



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสาร
สกัดจากใบรางจืด (Study on the anti-inflammatory
mechanisms of *Thunbergia laurifolia* leaf extracts)

โดย ผศ. ดร. ปราโมทย์ มหคุณากร และคณะ

กันยายน 2553

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DIGSI80028
 ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด
 นักวิจัย : ผศ. ดร. ปราโมทย์ มหคุณากร, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 E-mail Address : pramah@kku.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 1 มีนาคม 2551 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2553 (ต่อโครงการถึง กันยายน 2553)

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ในตำรายาสมุนไพรรายงานว่ารางจืดมีสรรพคุณในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสมุนไพรรางจืดดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืดโดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ ซึ่งการศึกษาฤทธิ์แก้ปวดและต้านอักเสบของสกัดใบรางจืดในหนูถีบจักรพบว่าสารสกัดใบรางจืดด้วยเอทานอลขนาด 400 และ 1,000 mg/kg ฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถลดจำนวนครั้งการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมียับยั้ง ได้ 46.26 และ 54.90 % ตามลำดับ ในการทดลอง formalin test พบว่าในช่วง early phase (0-5 นาทีหลังจากฉีด formalin) สารสกัดใบรางจืดขนาด 200, 400 และ 1,000 mg/kg ฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถลดจำนวนครั้งที่หนูยกเท้าขึ้นเฉลี่ยลงได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีผลยับยั้งได้ 29.36, 32.31 และ 47.57 % ตามลำดับ สำหรับในช่วง late phase (20-30 นาทีหลังจากฉีด formalin) พบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 200, 400 และ 1,000 mg/kg ฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถลดจำนวนครั้งที่หนูยกเท้าขึ้นเฉลี่ยลงได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีผลยับยั้งได้ 52.12, 69.59 และ 74.76 % ตามลำดับ จากการทดลอง croton oil-induced ear edema พบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear ทาบริเวณใบหู สามารถลดการบวมของหูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีผลยับยั้งอาการบวมได้ 36.89, 44.86 และ 58.22 % ตามลำดับ ในการทดลอง cotton pellet-induced granuloma พบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 200, 400 และ 1,000 mg/kg ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง สามารถลดการเกิด tissue granulation ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลลดได้ 14.35, 16.55 และ 18.09 % ตามลำดับ จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบรางจืดในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) พบว่า LPS สามารถกระตุ้นมาโครฟาจเซลล์ให้หลั่งสาร inflammatory mediators หลายชนิดเช่น nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 μ g/ml เมื่อให้ร่วมกับสาร LPS สามารถลดการหลั่งสาร NO, PGE₂ และ TNF- α จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เดียวกันสารสกัดใบรางจืดยังมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2

(COX-2) และ TNF- α ภายในเซลล์มาโครฟาจด้วย จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า
สมุนไพรรางจืดมีฤทธิ์ต้านอักเสบ และฤทธิ์ต้านอักเสบนี้มีผลมาจากการยับยั้งการสร้าง NO,
PGE₂ และ TNF- α ซึ่งผลดังกล่าวคาดว่าจะเกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2
และ TNF- α

คำสำคัญ : รางจืด, ฤทธิ์ต้านอักเสบ, iNOS, COX-2, TNF- α

ABSTRACT

Project Code : DIGSI80028

Project Title : Study on the anti-inflammatory mechanisms of *Thunbergia laurifolia* leaf extracts

Investigator : Assistant Professor Dr. Pramote Mahakunakorn
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

E-mail Address : pramah@kku.ac.th

Project Period : 1 March 2008 - 28 February 2010 (Extended to September 2010)

Thunbergia laurifolia Linn. (Acanthaceae) or Rang Chuet is used as a folk medicine in Thailand. Various parts of this plant are traditionally used for the treatment of inflammation. However, little is known about the mechanism(s) underlying its anti-inflammatory activities. In this study, the anticeptive and anti-inflammatory of ethanol extract of *Thunbergia laurifolia* leaf were determined by using writhing test, formalin test, croton oil-induced ear edema and cotton pellet-induced granuloma in mice. Using the writhing test, *Thunbergia laurifolia* leaf extract in a dose of 400 and 1,000 mg/kg (s.c.) significantly inhibited writhing response by 46.26 and 54.90 %, respectively. While the extract cause a significant inhibition of formalin-induced paw licking in mice both in early and late phase of the test. In early phase, the extract at dose of 200, 400 and 1,000 mg/kg (s.c.) significantly suppressed number of licking by 29.36, 32.31 and 47.57 %, respectively. In a late phase, the extract also significantly decreased a number of licking by 52.12, 69.59 and 74.76 %, respectively. Using croton oil-induced ear edema, *Thunbergia laurifolia* leaf extract in a dose of 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear significantly inhibited ear edema by 36.89, 44.86 and 58.22 %, respectively. In cotton pellet-induced granuloma, *Thunbergia laurifolia* leaf extract at dose of 200, 400 and 1,000 mg/kg, (s.c.) resulted in a significant reduction in granuloma weight by 14.35, 16.55 and 18.09 %, respectively. To further investigate the mechanism(s) of the anti-inflammatory action of the extract, the inhibitory effect of the extract on the production of proinflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS) activated macrophage (RAW 264.7) were determined. *Thunbergia laurifolia* leaf extract (6.25, 12.5 and 25 µg/ml), significantly inhibited the production of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Consistent with these observations inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and TNF-α mRNA levels were decreased by *Thunbergia*

laurifolia leaf extract in a concentration-dependent manner. These results suggest that *Thunbergia laurifolia* exhibit the anti-inflammatory effect and its anti-inflammatory effect may results from the inhibition of NO, PGE₂ and TNF- α production probably by suppression of the iNOS, COX-2 and TNF- α mRNA expression.

