



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ

ฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ไมโครเกลียของส่วนสกัดเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate เพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ
สำหรับต้านกลุ่มโรคความเสื่อมของระบบประสาท
(Anti-inflammatory activity of *Etlingera pavieana* extract and
its compound 4-methoxycinnamyl 4-coumarate on microglia
cells for development as health care products against
neurodegenerative diseases)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฐกานต์ จิรันธนันธุ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 60634

สัญญาเลขที่ 13.3/2562

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ

ฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ไมโครเกลียของส่วนสกัดเร็วหอมและสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate เพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ
สำหรับต้านกลุ่มโรคความเสื่อมของระบบประสาท
(Anti-inflammatory activity of *Etlingera pavieana* extract and
its compound 4-methoxycinnamyl 4-coumarate on microglia
cells for development as health care products against
neurodegenerative diseases)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฐกานต์ จิรันธนันฐ

สิงหาคม พ.ศ. 2563

บทคัดย่อ

เร่วหอม (*Etingera paviana*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชท้องถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของเหง้าเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และในสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่ทราบถึงผลของเร่วหอมต่อการอักเสบในเซลล์ของระบบประสาท ดังนั้นในการวิจัยนี้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม (EPE) และสาร 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC) ที่ถูกแยกจากเหง้าเร่วหอม โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ ในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคารไรด์ (LPS) ทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดจากเร่วหอม และสาร MCC โดยวิธี MTT assay ส่วนสกัดจากเร่วหอมที่ความเข้มข้น 6.25-200 µg/mL และสาร MCC ที่ความเข้มข้น 6.25-50 µM ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งในสถานะที่มี LPS และไม่มี LPS ส่วนสกัดเร่วหอมที่ความเข้มข้น 6.25-100 µg/mL และสาร MCC ที่ความเข้มข้น 3.125-25 µM สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE₂ ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ส่วนสกัดจากเร่วหอมยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ในระดับโปรตีนและ mRNA ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในขณะที่สาร MCC ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ในระดับโปรตีน แต่ไม่ยับยั้ง COX-2 สารนอกจากนี้ MCC ยังยับยั้งการกระตุ้นวิถี NF-κB โดยลดการฟอสโฟรีเลชันของ IKBα และ NF-κB p65 รวมทั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-κB p65

ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากเร่วหอม และสาร MCC มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 โดยอย่างน้อยผ่านการยับยั้งสารสื่อกลางการอักเสบ เอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งวิถี NF-κB ดังนั้นส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม (EPE) และสาร MCC นี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นองค์ประกอบของอาหารฟังก์ชัน หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ รวมทั้งภาวะความเสื่อมของสมองหรือระบบประสาท

Abstract

Etlingera paviana, a plant in the family Zingiberaceae, is an endemic plant in the eastern part of Thailand. *E. paviana* rhizome have been reported anti-inflammatory activities in macrophage cells, endothelial cells, and in animal model. However, its anti-neuroinflammatory effect remains unknown. Therefore, in this study, the anti-inflammatory activity of ethanol extract from *E. paviana* rhizome (EPE) and 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC), isolated from *E. paviana* rhizome was investigated by inhibitory activity on the production of nitric oxide and PGE₂ in lipopolysaccharide (LPS)- activated BV2 microglia cells. Cytotoxicity of EPE and MCC were examined by MTT assay. EPE (6.25-200 μg/mL) and MCC (6.25-50 μM) did not show significant cytotoxic effect in the presence and absence of LPS. EPE at 6.25-100 μg / mL and MCC at concentrations of 3.125-25 μM were able to reduce the production of nitric oxide and PGE₂ in a concentration-dependent manner. EPE inhibited the expression of iNOS and COX-2 at the protein and mRNA level in a concentration-dependent manner while MCC inhibits iNOS expression at the protein level but not COX-2 expression. Moreover, MCC inhibited NF-κB activation by reducing phosphorylation of IκB and NF-κB p65 as well as nuclear translocation of NF-κB.

Our results show that *E. paviana* rhizome extract and MCC exert anti-inflammatory activity in BV2 microglia cells, at least in part, by inhibiting inflammatory mediators, as well as enzymes iNOS and COX-2, mediated via inactivation of NF-κB signaling pathway. Therefore, the ethanol extract from the *E. paviana* rhizome (EPE) and MCC have the potential to be used as a functional food ingredient and dietary supplements that can prevent inflammation-related diseases including neurodegenerative diseases.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญรูป	5
บทนำ	6
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
วิธีการทดลอง	13
ผลการทดลอง	19
อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง	32
บรรณานุกรม	35
ประวัตินักวิจัย	39

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่เวลาต่างๆ กัน 19
รูปที่ 2	กราฟแสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่สัมผัสส่วนสกัดจากเร่วหอม (a) และสาร MCC (b) ที่เวลา 24-48 ชั่วโมง 20
รูปที่ 3	ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (a) และการมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย (b) ที่สัมผัส LPS ที่ความเข้มข้น 0.01-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง 22
รูปที่ 4	ผลของส่วนสกัดเร่วหอมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (a) และการมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 (b) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง 23
รูปที่ 5	ผลของสาร MCC ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (a) และการมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 (b) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง 24
รูปที่ 6	ผลของส่วนสกัดเร่วหอม (EPE) (a) และสาร MCC (b) ต่อการผลิต PGE_2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง 25
รูปที่ 7	ผลของส่วนสกัดเร่วหอมต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 24 ชั่วโมง 26
รูปที่ 8	ผลของส่วนสกัดเร่วหอมต่อการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 9 ชั่วโมง 27
รูปที่ 9	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 24 ชั่วโมง 28
รูปที่ 10	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 9 ชั่วโมง 29
รูปที่ 11	สาร MCC ยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของ IKBα และ NF- KB /p65 30
รูปที่ 12	ผลของสาร MCC ต่อ nuclear translocation NF- KB /p65 31

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันทั่วโลกกำลังก้าวสู่สังคมผู้สูงอายุ (Aging Society) ประเทศไทยเองเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 และมีสัดส่วนประชากรผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยในปี พ.ศ. 2553 มีสัดส่วนผู้สูงอายุ อยู่ที่ร้อยละ 10.7 ของประชากรรวม ต่อมาในปี พ.ศ. 2558 มีสัดส่วนผู้สูงอายุเพิ่มขึ้น อยู่ที่ร้อยละ 15.8 และ คาดว่าในปี 2568 จะมีสัดส่วนเป็นร้อยละ 23.1 ซึ่งเป็นสัดส่วนเพิ่มขึ้นอย่างก้าวกระโดด (กรมกิจการผู้สูงอายุ, ม.ป.ป.) ปัญหาสุขภาพที่สำคัญปัญหาหนึ่งของผู้สูงอายุ คือ การเผชิญกับปัญหาโรคในกลุ่มภาวะความเสื่อม ของสมองและระบบประสาท ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคมาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรค multiple sclerosis โรค amyotrophic lateral sclerosis โรค Huntington และโรคสมอง เสื่อมจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง เป็นต้น (Harvard Neuro Discovery Center, n.d.) อุบัติการณ์ของผู้ที่มี ภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาทในประเทศไทยและทั่วโลกมีแนวโน้มสูงขึ้น (สมศักดิ์ ชุณหรัศมิ์, 2553; Venkatesan et al., 2015) โรคในกลุ่มภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาท เป็นกลุ่มโรคไม่ ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases, NCDs) ผู้ที่มีภาวะความเสื่อมของสมองจะมีการทำงานของ สมองลดลงจากเดิมจนมีผลกระทบต่อการทำงานและการดำเนินชีวิตประจำวัน ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วย ครอบครัวและประเทศชาติ ทั้งในแง่การเสียรายได้ของตัวบุคคล องค์กร และใช้งบประมาณของประเทศใน การดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วยจากการซื้อยาจากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท (กรมสุขภาพจิต, ม.ป.ป.)

สาเหตุของการเกิดภาวะความเสื่อมของสมองหรือระบบประสาทรุนั้นมีหลายสาเหตุ (Glass et al., 2010) สาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ การอักเสบของระบบประสาท โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการ อักเสบนี้ คือเซลล์ไมโครเกลีย (microglial cell) ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบประสาทที่ทำหน้าที่คล้ายแมคโครฟาจ ถูกกระตุ้นโดยเชื้อจุลชีพ โปรตีน β -amyloid และเซลล์ประสาทที่ตาย (Zhang and Chen, 2015) เมื่อถูก กระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบ (pro-inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น แบรดตีไคนิน (bradykinin) ฮีสตามีน (histamine) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) เป็นต้น รวมทั้ง pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการอักเสบ สาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ที่ถูกหลั่งมากเกินไป หรือหลั่ง ต่อเนื่องในระยะเวลาต่างๆ จะทำให้เกิดการบาดเจ็บและตายของเซลล์ไมโครเกลียและเซลล์ประสาท (Zhang and Chen, 2015; Han et al., 2017) นำไปสู่ภาวะความเสื่อมของสมองหรือระบบประสาทต่างๆ

(Amor et al., 2010; Glass et al., 2010; Venkatesan et al., 2015) ดังนั้นการลดการหลั่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ เป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่จะช่วยป้องกัน หรือยับยั้งความก้าวหน้าของโรคในกลุ่มภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาท

ปัจจุบันความนิยมในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่างๆ มีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสุขภาพที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากแนวโน้มการใช้ชีวิตแบบใส่ใจสุขภาพของคนรุ่นใหม่ และการเตรียมความพร้อมในการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารถึง 7 % มูลค่าของตลาดมีมากกว่า 100,000 ล้านบาทต่อปีจากการจำหน่ายทั้งในประเทศและนอกประเทศ (ข่าวสภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย, 2559) อย่างไรก็ตามการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดใหม่ๆ ที่มีพืชสมุนไพรเป็นส่วนผสมที่สำคัญ ยังคงมีความจำเป็นเพื่อให้มีการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพิ่มขึ้น และทำให้ประชาชนมีทางเลือกในการรักษาแบบป้องกัน (chemopreventive therapy) ได้มากยิ่งขึ้น เร่วหอม (*Etingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เกษตรกรทำการปลูกเร่วหอมเป็นพืชแซมในสวนผลไม้ เหง้าเร่วหอมใช้เป็นเครื่องเทศใส่ในแกงและก๋วยเตี๋ยว นอกจากนี้เหง้าเร่วหอมยังใช้ในการรักษาโรคกรดสีดวงทวาร ลดอาการท้องอืด ขับลมและขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) คณะผู้วิจัยสังเกตเห็นศักยภาพของเร่วหอมในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเร่วหอมอย่างต่อเนื่องและพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (Srisook et al., 2017) สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอม คือ สาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) (Mankhong et al., 2017; Srisook et al., 2017) โดยสาร MCC สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน E₂, TNF- α และ IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Mankhong et al., 2019) นอกจากนี้ส่วนสกัดเร่วหอมและสาร MCC นี้ยังสามารถยับยั้งการอักเสบของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคหัวใจและหลอดเลือด (Srisook et al., 2019) และมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (lawsipo et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลของเร่วหอมต่อการอักเสบของเซลล์ไมโครเกลีย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของส่วนสกัดเร่วหอมและสาร MCC ในการต้านอักเสบของเซลล์ไมโครเกลีย และกลไกในการแสดงฤทธิ์นี้เพื่อ

เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรเร็วหอมในการรักษาโรคในกลุ่มภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาทที่เป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เพื่อลดการนำเข้ายาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากต่างประเทศ และอาจนำไปสู่รายได้เข้าประเทศ นอกจากนี้ข้อมูลของสารประกอบ MCC ยังอาจถูกนำไปใช้เป็นข้อมูลในการนำสาร MCC ไปพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดจากเร็วหอมและสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
2. เพื่อศึกษากลไกระดับโมเลกุลของการต้านการอักเสบของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ในเซลล์ไมโครเกลีย BV2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำส่วนสกัดจากเหง้าเร็วหอมและสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) มาทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ นำความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไปใช้ในศึกษาต่อไป

ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ไมโครเกลีย โดยใช้เซลล์ไลน์ BV2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นโมเดลในการศึกษา ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ และศึกษาผลของสารต่อการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในระดับโปรตีนและ mRNA

ศึกษาผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี NF- κ B โดยศึกษา nuclear translocation ของ NF- κ B และปริมาณ p-I κ B และ p-65 NF- κ B

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรงของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัด และทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหาย หรือตายด้วย (พีรยุทธ สิทธิไชยาภุ, 2552) เซลล์ที่ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมภายในระบบสมองคือ เซลล์ไมโครเกลียโดยหลั่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines แต่การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียที่มากเกินไป ทำให้มีการหลั่ง pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines อย่างต่อเนื่อง นานออกไป จึงมีการทำลายลูกกลามอย่างต่อเนื่องในเซลล์ระบบประสาทที่บริเวณต่างๆ ของสมอง อันนำไปสู่โรคในกลุ่มภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาทโรคต่างๆ (Amor et al., 2010; Glass et al., 2010; Zhang and Chen, 2015; Venkatesan et al., 2015)

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกวานิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH4) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity) แมคโครฟาจทำหน้าที่กำจัดจุลชีพที่บุกรุก โดยผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมากจาก

เอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine, endotoxin ของแบคทีเรีย หรือไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย (Coleman, 2001) การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมโครฟาจ ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

โพรสตาแกลนดิน (prostaglandins, PGs) เป็นสารตัวกลางในกลุ่มลิพิดที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น ควบคุมความดันโลหิต การแข็งตัวของหลอดเลือด และตอบสนองต่อการอักเสบ ในกระบวนการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase (COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินที่ทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา ควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (Rao and Knaus, 2008) และอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดินในปริมาณมาก (Katzung, 2001; Rao and Knaus, 2008) PGE₂ เป็นไอโซฟอร์มหนึ่งของโพรสตาแกลนดินทำหน้าที่ร่วมกับสารในร่างกายในการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การขยายตัวและบีบตัวของหลอดเลือด ควบคุมความดันเลือด (Serhan and Levy, 2003) และเป็นตัวกลางการอักเสบที่กระตุ้นการทำลายเนื้อเยื่อ

มีการรายงานว่ LPS จะเข้าจับที่ Toll-like receptor 4 (TLR4) ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณ (receptor) และส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ก่อให้เกิดการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokines (Lowenstein et al., 1993; Zhang et al., 2012) ในสถานะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จับกับโปรตีน inhibitor of κ B (IKB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF- κ B ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ ไซโตไคน์ต่างๆ จะเกิดการจับกับตัวรับสัญญาณ ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ inhibitor of κ B kinase (IKK) ทำให้เกิดการกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) บนโปรตีน IKB 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 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านวิถี

สัญญาณ MAPKs อีกด้วย (Lu et al., 2012) นอกจากนี้ยังมี transcription factor ตัวอื่นที่ควบคุมการแสดงออกของยีน COX-2 และ iNOS เช่น activate protein-1 (AP-1), c-AMP response element binding protein (C/EBPs) และ CREB เป็นต้น (Yang et al., 2012)

เร่วหอม [*Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.] เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและปุด พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น ระยอง จันทบุรี และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อแทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลมและแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเสียง ก๋วยเตี๋ยวเนื้อเสียง แกงป่า และผัดเผ็ด การปลูกเร่วหอมแต่ดั้งเดิมเป็นการปลูกเป็นพืชสวนครัว และปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย ในปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (วารสารเคหเกษตร, มปป.; รายการเกษตรกรน่ารู้, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Srisook และ Srisook, 2011) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีกลไกแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ได้โดยลดการกระตุ้น NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ต่อมา มีการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, p-anisic acid, p-hydroxy benzaldehyde, 4-methoxycinnamyl alcohol, p-coumaric acid, trans-4-methoxycinnamaldehyde, สาร (E)-methyl isoeugenol, trans-anethole และ p-anisaldehyde และพบว่าสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate ซึ่งเป็นสารที่มีการพบเป็นครั้งแรกในเหง้าเร่วหอม มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E₂ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และสารนี้ยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555; Srisook et al., 2017; Mankhong et al., 2017; Mankhong et al., 2019)

ส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ยังแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ โดยการลดการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม adhesion molecule คือ intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-

1) ทั้งยังลดการผลิตใน reactive oxygen species ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ (Srisook et al., 2018; Srisook et al., 2019) และมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela และมะเร็งเต้านม (lawsipo et al., 2017; lawsipo et al., 2018)

ปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชหลายชนิดในวงศ์ Zingiberaceae มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ไมโครเกลีย เช่น ส่วนสกัดเฮกเซนจากขิง (*Zingiber officinale*) ลดการอักเสบในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 (Jung et al., 2009) ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Ho และคณะรายงานฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ของระบบประสาทของส่วนสกัดเอทานอลจากขิงและพบว่าสารหลักที่เป็นสารแสดงฤทธิ์นี้คือ 10-gingerol นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ามีสารจากพืชหลายชนิดในวงศ์ Zingiberaceae แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 เช่น สาร cardamonin จาก *Alpinia rafflesiana* (Chow et al., 2012) สาร curcumin และสาร aromatic-turmerone จาก *Curcuma longa* (Park et al., 2012; Monroy et al., 2013; Venkatesan et al., 2015) และสาร 6-shogaol จาก *Zingiber officinale* (Han et al., 2017)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมเหง้าเร่วหอมและการสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม

นำเหง้าเร่วหอมจาก อ.ขลุ้ง จ.จันทบุรี มาล้างด้วยน้ำประปาแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง ก่อนนำไปแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด นำส่วนลำต้นใต้ดินที่บดละเอียดแช่ในสารละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เป็นเวลา 7 วัน กรองส่วนสกัดที่ได้ แล้วนำผงของลำต้นใต้ดินมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลซ้ำ 2 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ก่อนนำไปแยกสาร MCC ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตามวิธีที่รายงานใน Srisook et al. (2017) ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารโดยเทคนิคสเปกโทรสโกปีและเปรียบเทียบกับสเปกตรัม NMR ละลายสารที่ MCC ใน DMSO และกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.22 μm ก่อนนำไปใช้ทดสอบ

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC โดยวิธี MTT

เซลล์ที่ใช้ศึกษา คือ เซลล์ไลน์ BV2 ซึ่งเป็นเซลล์ไมโครเกลียของหนู (mouse microglial cells) ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

จากนั้นทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อนำช่วงความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบในการทดลองต่อไป วิธีการโดยย่อ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook et al., 2015) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) \times 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

เลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย (1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม และบ่มในตู้บ่ม 37 °C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี EPE และ MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ใหม่ที่มีสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.1 mg/mL) หลุมละ 500 μ L แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม DMSO ปริมาตรหลุมละ 500 μ L เพื่อละลายผลึกฟออร์มาแซน นำไปบ่มพร้อมเขย่านาน 5 นาที ทำการปิเปตต์สารละลายฟออร์มาแซนจากแต่ละหลุม ปริมาตร 200 μ L ใส่ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์สามารถคำนวณได้จากสูตรด้านล่าง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

3.3 การทดสอบส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE₂

โมเดลที่ใช้ศึกษา คือ เซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 μ L ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μ L จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook et al., 2015) การทดสอบใช้ aminoguanidine ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS เป็นสารควบคุมแบบบวก

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ตามสภาวะที่กล่าวไว้ด้านบนมาทดสอบการยับยั้งการผลิต PGE₂ ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ PGE₂ ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ชุด ELISA kit ในการทดสอบผลของสารทดสอบต่อการผลิต PGE₂ นี้ จะใช้ยาแก้อักเสบที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์และมี

