลล์ได้รับส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของชาใบขลุ่ย (PIE) ไม่พบว่าปริมาณโปรตีน p-ERK, p-p38 และ p-JNK ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ TNF- α เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 9)



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน MAPKs ด้วยวิธี Western blot บ่มเซลล์กับส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต (PIE) กับเซลล์ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์โปรตีน p-MAPKs และ total MAPKs โดยใช้เทคนิค Western blot ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนผลการวิเคราะห์โปรตีน p-ERK1/2 /total ERK1/2 (A), p-JNK/total JNK (B) และ p-p38/total p38 (C)

ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของชาใบขลุ่ย อาจไม่เกิดผ่านวิถี MAPKs แต่ผ่านวิถี NF- κ B เพียงอย่างเดียว ซึ่งกลไกนี้ต่างจากที่พบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Buapool et al., 2013) ที่พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบขลุ่ย สามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณทั้ง NF- κ B และ วิถี MAPKs ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่เป็นองค์ประกอบในส่วนสกัดย่อยทั้งสองนั้นแตกต่างกัน โดยการศึกษาี้ทำการศึกษา ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย ในขณะที่ Buapool et al., ทำการศึกษาส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดแทนอลจากชาใบขลุ่ย อย่างไรก็ตามควรมีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย เพื่อใช้สารดังกล่าวเป็นสารควบคุมคุณภาพของใบชาขลุ่ยที่ผลิตเพื่อบริโภค หรือนำไปใช้ในการผลิต dietary supplement ต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ส่วนสกัดน้ำจากชาใบชู่ที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 400 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ human endothelial EA.hy926
 2. ส่วนสกัดเอทานอลจากชาใบชู่ที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 50 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ human endothelial EA.hy926 ในขณะที่ความเข้มข้น 100 ถึง 400 $\mu\text{g/ml}$ ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ
 3. ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบชู่ที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ต้านอักเสบในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในเซลล์ human endothelial EA.hy926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย $\text{TNF-}\alpha$
 4. ส่วนสกัดเอทานอลจากชาใบชู่ ที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 50 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ต้านอักเสบในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในเซลล์ human endothelial EA.hy926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย $\text{TNF-}\alpha$
 5. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบชู่ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการฟอสโฟรีเลชันของ I κ B และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B p65
 6. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบชู่ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน p-JNK1/2 , p-ERK1/2 และ p-p38
- ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบชู่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นการผลิต dietary supplement ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดเลือดซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการเกิด atherosclerosis และ cardiovascular diseases แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นพิษของส่วนสกัดในสัตว์ทดลองต่อไป

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2556). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบเร่วหอม: มูลค่าเพิ่มจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา: บันทึกรธรรมชาติหลากหลายเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- รายการเกษตรน่ารู้. พืชสมุนไพร เร่วหอม. สถานีโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 7. 28 ตุลาคม 2553.
- ภาณุวัฒน์ ปานเกตุ จุรีพร คงประเสริฐ นิตยา ภัทรกรรม นงนุช ตันติธรรม ศุภวรรณ มโนสุนทร และพัชริยา ยิ่งอินทร์ (มปป) รายงานการพยากรณ์โรคและภัยสุขภาพ สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- วารสารเคหเกษตร. เร่วหอม สมุนไพรที่ขยายพันธุ์ ปลูก และแปรรูป ไม่ยาก.
http://www.kehakaset.com/index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38. สืบค้นวันที่ 26 กันยายน 2554.
- ศกวรรณ แก้วกลิน และ นิตยา พันธุ์เวทย์. (มปป) ประเด็นรณรงค์วันหัวใจโลก ปี พ.ศ. ๒๕๕๔. สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.
- Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact*. 6: 1. doi: 10.1186/1475-2859-6-1.
- Fleming I, Busse R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284: R1-R12.

- Forstermann U, and Sessa W. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33, 829–837
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. (1986). Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 237:893–900.
- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. (2007). Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 64(13):1715-22.
- Li, H., and Förstermann, U. (2013). Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 13:161–167
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 7: 132–147.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15:323-350.
- Manning, B.D., Cantley, C.L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129, 1261-1274.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 1998. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 408 Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2001. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
- Srisook, E., Palachot, M., Mankhong, S., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacogn. Mag.* 13, s230-s235.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U, Li H. (2007). Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 195: e104–e111.

- Stoner, L., Lucero, A.A., Palmer, B.R., Jones, L.M., Young, J.M., Faulkner, J. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*. 46: 1353–1371.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 196(2):193-222.
- World Health Organization. World Health Statistics 2012. All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site (www.who.int)
- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsakul S, Charuchongkolwongse S, Chansuvanich N. (2007). *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 559–562.
- Xia, N., Förstermann, U., Li, H. (2014). Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 19, 16102-16121.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141: 206-211.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002). Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 109: 817–826.
- Zong, Y., Sun, L., Liu, B., Deng, Y-S., Zhan, D., Chen, Y-L., He, Y., Liu, J., Zhang, Z-J., Sun, J., Lu, D. (2012). Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells. *PloS One*. 7, 1-13.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้บางส่วน อยู่ในระหว่างการเตรียมบทความสำหรับนำไปเสนอเพื่อพิจารณาตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ “Vascular Pharmacology”
2. ผลการศึกษาที่ได้เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดจากชาใบชู่ที่มีคุณสมบัติในด้านการอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากใบชู่ นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่ออำเภอลำลูก จังหวัดจันทบุรี