Key Words: *Thunbergia laurifolia*, Anti-inflammatory, iNOS, COX-2, TNF- α

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอแสดงความขอบคุณอย่างยิ่งต่อหน่วยงานและบุคคลต่อไปนี้ที่มีส่วนร่วม
รวมถึงให้ความช่วยเหลืออย่างมากต่อโครงการวิจัยนี้ จนสามารถลุล่วงได้เป็นอย่างดี

1. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องมาตลอด
ตั้งแต่การสร้างมุมมองในการวิจัย ตลอดจนการสนับสนุนด้านทุนวิจัยและการให้คำปรึกษาตลอด
ระยะเวลาการทำงานวิจัย

2. รศ. ดร. บังอร ศรีพานิชกุลชัย ที่ปรึกษาโครงการวิจัยสำหรับคำแนะนำที่มีประโยชน์ยิ่ง
ทำให้การแก้ปัญหาต่างๆ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

3. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มีส่วนสนับสนุนสถานที่ และเครื่องมือทำการ
วิจัยต่างๆ ตลอดโครงการวิจัย

4. คุณดวงตา ชัยนิคม ให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมใบร่างจิตจากที่ต่างๆ

5. คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นทุก
ท่านที่ได้ให้คำปรึกษา ความเอื้อเฟื้อนานับประการจนทำให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

อย่างไรก็ตามงานวิจัยครั้งนี้อาจมีข้อบกพร่องอยู่บ้าง คณะผู้วิจัยขออภัยขอคิดเห็น
ตลอดจนข้อเสนอแนะต่างๆ ด้วยความยินดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2553

สารบัญหัวข้อ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญหัวข้อ	ฉ
สารบัญรูป	ญ
สารบัญตาราง	ฎ
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 การอักเสบ	5
2.2 สารสื่อกลางในการอักเสบ (Inflammatory mediator)	6
2.2.1 Vasoactive amine	6
2.2.2 สารสื่อกลางที่สร้างขึ้นจากสารประกอบใน plasma	6
2.2.3 Arachidonic acid (AA) metabolites	7
2.2.4 Platelet-activating factor	7
2.2.5 Nitric oxide (NO)	7
2.2.6 Oxygen free radicals	8
2.3 บทบาทของสาร NO, PGE2 และ TNF- α ต่อการอักเสบ	9
2.4 ยาด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory drugs)	10
2.4.1 ยาด้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์	10
(Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)	
2.4.2 ยาด้านการอักเสบในกลุ่มของสเตียรอยด์	11
(Steroidal anti-inflammatory drugs)	
2.5 วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ลดปวดทางเภสัชวิทยา	12
2.5.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน	12
2.5.1.1 วิธี Rat hind paw edema model	12

2.5.1.2	วิธี Croton oil induced ear edema in mice	12
2.5.1.3	วิธี Histamine, 5-HT and PGE ₁ -induced acute inflammation in rats	13
2.5.1.4	วิธีอื่นๆ	13
2.5.2	การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบแบบเรื้อรัง	13
2.5.2.1	วิธี Formaldehyde induced arthritis	13
2.5.2.2	วิธี Cotton pellet implantation in rats	13
2.5.2.3	วิธีอื่นๆ	14
2.5.3	การศึกษาฤทธิ์ลดปวด	14
2.5.3.1	วิธี Writhing test	14
2.5.3.2	วิธี Formalin test	14
2.5.3.3	วิธี Tail flick test	15
2.5.3.4	วิธีอื่นๆ	15
2.6	ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพรรางจืด	16
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.1	สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	22
3.1.1	สารเคมี (Chemicals)	22
3.1.2	วัสดุอุปกรณ์ (Instruments)	22
3.2	วิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)	22
3.2.1	การเตรียมสารสกัดสมุนไพรรางจืด	22
3.2.2	ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในสัตว์ทดลอง (Animal models)	23
3.2.2.1	การเตรียมสัตว์ทดลอง	23
3.2.2.2	Writhing test	23
3.2.2.3	Formalin test	24
3.2.2.4	Croton oil-induced ear edema in mice	24
3.2.2.5	Cotton pellet-induced granuloma in mice	25
3.2.3	ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสมุนไพรรางจืดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay	25
3.2.4	ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)	26