เป้าหมายที่เอนไซม์ COX-2 ที่ขายในท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารบริสุทธิ์ที่ได้ ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.4 การทดสอบส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS และ COX-2 ด้วยเทคนิค real time-reverse-transcription polymerase chain reaction (real time-RT-PCR) โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่มีการแสดงออกมากที่สุด เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และสกัด RNA ทั้งหมด ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A₂₆₀ เท่ากับ 40 µg/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 µl และเติมน้ำที่ปราศจาก Nuclease ปรับปริมาตรให้เป็น 20 µl 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 และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน iNOS, COX-2 และ elongation factor (EF-2) (Buapool et al., 2013) ปฏิบัติการสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 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 µl, 10 µM Forward primer จำนวน 0.5 µl, 10 µM Reverse primer จำนวน 0.5 µl, cDNA ที่สังเคราะห์ จำนวน 2 µl และปรับปริมาตรให้เป็น 20 µl ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase ในสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Real-time PCR ของยีน iNOS, COX-2 และ EF-2 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 EF-2 เป็น housekeeping gene ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

เลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย (1×10^6 เซลล์ต่อเพลท) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm และบ่มในตู้บ่ม 37 °C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ Pre-treat ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี EPE (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ MCC (6.25-37.5 μM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 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 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl , 150 mM NaCl , 5 mM EGTA , $0.1\% \text{ (v/v) SDS}$, $1\% \text{ (v/v) sodium deoxycholate}$, $1\% \text{ (v/v) Nonidet P-40}$] ที่มี 1X protease inhibitor ปริมาตร 75 μL จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

นำโปรตีนรวมที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford protein assay ก่อนนำไปแยกโปรตีน ความเข้มข้นของโปรตีนตรวจสอบโดยใช้ Bio-Rad protein assay นำโปรตีน 2 μL ผสมกับน้ำ sterile 8 μL ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม และเติม 1x Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (เจือจางด้วยน้ำกลั่น) 200 μL จากนั้นนำไปบ่มพร้อมเขย่านาน 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ความเข้มข้นของโปรตีนสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายด้วยน้ำ sterile (0.5-6.0 μg)

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้โดยใช้ 10% SDS PAGE นำสารละลายโปรตีนรวมที่สกัดได้ 30 μg ผสมกับ 1X protein loading buffer [124 mM Tris-HCl (pH 6.8), $5\% \text{ (v/v) } \beta\text{-mercaptoethanol}$, $10\% \text{ (v/v) glycerol}$, $4\% \text{ (w/v) SDS}$ และ $0.01\% \text{ (w/v) bromophenol blue}$] และน้ำกลั่น จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C โดยใช้ digital dry bath เป็นเวลา 5 นาที และทำการ spin down ก่อนโหลดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X running buffer [0.025 M Tris , 0.192 M glycine และ $0.1\% \text{ (w/v) SDS}$] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 15 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และแช่ใน transfer buffer [192 mM glycine , 25 mM Tris , $10\% \text{ (v/v) methanol}$] เป็นเวลา 5 นาที นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นทำการบล็อกแผ่นเมมเบรนโดยบ่มใน $5\% \text{ (w/v) non-fat dried milk}$ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS, COX-2 และ GAPDH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นใส่สารละลายซึบสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) ให้ทั่วเมมเบรน ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน iNOS และ COX-2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.5 การทดสอบผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี NF- κ B

เริ่มด้วยการทดสอบผลของสาร MCC ต่อการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส NF- κ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึงทดสอบโดยเลี้ยงเซลล์บนแผ่นกระจก ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCC ที่ความเข้มข้น 25 μ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที และวิเคราะห์โปรตีน NF- κ B/p65 โดยเทคนิค immunofluorescence ตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Mankhong et al. (2019) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ phospho- κ B α โดยวิธี Western blot analysis ตามวิธีใน Srisook et al. (2019) ดังนั้นเลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย (1×10^6 เซลล์ต่อเพลท) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm และบ่มในตู้อบ 37 °C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการ Pre-treat ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี MCC (6.25-37.5 μ M) และ BAY (Positive control, 15 μ M) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (1 μ g/mL) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 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] ที่มี 1X protease inhibitor และ 1X phosphatase inhibitor ปริมาตร 75 μ L จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ตูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

นำโปรตีนรวมที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford protein assay ก่อนทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้โดยใช้ 10% SDS PAGE นำสารละลายโปรตีนรวมที่สกัดได้ 30 μ g ผสมกับ 1X

protein loading buffer [124 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% (v/v) β -mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS และ 0.01% (w/v) bromophenol blue] และน้ำกลั่น จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C โดยใช้ digital dry bath เป็นเวลา 5 นาที และทำการ spin down ก่อนโหลดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 15 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และแช่ใน transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาที นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแท่งที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นทำการบล็อกแผ่นเมมเบรนโดยบ่มใน 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนบ่มในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน phosphor-**IKB α** ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน และ GAPDH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นใส่สารละลายซัสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) ให้ทั่วเมมเบรน ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

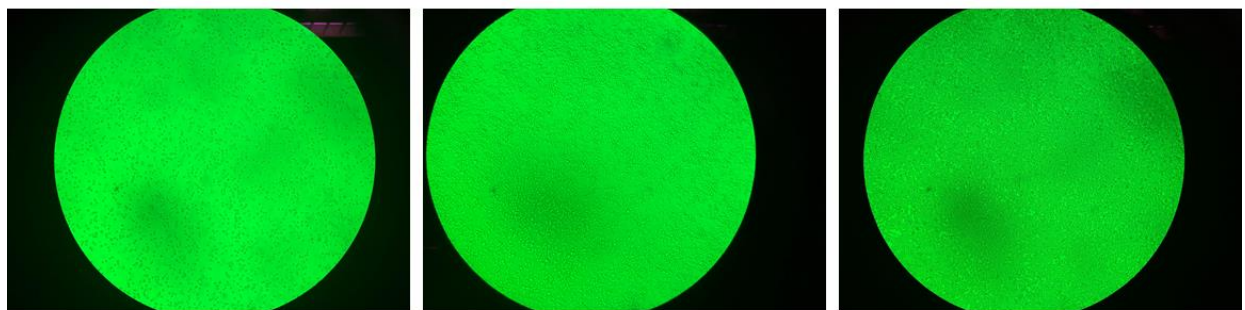
ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC

ในการศึกษานี้มีโมเดลในการศึกษาวิจัย คือ เซลล์ไมโครเกลีย BV2 ดังแสดงในรูปที่ 1 จากนั้นนำเซลล์ไมโครเกลีย BV2 มาทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) ที่ความเข้มข้น 6.25-200 $\mu\text{g/mL}$ และสาร MCC ที่ความเข้มข้น 6.25-200 μM โดยวิธี MTT พบว่าสารสกัดเร่วหอมที่ความเข้มข้น 6.25-100 $\mu\text{g/mL}$ และสาร MCC ความเข้มข้น 6.25-25 μM ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งในสถานะที่มี LPS และไม่มี LPS ดังแสดงในรูป ที่ 2 และรูปที่ 3 ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) ที่ความเข้มข้น 6.25-100 $\mu\text{g/mL}$ และสาร MCC ที่ความเข้มข้น 6.25-25 μM เพื่อเล็งผลที่เกิดจากการตาย หรือบาดเจ็บของเซลล์

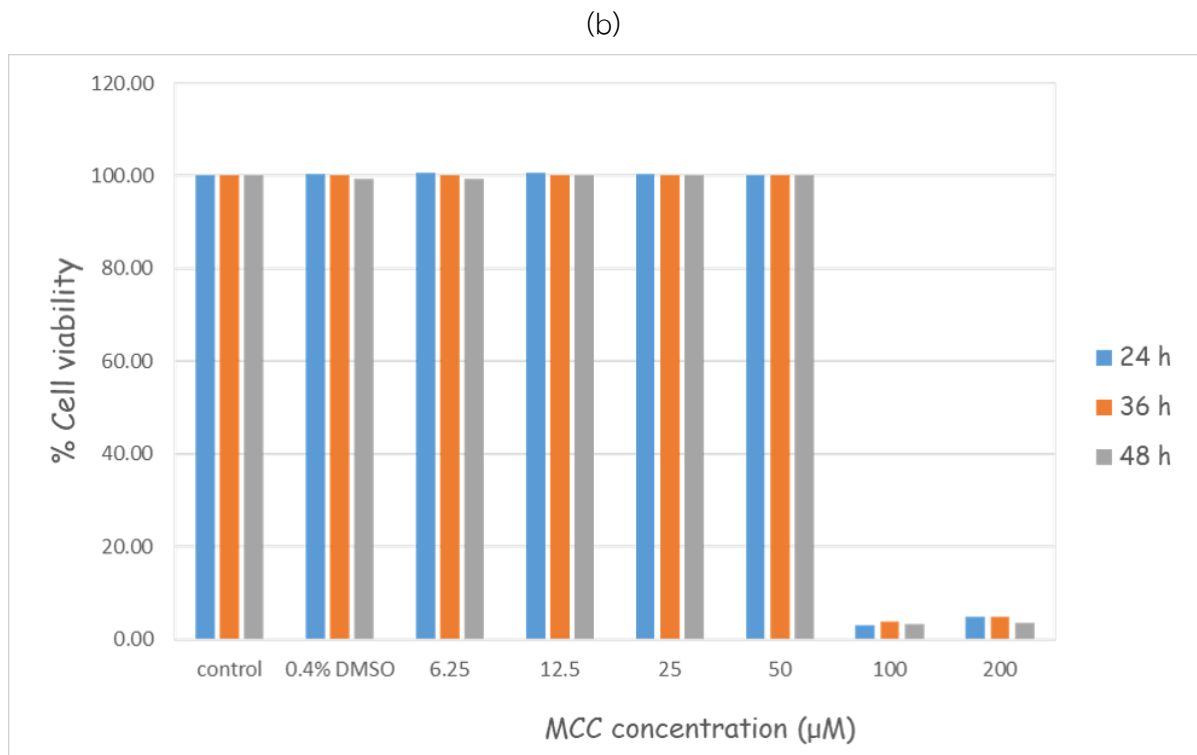
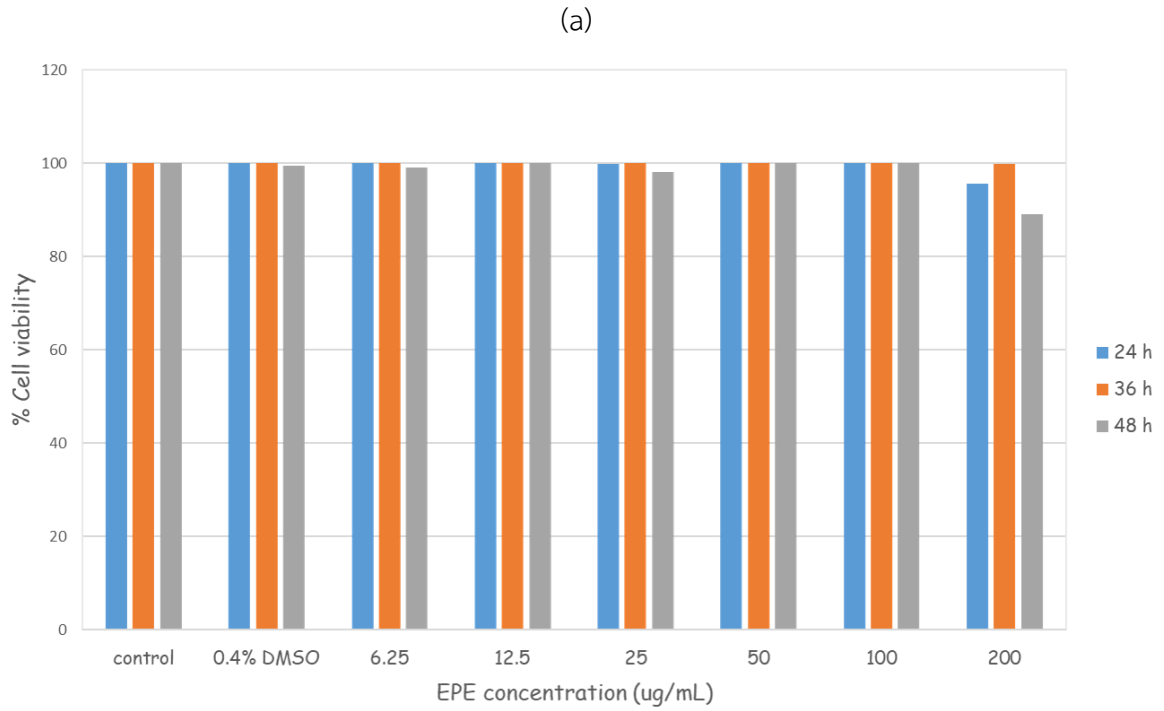