3.2.5	ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin E ₂ (PGE ₂) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)	27
3.2.6	ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)	28
3.2.7	ศึกษาผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ TNF- α ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูก กระตุ้นด้วยสาร LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	29
3.2.7.1	การเพาะเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นการสร้าง iNOS, COX-2 และ TNF- α ด้วย LPS	29
3.2.7.2	การสกัด total RNA	29
3.2.7.3	การสร้างสาย complementary DNA (cDNA)	30
3.2.7.4	การทำเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	30
3.2.7.5	การทำเทคนิค Agarose gel electrophoresis	31
3.2.8	ศึกษาความสามารถในการจับ nitric oxide (NO scavenging activity) ของสารสกัดใบรางจืด	31
3.3	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	31
บทที่ 4	ผลการศึกษา	32
4.1	สารสกัดสมุนไพรใบรางจืด	32
4.2	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการลดปวดและต้านอักเสบในสัตว์ทดลอง	32
4.2.1	Writhing test	32
4.2.2	Formalin test	34
4.2.3	Croton oil-induced ear edema in mice	37
4.2.4	Cotton pellet-induced granuloma in mice	38
4.3	ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)	39
4.4	ผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)	40

4.5 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง prostaglandin E ₂ (PGE ₂) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)	44
4.6 ผลของสารสกัดจากรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)	45
4.7 ความสามารถในการจับไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging activity) ของสารสกัดจากรางจืด	46
4.8 ผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ TNF- α	47
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	53
5.1 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	53
5.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	60
5.3 Output จากโครงการวิจัย	61
บรรณานุกรม	63

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2-1	แสดงส่วนประกอบของต้นรางจืด ใบ (ก), ลำต้นและใบ (ข) และดอก (ค)	16
รูปที่ 4-1	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง writhing response ของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ถูกฉีด acetic acid เข้าภายในช่องท้อง (n = 7)	33
รูปที่ 4-2	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความเจ็บปวดของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าที่เท้าในระยะ early phase ระหว่างช่วงเวลาที่ 0-5 นาที (n = 7)	36
รูปที่ 4-3	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความเจ็บปวดของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าที่เท้าในระยะ late phase ระหว่างช่วงเวลาที่ 20-30 นาที (n = 7)	36
รูปที่ 4-4	ผลของ ยา indomethacin และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการบวมของใบหูหนู mice ที่ได้รับสาร croton oil เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 6) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบ กับกลุ่มควบคุม	37
รูปที่ 4-5	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด tissue granulation ของสารสกัดใบรางจืดและ prednisolone ในหนู mice ที่ได้รับการผ่าตัดเอาก่อนสาลีเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหน้าท้อง, (n = 7)	39
รูปที่ 4-6	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว	40
รูปที่ 4-7	ผลของ LPS ที่มีต่อความมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร LPS ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ข้อมูลแสดงในรูป Mean $\pm$ SE (n=8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร LPS	42
รูปที่ 4-8	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้าง NO ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างไนตริกออกไซด์ด้วยสาร LPS ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE. (n = 8) * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS	43

รูปที่ 4-9	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้างสาร PGE ₂ ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว)	45
รูปที่ 4-10	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว	46
รูปที่ 4-11	ผลของสารสกัดใบรางจืด ต่อการแสดงออกของ iNOS mRNA (A) ผลการยับยั้งการสร้าง iNOS mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) กราฟแท่งแสดงผลการยับยั้งการสร้าง iNOS mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n = 3) * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS	48
รูปที่ 4-12	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการแสดงออกของ COX-2 mRNA (A) ผลการยับยั้งการสร้าง COX-2 mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) กราฟแท่งแสดงผลการยับยั้งการสร้าง iNOS mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n = 3) * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS	50
รูปที่ 4-13	ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการแสดงออกของTNF- α mRNA (A) ผลยับยั้งการสร้าง TNF- α mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ(RAW 264.7) ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) กราฟแท่งแสดงผลการยับยั้งการสร้าง TNF- α mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n = 3) * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS	52

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2-1	สรุปการเปลี่ยนแปลงและชนิดที่สำคัญของสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) ที่เป็นสาเหตุตลอดจนแหล่งสร้างสารสื่อกลางที่สำคัญ	8
ตารางที่ 2-2	สารเคมีที่พบในส่วนไบและดอกรางจืด	18
ตารางที่ 2-3	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของต้นรางจืด	19
ตารางที่ 4-1	ผลของ aspirin และสารสกัดใบรางจืดต่อการเกิด writhing response ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด 0.75% acetic acid เข้าทางช่องท้อง	33
ตารางที่ 4-2	ผลของ aspirin และสารสกัดใบรางจืดต่อการยกเท้าขึ้นเลียของหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าทางอุ้งเท้าหลัง ในช่วงเวลา 0-5 นาที (early phase)	34
ตารางที่ 4-3	ผลของ aspirin และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยกเท้าขึ้นเลียของหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าทางอุ้งเท้าหลัง ในช่วงเวลา 20-30 นาที (late phase)	35
ตารางที่ 4-4	ผลของ prednisolone และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิด tissue granulation ภายในเวลา 7 วัน หลังจากผ่าตัดฝังก้อนสำลีลงใต้ผิวหนังหนู	38
ตารางที่ 4-5	ผลของ LPS ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ	41
ตารางที่ 4-6	ความสามารถจับสาร nitric oxide ของสารสกัดจากใบรางจืด	46

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

ก.	=	กรัม
กก.	=	กิโลกรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
COX-2	=	Cyclooxygenase-2
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
iNOS	=	inducible nitric oxide synthase
LPS	=	Lipopolysaccharide
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	=	Nitric oxide
TNF- α	=	Tumor necrosis factor-alpha
PGE ₂	=	Prostaglandin E ₂
%	=	ร้อยละ
%w/v	=	ร้อยละของปริมาณต่อปริมาตร
%v/v	=	ร้อยละของปริมาตรต่อปริมาตร
°C	=	องศาเซลเซียส
kg	=	กิโลกรัม
mg	=	มิลลิกรัม
nm	=	นาโนเมตร
ng	=	นาโนกรัม
PBS	=	Phosphate buffer saline
U	=	หน่วย
μ g	=	ไมโครกรัม
μ l	=	ไมโครลิตร
μ M	=	ไมโครโมลาร์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนอง ของ เซลล์ภายในร่างกายต่อสิ่งกระตุ้นหรือสารที่มีอันตรายซึ่งจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันร่างกายทั้ง humoral และ cellular ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดเล็กๆ ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือด รั่วสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ดังนั้น เม็ดเลือดขาวจึงเคลื่อนเข้าสู่บริเวณอักเสบ เกิดกระบวนการ ทำลายสิ่งแปลกปลอม ไลโซโซมแตก ปลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยเซลล์ใกล้เคียง อาการที่ปรากฏคือ ปวด บวม แดง และร้อน อันเป็นผลมาจากการที่สารสื่อกลาง (mediators) หรือตัวกระตุ้นอื่นไป กระตุ้นปลายประสาททำให้รู้สึกปวด มีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดทำให้ เกิดอาการบวม ขนาดและการไหลของเลือดในหลอดเลือดฝอยเปลี่ยนแปลงทำให้บริเวณนั้นแดง และร้อน

สาร nitric oxide (NO) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) จัดเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ สารทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage โดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จัดเป็น inducible enzyme โดยจะถูกชักนำให้สร้างขึ้น เป็นปริมาณมากจากสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin สาร PGE₂ มีบทบาทในการ เหนียวนาการสร้าง inflammatory mediator อื่นๆ อีกหลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง และมีไข้ ในขณะที่ NO มีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่าน ของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ

สาร tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ถูกผลิตโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด โมโนไซต์ (monocyte) และแมคโครฟาจ (macrophage) ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอมหรือระบบ ภูมิคุ้มกัน ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ทั้งชนิดบีและที รวมทั้งไฟโบรบลาสต์ TNF- α จัดเป็นสาร ชัย โตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อและกระตุ้นการผลิต สารตัวกลางสำหรับกระบวนการอักเสบ (inflammatory mediator) หลายชนิด เช่น interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) และ granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF)

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับ inflammatory mediators ดังกล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นว่า การยับยั้ง การทำงานของ mediators ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ NO, PGE₂ และ TNF- α จะเป็น แนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาอาการอักเสบ ดังนั้นยาหรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการ สร้างหรือยับยั้งการทำงานของ iNOS, COX-2 และ TNF- α ได้ก็จะสามารถยับยั้งหรือบรรเทาการ

อักเสบได้ด้วย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นกลไกในการออกฤทธิ์ของยาต้านอักเสบแผนปัจจุบันส่วนใหญ่ เช่น ยากลุ่ม NSAIDs และ steroids แต่ยาดังกล่าวมักมีฤทธิ์ข้างเคียงและผลไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบทางเดินอาหาร ส่วนยาที่มีผลข้างเคียงต่ำยังมีราคาค่อนข้างสูง ประชาชนที่มีรายได้น้อยยังไม่สามารถซื้อหามาใช้ได้ ดังนั้นการนำสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบมาพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อยน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา เนื่องจากมีราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบันและยังสามารถนำทรัพยากรของประเทศมาใช้ประโยชน์ได้ ปัจจุบันการศึกษาผลของยาหรือสมุนไพรในการยับยั้ง iNOS, COX-2 และ TNF- α สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อใช้เป็น *in vitro* model ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของยาหรือสารสกัดสมุนไพร ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของยาหรือสมุนไพรในระดับเซลล์ (Kim et al., 2003; Shin et al., 2004)

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ในตำรายาสมุนไพรรายงานว่ารางจืดมีสรรพคุณเป็นยาถอนพิษ แก่พิษเบื่อเมาหรือใช้ปรุงเป็นยาเขียวถอนพิษไข้ แก่ร้อนในกระหายน้ำ เข้ายารักษาโรคอักเสบและปวดบวม (ชะลอ, 2539; นันทวัน และอรนุช, 2539) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในรางจืดพบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ เอพิจินิน (apigenin), โคสโมซิน (cosmosin) และ delphinidin-3, 5-di-O- β -D-glucose (นันทวัน และอรนุช, 2539; ภูมิพิชญ์, 2539) อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลสนับสนุนกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญเหล่านี้