6 h

1 day

3 day

รูปที่ 1 ลักษณะของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่เวลาต่างๆ กัน



รูปที่ 2 กราฟแสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่สัมผัสส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) (a) และสาร MCC (b) ที่เวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2 ส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

ทำการทดสอบหาปริมาณ LPS ที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ให้ผลิตไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบ LPS ที่ความเข้มข้น 0.01-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้ทุกช่วงเวลาทดสอบ คือ 24 และ 36 ชั่วโมง โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 3) จึงทำการทดสอบผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเร่วหอมที่ 6.25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสาร MCC ที่ความเข้มข้น 3.125-25 μM พบว่าสารสกัดเร่วหอมที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสาร MCC ความเข้มข้น 3.125-25 μM สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ โดยที่ไม่เป็นแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเร่วหอมที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสาร MCC ที่ความเข้มข้น 25 μM สามารถยับยั้งการผลิต PGE_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS (รูปที่ 6)

4.3 ส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร MCC ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2

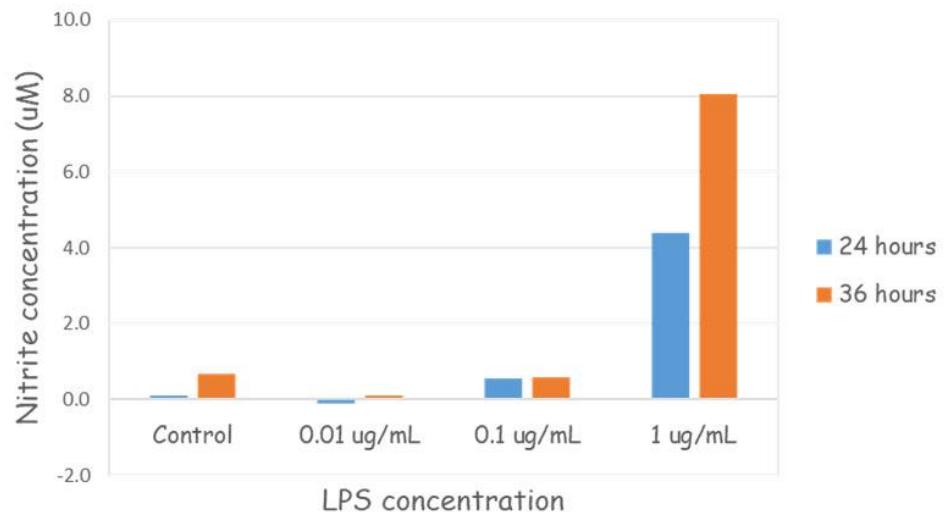
จากนั้นทำการทดสอบผลของส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และโปรตีน COX-2 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเร่วหอมที่ 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าสารสกัดเร่วหอมที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน iNOS ได้อย่างมีประสิทธิภาพในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (รูปที่ 7) ในขณะที่สารสกัดเร่วหอมสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้เพียงเล็กน้อย โดยสารสกัดเร่วหอมที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถยับยั้งโปรตีน COX-2 ได้

นอกจากนี้เรายังได้ทำการทดสอบผลของส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS และ COX-2 พบว่าผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในระดับโปรตีน (รูปที่ 8)

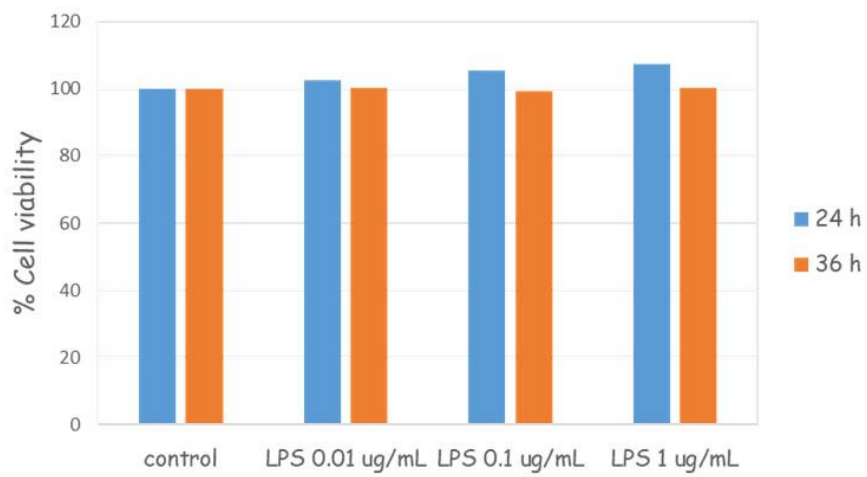
การทดลองต่อมาคือศึกษาผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 โดยสาร MCC ที่ความเข้มข้น 6.25-25 μM สามารถลดโปรตีน iNOS ได้อย่างมีประสิทธิภาพในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (รูปที่ 9) แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้

ในขณะที่สาร MCC สามารถลดปริมาณ mRNA ของ iNOS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น แต่สามารถลดปริมาณ mRNA ของ COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้น 25 μM เท่านั้น (รูปที่ 10)

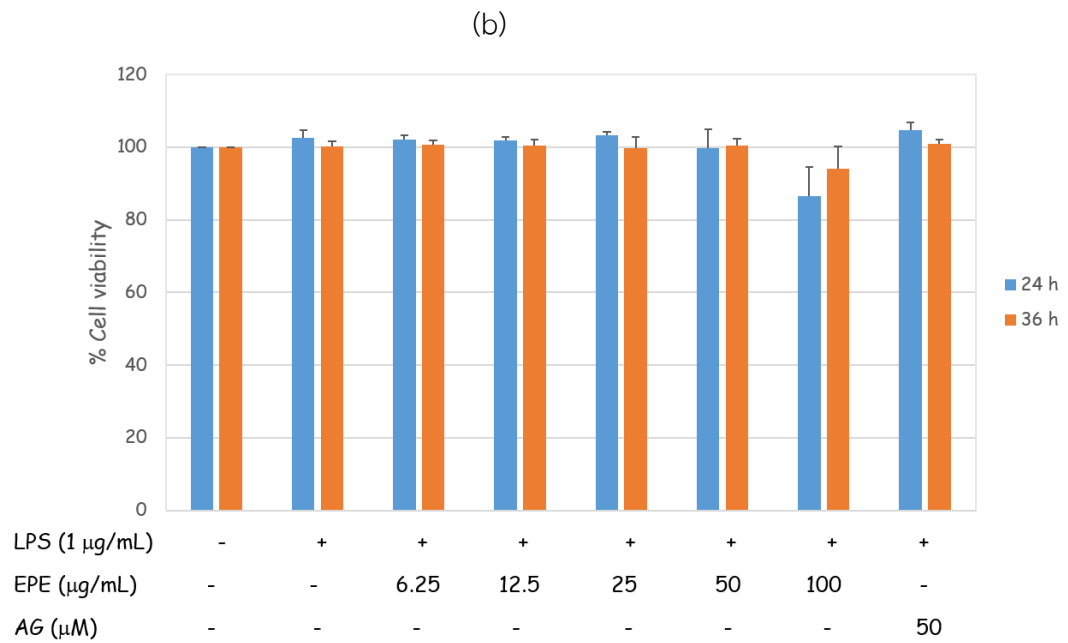
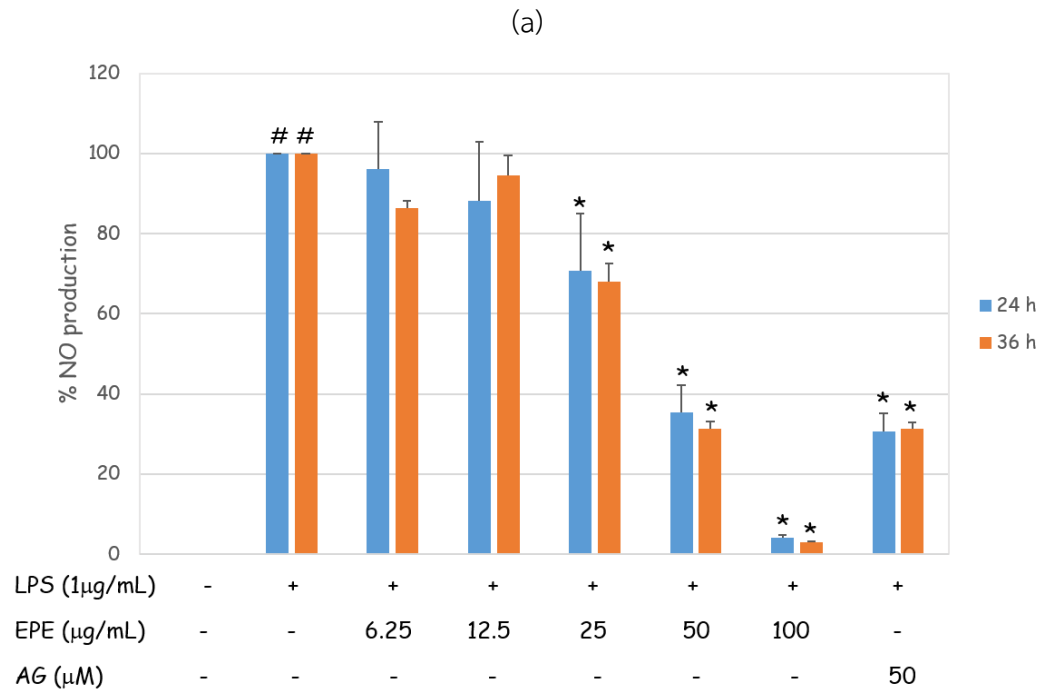
(a)