รายงานการศึกษาปัจจุบันพบว่ารางจืดมีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพลกซ์ ลดความดันโลหิต และลดพิษจากยาฆ่าแมลง จากการศึกษาของสกุลรัตน์ อุษณารักษ์ และคณะ (2543) รายงานว่าสารสกัดจากใบรางจืดสามารถช่วยลดพิษพาราควอตในหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พาณี เตชะเสน และชัชวดี ทาบทอง (2523) พบว่าเมื่อให้หนูกินสารสกัดใบรางจืดสามารถลดอัตราการตายของหนูจากการได้รับสารโพลิดอลซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate ได้ดีกว่าการฉีด ส่วนฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืดนั้นได้มีรายงานการวิจัยหลายชิ้นดังนี้ Charumanee et al. (2001) พบว่าสารสกัดใบรางจืดด้วย ethanol และ hexane สามารถลดอาการอักเสบของอุ้งเท้าและใบหูของหนูทดลองโดยการทาได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดความเข้มข้น 30% สามารถลดอาการอักเสบได้เทียบเท่า 1% diclofenac จากการศึกษาของมณฑิยา เปสึ และคณะ (2544) พบว่าในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้ rat ear edema model สารสกัดใบรางจืดด้วย ethanol ความเข้มข้น 50% สามารถลดอาการบวมแดงที่ใบหูของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่น้อยกว่า 0.1% triamcinolone จากการศึกษาโดยวิธี carageenan induced rat paw edema พบว่าสารสกัดรางจืด (1 g/kg) มีฤทธิ์ป้องกันการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยลดการบวมได้มากกว่าร้อยละ 50 นอกจากนั้น การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากรางจืดนั้น พบว่าสารสกัดรางจืดหยาบไม่มีพิษต่อสัตว์ทดลองจากการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารังจืดเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพ สามารถพัฒนาเป็นยาแก้ปวดและต้านอักเสบ เพื่อให้ได้รูปแบบยาที่มีฤทธิ์ในการรักษาที่ดีและมีผลข้างเคียงต่ำ สามารถใช้ทดแทนยาแก้ปวดและต้านอักเสบแผนปัจจุบันที่มีผลข้างเคียงต่อทางเดินอาหารค่อนข้างสูงและมีราคาแพง แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์ที่รับรองเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากรังจืดทั้งในระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุล ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากรังจืดโดยศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองและศึกษาผลของสารสกัดต่อการสร้างสาร NO, PGE₂ และ TNF- α รวมไปถึงผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารเหล่านี้ ได้แก่ inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 และ TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) เนื่องจากสาร inflammatory mediators เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของการอักเสบ การทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบจะเป็นการยืนยันฤทธิ์ต้านอักเสบของสมุนไพรรังจืด และช่วยส่งเสริมการนำพืชสมุนไพรรังจืดมาใช้ในการงานสาธารณสุขมูลฐาน เพื่อพัฒนาเป็นยาแก้ปวด ต้านอักเสบ และศึกษาหาสารเคมีที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- วัตถุประสงค์หลัก : เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากรังจืด
- วัตถุประสงค์รองที่ 1 : เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดรังจืดในสัตว์ทดลอง (Animal models)
- วัตถุประสงค์รองที่ 2 : เพื่อศึกษาผลของสารสกัดรังจืดต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)
- วัตถุประสงค์รองที่ 3 : เพื่อศึกษาผลของสารสกัดรังจืดต่อการยับยั้งการสร้าง prostaglandin E₂ (PGE₂) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)
- วัตถุประสงค์รองที่ 4 : เพื่อศึกษาผลของสารสกัดรังจืดต่อการยับยั้งการสร้าง tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)
- วัตถุประสงค์รองที่ 5 : เพื่อศึกษาผลของสารสกัดรังจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 และ TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเกี่ยวกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดจากใบรางจืดและผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในสัตว์ทดลอง (*In vivo models*) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารสกัดจากใบรางจืด (95% ethanol extract) ต่อการยับยั้งการสร้างสาร nitric oxide, prostaglandin E₂ และ TNF- α ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) และศึกษาผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อ mRNA expression ของ iNOS, COX-2 และ TNF- α

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด

1.4.2 ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการสร้าง NO, PGE₂ และ TNF- α และผลต่อการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 และ TNF- α

1.4.3 เป็นข้อมูลยืนยันฤทธิ์ต้านอักเสบของพืชสมุนไพรรางจืด เพื่อนำไปใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน

1.4.4 สนับสนุนและส่งเสริมการนำพืชสมุนไพรรางจืดไปใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน เพื่อพัฒนาเป็นยาแก้ปวดและต้านอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อย

1.4.5 เป็นแนวทางสำหรับทำการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับผลของสารสกัดรางจืดต่อการอักเสบและกลุ่มอาการโรคอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น rheumatoid arthritis, osteoarthritis และโรคมะเร็งเป็นต้น