(b)

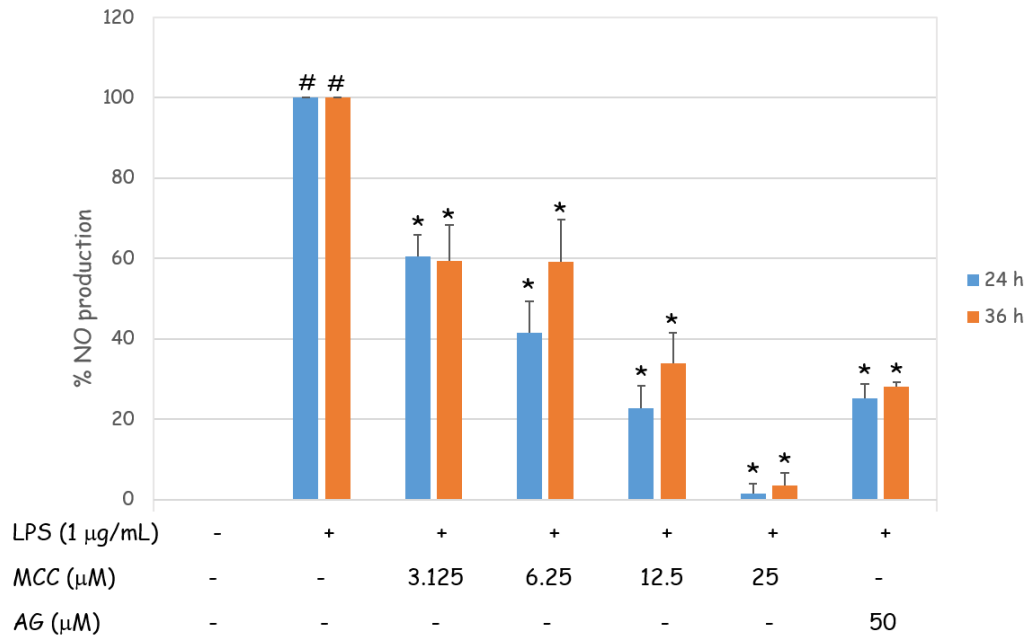


รูปที่ 3 ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (a) และความมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย (b) ที่สัมผัส LPS ที่ความเข้มข้น 0.01-1 $\mu\text{g/mL}$ ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

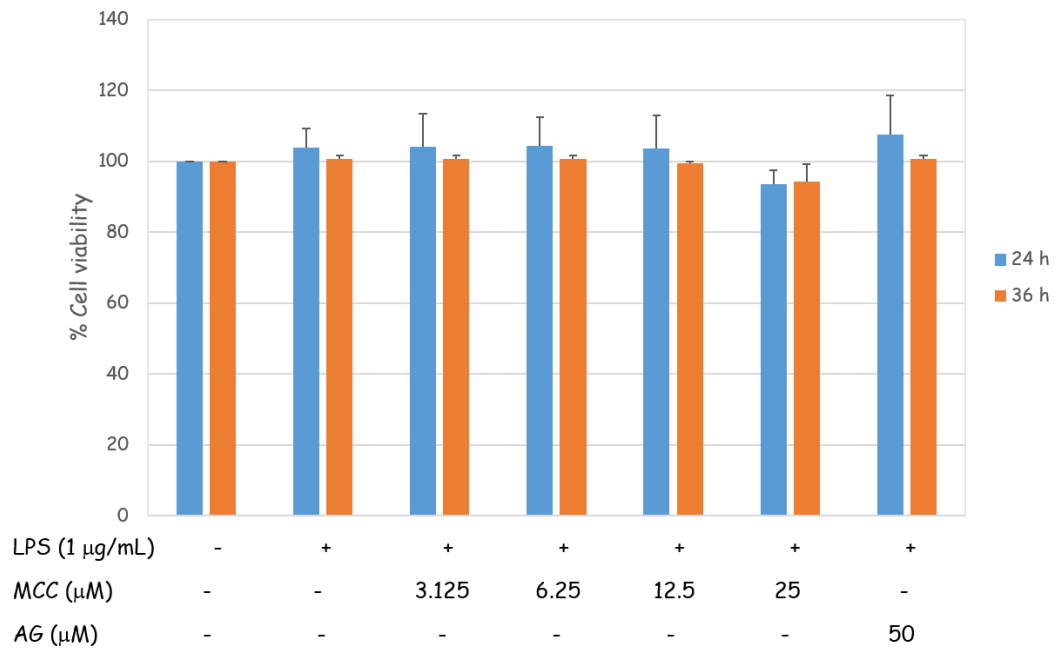


รูปที่ 4 ผลของส่วนสกัดเร่วหอม (EPE) ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (a) และควมมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 (b) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

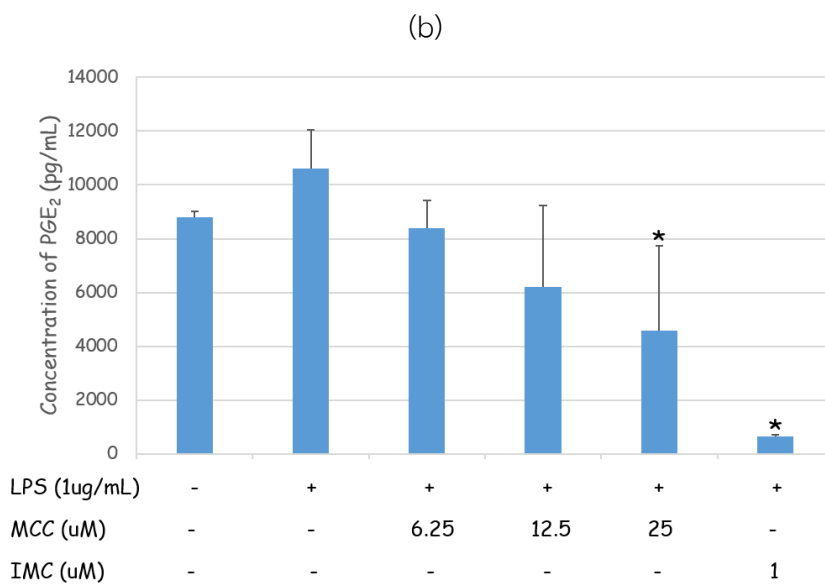
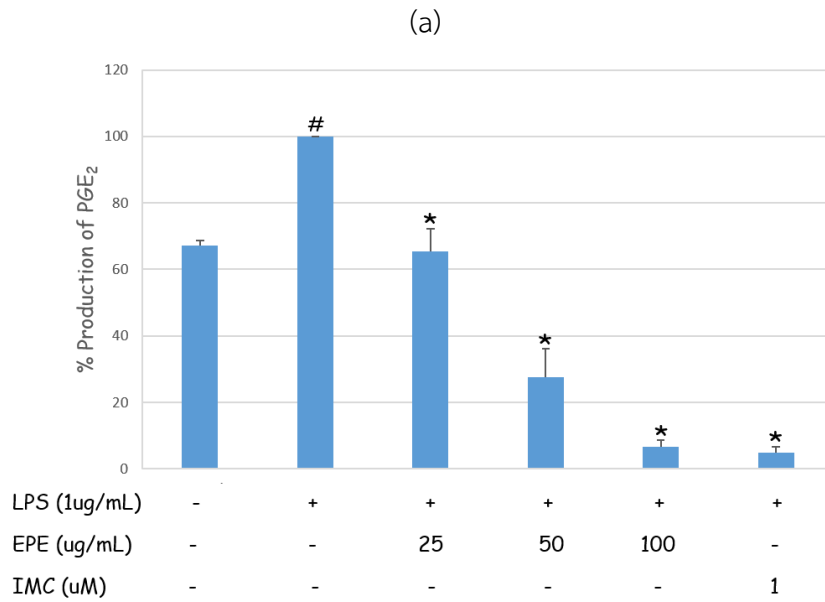
(a)



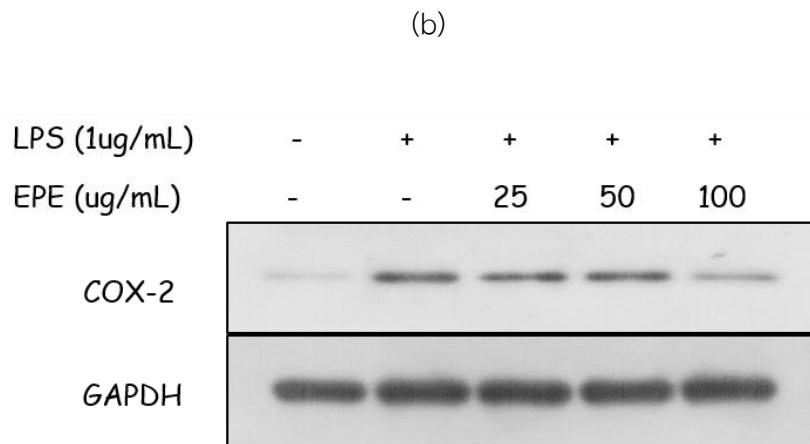
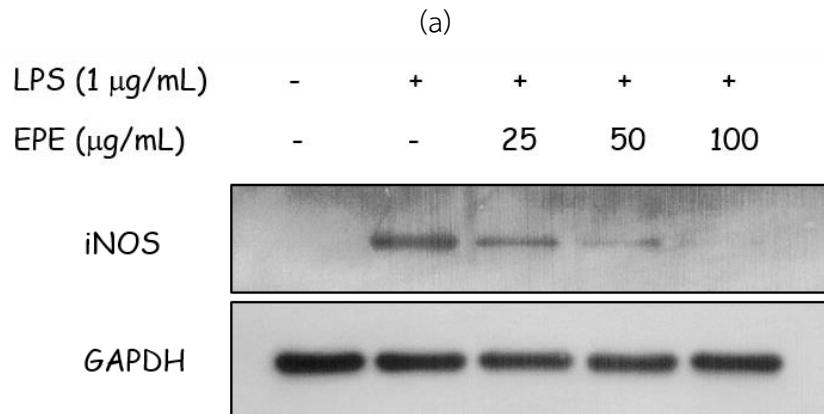
(b)



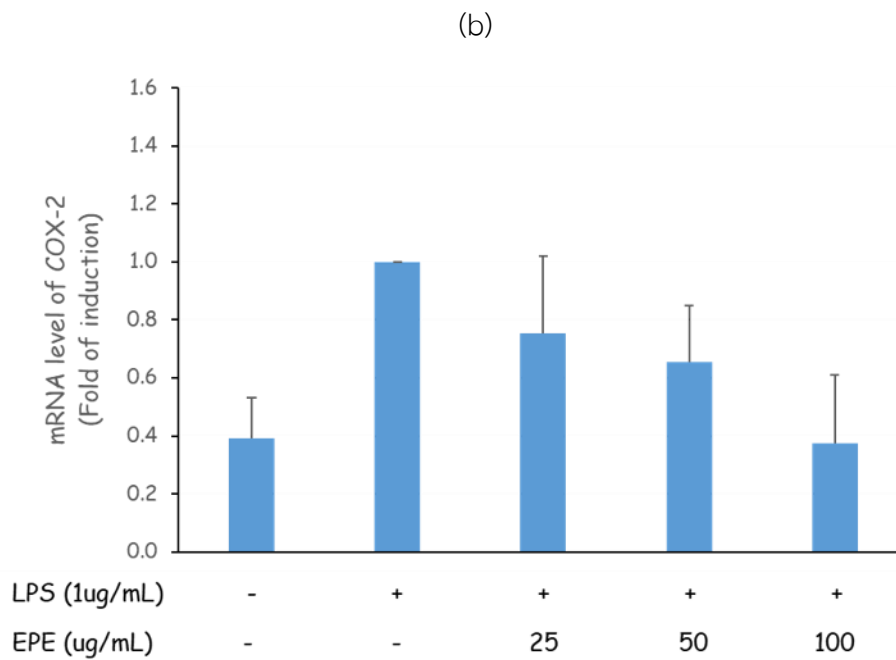
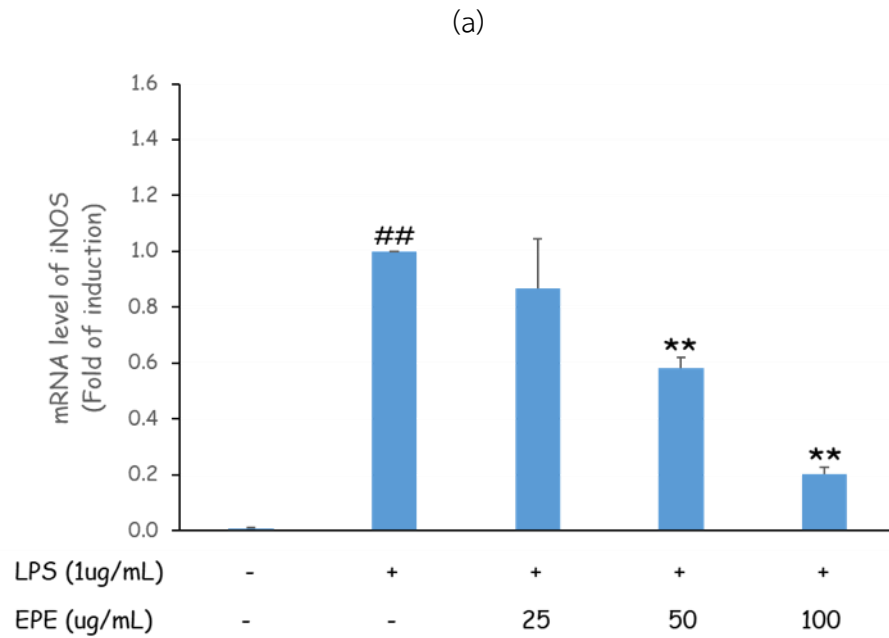
รูปที่ 5 ผลของสาร MCC ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (a) และความมีชีวิตรอดของเซลล์ไมโครเกลีย BV2 (b) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง



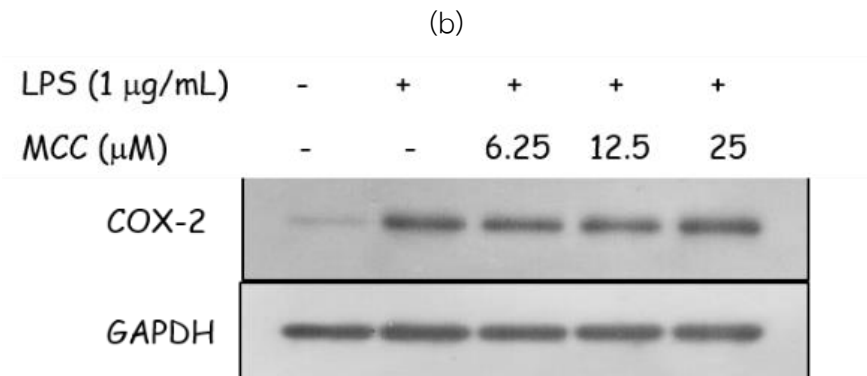
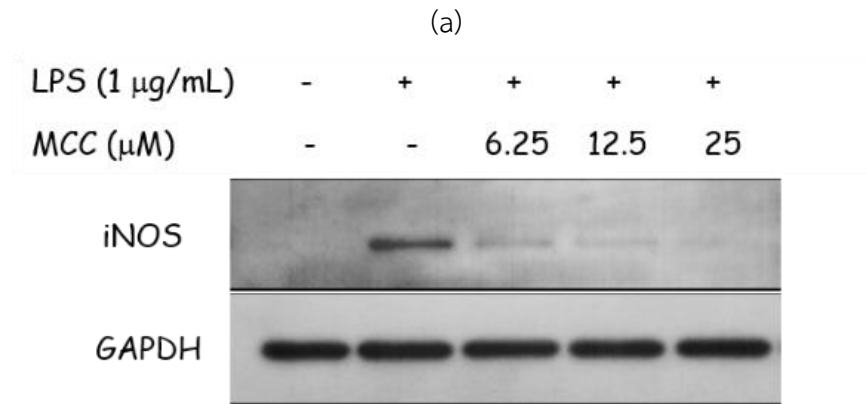
รูปที่ 6 ผลของส่วนสกัดเร่วหอม (EPE) (a) และสาร MCC (b) ต่อการผลิต PGE₂ ที่เวลา 24 ชั่วโมง