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การอักเสบ

กระบวนการอักเสบเป็นปฏิกิริยาของเซลล์เนื้อเยื่อ (tissue) ของร่างกายที่ตอบสนองต่อสิ่งรบกวน ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย การเกิดปฏิกิริยาจะมีมากหรือน้อยจะเกิดขึ้นเร็วหรือช้า ขึ้นอยู่กับชนิดและความรุนแรงของสิ่งที่มากระทบ และความต้านทานรวมทั้งความทนต่อภาวะผิดปกติของแต่ละบุคคลด้วย เนื่องจากกระบวนการอักเสบเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ซึ่งเป็นผลจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันปกติของร่างกาย จะเกิดขึ้นเมื่อเนื้อเยื่อถูกกระทบกระเทือนมีบาดแผลหรือบาดเจ็บโดยกระบวนการนี้จะอาศัยทั้ง humoral และ cellular immunity เพื่อไปทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหายให้กลับสู่สภาพเดิม อาการของการอักเสบส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และจากความพยายามของร่างกายที่จะปรับสภาพให้คืนสู่สภาพเดิม ซึ่งผลที่ได้อาจทำให้หายจากการอักเสบหรือการอักเสบนั้นทวีความรุนแรงมากขึ้น (พิมพ์พรณ เกิดอุดม, 2520) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดเล็กๆ ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือดรั่วสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ดังนั้น เม็ดเลือดขาวจึงเคลื่อนเข้าสู่บริเวณอักเสบมีผลให้ไลโซโซมแตกออกและปลดปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมและเซลล์ใกล้เคียง อาการที่ปรากฏคือ ปวด บวม แดง และร้อน สาเหตุของอาการดังกล่าวเกิดเนื่องมาจาก inflammatory mediator และ proinflammatory cytokine เช่น nitric oxide (NO) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) ที่ถูกปลดปล่อยออกมากระตุ้นบริเวณปลายประสาททำให้รู้สึกปวด มีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดทำให้เกิดอาการบวม และเกิดการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือดฝอยทำให้บริเวณที่เกิดการอักเสบมีลักษณะแดงและร้อน (Zeilhofer et al., 2007)

โดยทั่วไปการอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation)

1. การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation)

การอักเสบเฉียบพลัน เกิดในเวลาสั้น ๆ เพียงไม่กี่นาทีไปจนกระทั่งหนึ่งถึงสองวัน ลักษณะสำคัญคือมีของเหลวประกอบด้วยโปรตีนจากพลาสมาและเม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณที่อักเสบ เรียกว่า exudation เม็ดเลือดขาวในการอักเสบเฉียบพลันส่วนมากเป็น neutrophil เมื่อเกิดการอักเสบ อาการปวด บวม แดง ร้อน และเสียหายที่การทำงานของอวัยวะนั้นจะปรากฏให้เห็น อาการเหล่านี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนเลือด การเพิ่ม permeability ของหลอดเลือดและการมีเม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณอักเสบ ปฏิกิริยาทั้งสามนี้อาจมีบางส่วนเกิดขึ้นพร้อมกันหรือมีการใช้สารตัวกลางร่วมกัน

2. การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation)

การอักเสบเรื้อรัง คือการอักเสบเรื้อรังที่มีระยะเวลาเป็นอยู่นาน ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบยังคงมีอยู่ และไม่ได้ถูกกำจัดออกไปให้หมด อาจเกิดตามมาจากการอักเสบแบบเฉียบพลัน หรือเป็นการตอบสนองของร่างกายต่อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมอย่างค่อยเป็นค่อยไปไม่รุนแรง โดยไม่จำเป็นต้องมีการอักเสบเฉียบพลันนำมาก่อนก็ได้ บางกรณีอาจแยกแยะระหว่างการอักเสบเฉียบพลันกับเรื้อรังได้ไม่ชัดเจน โดยทั่วไปถือเอาระยะเวลาของการอักเสบเป็นหลักกล่าวคือ ถ้าการอักเสบเกิดนานหลายสัปดาห์ หรือเป็นเดือนจะถือเป็นการอักเสบแบบเรื้อรัง การแยกที่ดีที่สุดคือดูจากปฏิกิริยาและเซลล์ที่ตอบสนองการอักเสบ และคงต้องพิจารณาถึงปัจจัยอื่นที่จะทำให้การอักเสบหายช้าด้วย เช่น สภาพร่างกายของผู้ป่วย ระบบภูมิคุ้มกัน ความรุนแรง และสาเหตุของการอักเสบ เป็นต้น

2.2 สารสื่อกลางในการอักเสบ (Inflammatory mediator) (จินตนา จุลทัศน์, 2550)

สารสื่อกลาง หรือ mediator ในการอักเสบมีแหล่งที่มาจาก plasma โดยอยู่ในรูปของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาโดยเซลล์บางชนิด สารสื่อกลางเหล่านี้จะไปจับกับ receptor ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันบนเซลล์ต่าง ๆ ที่มีบทบาทในการอักเสบ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แตกต่างกันไปตามชนิดของสารสื่อกลาง และชนิดของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย (target cell) สารสื่อกลางส่วนใหญ่มีอายุสั้น มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ไม่นาน สารสื่อกลางบางชนิดกระตุ้นให้เซลล์สร้าง secondary mediator ต่อไปอีกเป็นการขยายผลปฏิกิริยาการอักเสบ