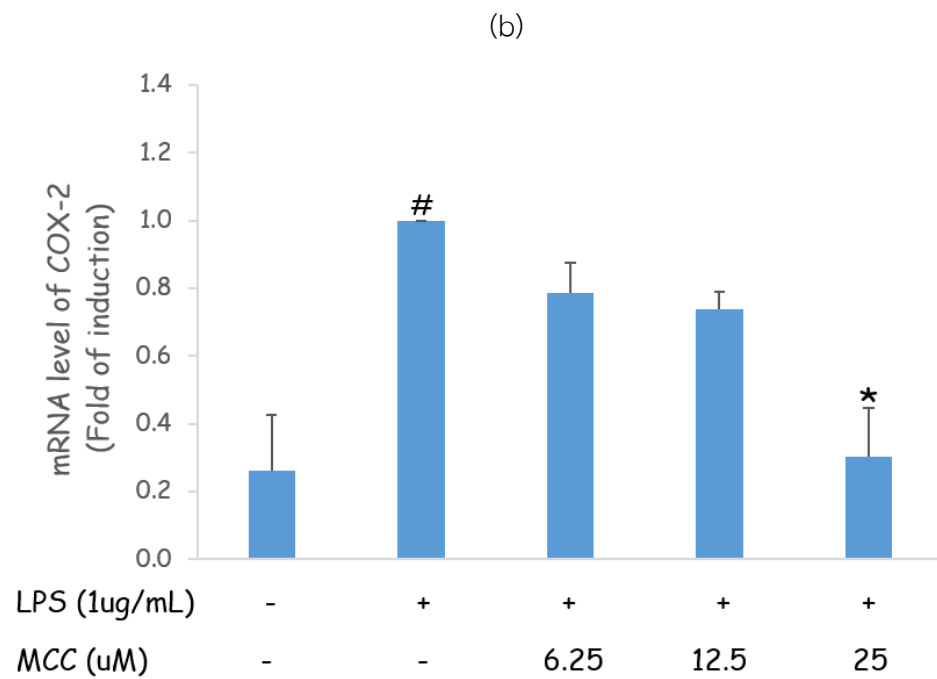
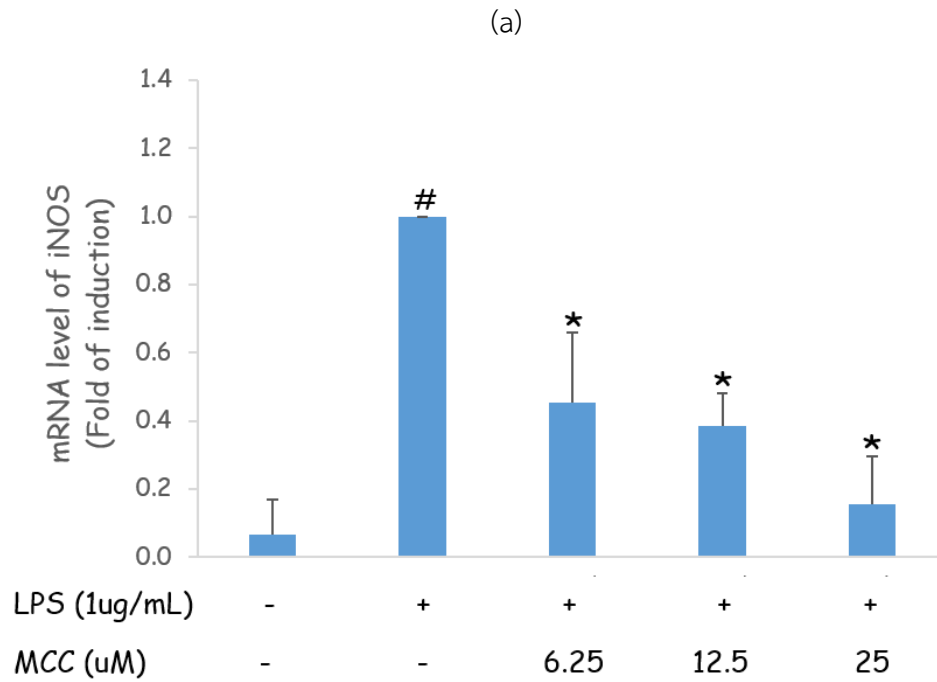
รูปที่ 7 ผลของส่วนสกัดเร่วหอมต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 8 ผลของส่วนสกัดเร่วหอมต่อการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 9 ชั่วโมง



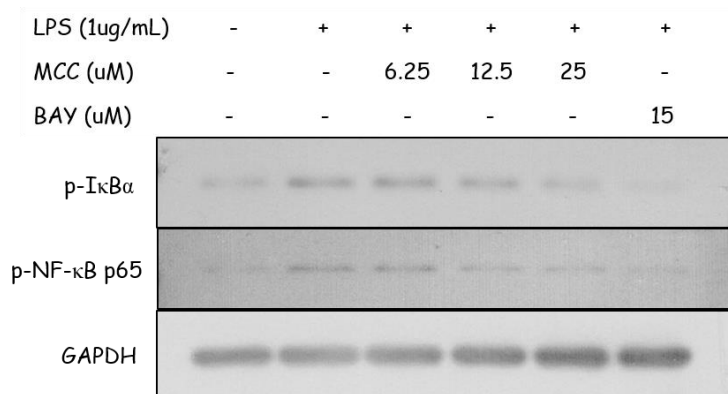
รูปที่ 9 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 10 ผลของ MCC ต่อการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS (a) และโปรตีน COX-2 (b) ของเซลล์ไมโครเกลียที่เวลา 9 ชั่วโมง

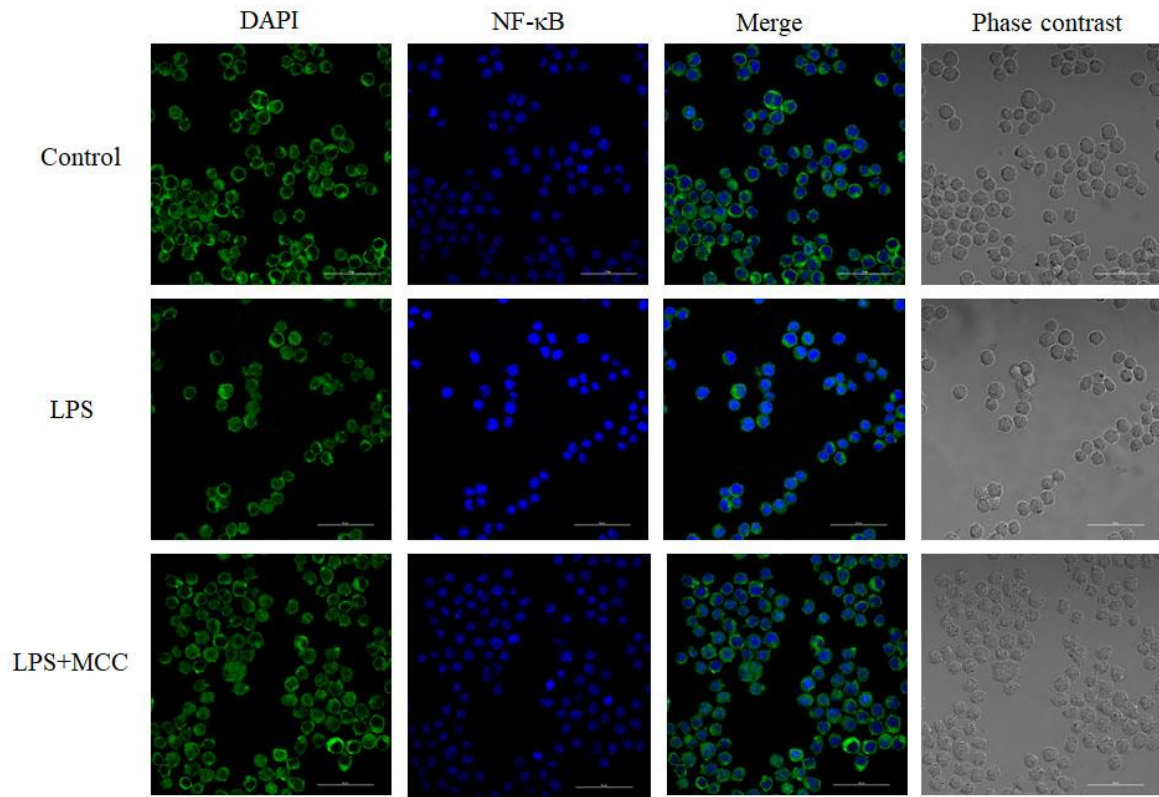
4.4 สาร MCC ยับยั้งการกระตุ้นวิถี NF- κ B

วิถีสัญญาณ NF- κ B เป็นวิถีการส่งสัญญาณทางชีวภาพที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน iNOS และโปรตีน COX-2 ดังนั้นเราจึงทดสอบผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF- κ B ทำการหาสภาวะเวลาที่ NF- κ B เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้มากที่สุดในเซลล์ไมโครเกลีย พบว่าเวลาที่เหมาะสมหลังจากกระตุ้นด้วย LPS คือ 30 นาที จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน phosphor-I κ B α และ โปรตีน phosphor-NF- κ B p65 พบว่าสาร MCC ที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 μ M สามารถลดปริมาณ phosphor-I κ B α และ phosphor-NF- κ B p65 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 สาร MCC ยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของ I κ B α และ NF- κ B/p65

นอกจากนี้ทำการทดสอบผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี NF- κ B โดยวิเคราะห์ผลต่อ nuclear translocation NF- κ B/p65 ด้วยเทคนิค Immunofluorescence พบว่าสาร MCC ความเข้มข้น 25 μ M สามารถลด nuclear translocation NF- κ B/p65 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 12 ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสาร MCC ยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของ I κ B α ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสได้ จึงลดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น ยีน iNOS และ COX-2



รูปที่ 12 ผลของสาร MCC ต่อ nuclear translocation NF- κ B/p65

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การอักเสบของระบบประสาท เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะความเสื่อมของสมองหรือระบบประสาท โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการอักเสบนี้ คือเซลล์ไมโครเกลีย ซึ่งถูกกระตุ้นโดยเชื้อจุลชีพ โปรตีน β -amyloid และเซลล์ประสาทที่ตาย (Zhang and Chen, 2015) เมื่อถูกกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียจะหลั่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน ออกมาเพื่อกำจัดสิ่งที่มากระตุ้น และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ไมโครเกลียและเซลล์ประสาทในส่วนต่างๆ ของสมอง นำไปสู่โรคในกลุ่มภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาทต่างๆ (Amor et al., 2010; Glass et al., 2010; Zhang and Chen, 2015; Venkatesan et al., 2015) ดังนั้นการลดการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่จะช่วยป้องกัน หรือยับยั้งความก้าวหน้าของโรคในกลุ่มภาวะความเสื่อมของสมองและระบบประสาทได้

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ไมโครเกลียของหนู (BV2 cell line) เป็นโมเดลในการศึกษา และเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) จากนั้นทำการประเมินการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์ไมโครเกลียโดยวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE_2 จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากเร่วหอม (6.25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และสาร MCC (3.125-25 μM) สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE_2 ได้ โดยไม่ลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่าการที่ปริมาณไนตริกออกไซด์และ PGE_2 ลดลง เกิดจากความสามารถของส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) และสาร MCC ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE_2 เอง ไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษของสารที่มีต่อเซลล์