สารสื่อกลางกลุ่มที่สำคัญได้แก่

2.2.1 Vasoactive amine

สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ histamine และ serotonin สำหรับ histamine จัดเป็นสารสื่อกลางที่สำคัญในการเพิ่ม permeability ของหลอดเลือดในระยะแรกโดยไปจับกับ H_1 receptor บนเซลล์บุผนังหลอดเลือด ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดหดตัวและมีช่องว่างระหว่างเซลล์เพิ่มขึ้น และยังทำให้หลอดเลือดแดงขนาดเล็กขยายตัว เซลล์สำคัญในการสร้าง histamine ได้แก่ mast cell ซึ่งพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่บริเวณรอบหลอดเลือด basophil และเกร็ดเลือด (platelet) ปัจจัยที่กระตุ้นการหลั่ง histamine ได้แก่ ความร้อน ความเย็น การบาดเจ็บ ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่มีการกระตุ้น mast cell, anaphylatoxin ที่สร้างจาก complement system, histamine-releasing protein ที่สร้างจากเม็ดเลือดขาว, neuropeptide และ cytokine

2.2.2 สารสื่อกลางที่สร้างขึ้นจากสารประกอบใน plasma

สารสื่อกลางในกลุ่มนี้ประกอบด้วยระบบสารสื่อกลางที่สำคัญ 3 ระบบ ได้แก่ ระบบ kinin ระบบ complement และระบบการแข็งตัวของเลือด ทำงานสัมพันธ์กันในกระบวนการอักเสบ โดย kinin มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดมากที่สุด ขณะที่ complement มีผลต่อทั้งหลอดเลือดและเป็นสาร chemotactic

2.2.3 Arachidonic acid (AA) metabolites

กลุ่มสารที่สำคัญในสารสื่อกลางกลุ่มนี้ ได้แก่ prostaglandins และ leukotrienes หรือเรียกรวมกันว่า eicosanoids arachidonic acid เป็นกรดไขมันชนิด polyunsaturated ตามปกติจะพบอยู่ในรูป esterified ภายใน phospholipid ของ cell membrane ของเซลล์ต่าง ๆ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อเกิดภัยอันตรายต่อเนื้อเยื่อหรือจากการอักเสบ จะเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase โดย C5a ทำให้เกิดการย่อย phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์และปลดปล่อยกรดไขมันนั้นออกมาจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid จนเกิดเป็นสารสื่อกลาง มีจำนวนมาก ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการอักเสบเกือบทุกขั้นตอน สารสื่อกลางที่สำคัญ ได้แก่

- prostaglandin E₂ (PGE₂) มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด มีบทบาทในการก่ออาการปวด และไข้
- thromboxane A₂ มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัวและกระตุ้นการจับกลุ่มของเกร็ดเลือด
- leukotriene C₄ leukotriene D₄ และ leukotriene E₄ มีฤทธิ์เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดและทำให้หลอดเลือดหดตัว
- leukotriene B₄ เป็น chemotactic factor ที่สำคัญมาก และมีฤทธิ์ทำให้เกิดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว

2.2.4 Platelet-activating factor

สร้างขึ้นจากสารจำพวก phospholipid โดย basophil และเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ มีฤทธิ์กระตุ้น platelet aggregation และ degranulation ทั้งยังมีฤทธิ์เกี่ยวกับการอักเสบอื่นอีกมากมาย

2.2.5 Nitric oxide (NO)

เป็นอนุพันธ์อิสระรูปก๊าซที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและไขมัน, NO มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ โดยต่างจากสารเคมีสื่อกลางชนิดอื่นตรงที่มีโครงสร้างโมเลกุลง่ายไม่ซับซ้อน (N=O) ไม่มีการเก็บสะสมแต่จะสร้างขึ้นเมื่อได้รับภัยอันตรายและใช้วิธี diffusion ไปออกฤทธิ์ที่เซลล์เป้าหมาย เซลล์ที่สามารถสร้าง NO ได้แก่ เซลล์บุผนังหลอดเลือด, macrophage และ neuron บางกลุ่มในสมอง NO ถูกสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน L-arginine, ออกซิเจน และ NADPH โดยมีเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) เปลี่ยนให้ เป็น L-citrulline และ NO เอนไซม์ NOS มี 2 รูปแบบที่สำคัญคือ constitutive NOS (cNOS) และ inducible NOS (iNOS)

cNOS พบในเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเซลล์ประสาท การทำงานของ cNOS ต้องอาศัยแคลเซียมและจะผลิต NO ออกมาในปริมาณน้อย ส่วน iNOS นั้นพบใน macrophage และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด ทำงานได้โดยไม่ต้องมีแคลเซียม และจะผลิต NO ออกมาในปริมาณมาก อนุพันธ์ NO ที่ได้จะไปจับกับส่วนของ heme protein ในเอนไซม์ guanylyl cyclase และกระตุ้นให้เอนไซม์นี้ทำงาน ผลสุดท้ายจะได้ปริมาณ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) เพิ่มขึ้น ซึ่งจะไปทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวเกิดหลอดเลือดขยายตัวตามมา นอกจากนี้ NO ยังไปลดการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด การเกาะติดกับผนังหลอดเลือด และ NO ที่ถูกสร้างจาก macrophage ยังมีฤทธิ์ทำลายเซลล์เป้าหมาย เช่น เซลล์มะเร็งและจุลชีพได้โดยตรง