ไนตริกออกไซด์ และ PGE_2 ที่ถูกผลิตออกมาในขณะที่มีการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS นี้ เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) และ COX-2 (Rao and Knaus, 2008) ตามลำดับ จึงทำการศึกษาผลของส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) และสาร MCC ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน พบว่า ส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) ยับยั้งปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 ได้ ในขณะที่สาร MCC ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (6.25-25 μM) ลดปริมาณโปรตีน iNOS แต่ไม่สามารถลดปริมาณโปรตีน COX-2 ได้ ดังนั้นการลดลงของปริมาณไนตริกออกไซด์ เป็นผลมาจากการลดการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS ทำให้ปริมาณโปรตีน iNOS ลดลงด้วย ส่วนการลดลงของปริมาณ PGE_2 จากส่วนสกัดจากเร่วหอม เป็นผลมาจากการลดการแสดงออกของ

mRNA และโปรตีนของ COX-2 ในขณะที่การลดลงของ PGE₂ จากสาร MCC ไม่ได้เป็นผลจากการลดโปรตีน COX-2 เนื่องจากสาร MCC ไม่ได้ทำให้โปรตีน COX-2 ลดลง แต่อาจเป็นผลมาจากสารไปยับยั้ง COX-2 activity ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

เป็นที่ทราบกันดีว่าการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokines โดยการกระตุ้นด้วย LPS ถูกควบคุมส่วนหนึ่งโดยวิถี NF-**KB** (Zhang et al., 2012) จากการศึกษาของเราพบว่าสาร MCC สามารถลดการฟอสโฟริเลชันบนโปรตีน inhibitor of **KB** (I**KB**) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นั่นคือลดการกระตุ้นของวิถี NF-**KB** นั่นเอง นอกจากนี้ยังสามารถลดการฟอสโฟริเลชันบนโปรตีน NF-**KB** p65 subunit และทำให้การเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีน NF-**KB** p65 ลดลงด้วย ดังนั้นกลไกการต้านอักเสบของสาร MCC ในเซลล์ไมโครเกลียของหนู (BV2) เป็นผลมาจากการที่สารลดการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF-**KB** โดยลดกระบวนการฟอสโฟริเลชันบนโปรตีน I**KB** ทำให้ I**KB** ไม่ถูกทำลายด้วยการกระบวนการ proteasome-mediated proteolytic จึงยังคงจับอยู่กับ NF-**KB** ทำให้ NF-**KB** เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้น้อยลง ส่งผลให้กระบวนการถอดรหัสของยีน iNOS และ COX-2 เกิดได้น้อยลง และในที่สุดทำให้การผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ ลดน้อยลงด้วย จึงมีการอักเสบลดลงด้วย

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร MCC ในการลดการอักเสบในเซลล์ไมโครเกลียของหนู (BV2) กับในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 พบว่าสาร MCC สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ไมโครเกลียของหนูได้ดีกว่าในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (IC₅₀ = 3.125-6.25 μM vs 8-15 μM) แต่ความสามารถในการลดการผลิต PGE₂ ของสาร MCC ในเซลล์ทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน (IC₅₀ = 6.25 μM vs 26.2 μM) (Mankhong et al., 2018; Mankhong et al., 2019) กลไกในการต้านอักเสบของสาร MCC ในเซลล์ไมโครเกลียของหนูเกิดผ่านการลดการกระตุ้นวิถี NF-**KB** โดยการลดปริมาณ phosphor- I**KB** และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีน NF-**KB** p65 เช่นเดียวกับกลไกในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Mankhong et al., 2019)

ผลการศึกษาช่วยยืนยันประสิทธิภาพในการต้านอักเสบของส่วนสกัดจากเร่วหอม และสาร MCC นอกเหนือจากการต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Srisook et al., 2017; Mankhong et al., 2018; Mankhong et al., 2019) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (Srisook et al., 2019) และในหนูทดลอง (กล่าวขวัญ ศรีสุขและคณะ, ยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่) โดยส่วนสกัดจากเร่วหอม (2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) มี

ความปลอดภัยสูงโดยไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังต่อหนูทดลอง (กล่าวขวัญ ศรีสุขและคณะ, ยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่) ดังนั้นส่วนสกัดจากเร่วหอม และสาร MCC จึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นองค์ประกอบของอาหารฟังก์ชัน หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ รวมทั้งภาวะความเสื่อมของสมองหรือระบบประสาท

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) และสาร MCC มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ไมโครเกลียของหนู (BV2) โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE_2
2. ส่วนสกัดจากเร่วหอม (EPE) ลดการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในระดับโปรตีน และ mRNA ในเซลล์ไมโครเกลียของหนู ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC
3. สาร MCC ลดการแสดงออกของยีน iNOS ในระดับโปรตีนและ mRNA ในเซลล์ไมโครเกลียของหนู ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC แต่ไม่ลดระดับโปรตีน COX-2
4. สาร MCC ลดการ phosphorylation ของ I κ B และ NF- κ B p65 รวมทั้งลด nuclear translocation ของ NF- κ B ในเซลล์ไมโครเกลียของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC

บรรณานุกรม

กรมกิจการผู้สูงอายุ. (ม.ป.ป.). สัดส่วนของประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไป ในประเทศอาเซียน พ.ศ. 2543 – 2568. http://www.dop.go.th/main/knowledge_detail.php?id=2725c5ee2a671b72625617571260c974&type=34

กรมสุขภาพจิต. (ม.ป.ป.). สถานการณ์ปัญหาสุขภาพผู้สูงอายุ. www.dmh.go.th/downloadportal/Strategy/ผู้สูงอายุ.pdf

พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พิษสมุนไพรรักษาโรคในสวนป่าสมุนไพรรักษาหื่นซ้อณ ฉบับสมบูรณ. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณภณท์ ปราจีนบุรี. 301น.

พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุณีเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาตึหลากเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.

พึรยุทธ สึทึธิไชยากุล. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชา 499303 หลักพยาธิวิทยาและนึตึเวศศาสตรึ. ภาควึชาพยาธิวิทยาและนึตึเวศศาสตรึ คณะแพทยศาสตรึ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สมศัศฎึ ชุณทรึศมึ. (2553). สถานการณ์ผู้สูงอายุไทย พ.ศ. 2552. กรุงเทพฯ: มูลนึตึธึสถาบันวึจึยและการพัฒนาผู้สูงอายุไทย.

เอกรึฐฐึ ศรึสุข และ กล่าวขวัญ ศรึสุข. (2555). การศึษาสารออกฤทธีทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวึจึยฉบับสมบูรณ คณะวึทยาศาสตรึ มหาวิทยาลัยบูรพา.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.

Buapool D, Mongkol N, Chantimal J, Roytrakul S, Srisook E, Srisook K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 146 : 465-504.

Chow YL, Lee KH, Vidyadaran S, Lajis NH, Akhtar MN, Israf DA, Syahida A. (2012). Cardamonin from *Alpinia rafflesiana* inhibits inflammatory responses in IFN- γ /LPS-stimulated BV2 microglia via NF- κ B signalling pathway. *International Immunopharmacology*. 12(4):657-665.

Coleman JW. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 1:1397-1406.

Han O, Yuan Q, Meng X, Huo J, Bao Y, and Xie G. (2017). 6-Shogaol attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating PPAR- γ . *Oncotarget*. 8:42001-42006

Ho SC, Chang KS, Lin CC. (2013). Anti-neuroinflammatory capacity of fresh ginger is attributed mainly to 10-gingerol. *Food Chemistry*. 141: 3183-3191.

lawsipo, P., Srisook, E., Ponglikitmongkol, M., Tatiyar, S., Singaed, O. (2018). Cytotoxic effects of *Etlingera pavieana* rhizome on various cancer cells and identification of a potential anti-tumor component. *Journal of Food Biochemistry*, e12540: 1-9.

Jung, H.W., Yoon, C.H., Park, K.M., Han, H.S., Park, Y.K. (2009). Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1190-1197.

Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:9730-9734.

Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, Jin Y, Li X, Hwang SL, Kwon O, Chang YC, Park YG, Park SS, Son JK, Kim CH, Chang HW. (2012). Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- κ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology*. 12:175–181.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15:323-350.

Mankhong, S., Srisook, E., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. *NU. International Journal of Science*. 14(2), 58-66.

Mankhong, S., lawsipo, P., Srisook, E. Srisook, K. (2019). 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes inhibits inflammatory response via suppression of

NF- κ B, Akt and AP-1 signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Phytomedicine*, 54, 89-97.

Park SY, Jin ML, Kim YH, Kim Y, Lee SJ. Anti-inflammatory effects of aromatic-turmerone through blocking of NF- κ B, JNK, and p38 MAPK signaling pathways in amyloid β -stimulated microglia. *International Immunopharmacology*. 14:13–20.

Rao PP, Knaus EE. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 11 :81s-110s.

Serhan CN, Levy B. (2003). Success of prostaglandin E₂ in structure–function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 8609-8611.

Srisook, K., Srisook, E., Nachaiyo, W., Chan-In, M., Thongbai, J., Wongyoo, K., et al. (2015). Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 94-102.

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. *Pharmacognosy Magazine*, 13, 50, s230-235.

Srisook, K., Potiprasart, K., Sarapusit, S., Park, C.S., Srisook, E. (2019). *Etlingera pavieana* extract attenuates TNF- α induced vascular adhesion molecule expression in human endothelial cells through NF- κ B and Akt/JNK pathways. *Inflammopharmacology* (In press) DOI:10.1007/s10787-019-00676-4.

Tak PP, Firestein GS. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 107: 7-11.

Udompong, S., Mankhong, S., Jaratjaroonphong, J., Srisook, K. (2017). Involvement of p38 MAPK and ATF-2 signaling pathway in anti-inflammatory effect of a novel compound bis[(5-methyl)2-furyl](4-nitrophenyl)methane on lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*, 50, 6-13.

Venkatesan, R., Ji, E.H., Kim, S.Y. (2015). Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: A comprehensive review. *BioMed Research International*. Volume 2015, Article ID 814068, 22 pages. DOI. 10.1155/2015/814068.

Yang Y, Moh SH, Yu T, Park JG, Yoon DH, Kim TW, Kim SH, Lee S, Hong S, Cho JY. (2012). Methanol extract of *Osbeckia stellata* suppresses lipopolysaccharide and HCL/ethanol-induced inflammatory responses by inhibiting Src/Syk and IRAK-1. *Journal of Ethnopharmacology* 143 : 876-883.

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.