2.2.6 Oxygen free radicals

ได้แก่ superoxide, hydrogen peroxide, hydrogen ion เกิดเมื่อ neutrophil หรือ macrophage จับกับสาร chemotactic หรือขณะจับกินสิ่งแปลกปลอม อนุพันธ์เหล่านี้มีผลให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดถูกทำลาย ทำให้ permeability ของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น หยุดการทำงานของ antiprotease เช่น α -1-antitrypsin ทำให้ protease ทำงานมาก มีการทำลายเนื้อเยื่อ elastin หรือคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ทำอันตรายต่อเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดแดง และเนื้อเยื่อโดยตรง ร่างกายมีกลไกป้องกันอนุพันธ์เหล่านี้ไว้ในซีรัม เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ โดยอยู่ในรูปของ ceruloplasmin, transferrin, superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase ดังนั้นผลของอนุพันธ์อิสระของออกซิเจนในการอักเสบ จะขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายอนุพันธ์เหล่านี้โดยสารในเซลล์หรือเนื้อเยื่อดังกล่าวข้างต้น

ตารางที่ 2-1 สรุปการเปลี่ยนแปลงและชนิดที่สำคัญของสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) ที่เป็นสาเหตุตลอดจนแหล่งสร้างสารสื่อกลางที่สำคัญ (จินตนา จุลทัศน์, 2550)

การเปลี่ยนแปลง	ชนิดของ mediators	แหล่งที่มาของ mediators
การขยายตัวของหลอดเลือด	- Prostaglandin - NO	- เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium - Macrophage, Endothelium
การเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด	- Vasoactive amine - C3a, C5a - Bradykinin - Leukotriene C ₄ , D ₄ , E ₄ - PAF	- Mast cell, Platelet - Plasma - Plasma - เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium - เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium
Chemotaxis และ leukocyte activation	- C5a - Leukotriene B ₄ - Bacterial products - Cytokine (IL-8)	- Plasma - เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium - แบคทีเรีย - Macrophage, Endothelium
อาการไข้	- IL-1, TNF- α , IL-6 - Prostaglandin	- Macrophage, Activated lymphocyte - เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium
อาการเจ็บปวด	- Prostaglandin - Bradykinin	- เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium - Plasma
การทำลายเนื้อเยื่อ	- Lysosomal enzymes - Oxygen metabolites - NO	- Neutrophil, Macrophage - Neutrophil, Macrophage - Macrophage, Endothelium

2.3 บทบาทของสาร NO, PGE₂ และ TNF- α ต่อการอักเสบ

Nitric oxide (NO) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นมากในกระบวนการอักเสบ โดยมีผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณอักเสบ (Abramson et al., 2001) โดย NO จะทำปฏิกิริยากับสาร superoxide anion เกิดเป็นสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงมากสามารถทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์บริเวณที่มีการอักเสบ การสังเคราะห์ NO จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ปัจจุบันพบว่า NOS ที่พบในร่างกายมี 3 รูป (isozyme) ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) ซึ่ง nNOS และ eNOS เป็นเอนไซม์ที่พบได้โดยทั่วไปในสภาวะปกติ (constitutive enzyme) ในทางตรงกันข้าม iNOS เป็นเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นในปริมาณมาก เมื่อเกิดกระบวนการอักเสบ ซึ่ง iNOS จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานได้โดยสารเคมีบางชนิดเช่น lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ และ proinflammatory cytokines (MacMicking et al., 1997)

Prostaglandin (PGs) จัดเป็นสารจำพวก eicosanoids ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid (AA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญของ phospholipids ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีสิ่งกระตุ้นจากภายนอกเข้ามาจะทำให้ AA หลั่งออกมา และมีเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) เข้ามาเปลี่ยนแปลงสารนี้ จึงเกิดอาการอักเสบ ในกระบวนการสร้างสาร PGs นั้นจำเป็นอย่างยิ่งต้องอาศัยเอนไซม์ cyclooxygenase ในการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้ได้ PGs ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ prostaglandin G₂ (PGG₂), prostaglandin H₂ (PGH₂), prostaglandin I₂ (PGI₂), prostaglandin E₂ (PGE₂) และ thromboxane A₂ (TXA₂) ซึ่งสาร PGE₂ จัดว่าเป็น inflammatory mediator ที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ ในปัจจุบันพบว่า COX เป็น isozymes ที่มี 2 รูป ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ cyclooxygenase-1 (COX-1) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) (Claria, 2003) เอนไซม์ COX-1 เป็น constitutive enzyme ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง PGs ซึ่งมีบทบาทในการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย เช่น ทางเดินอาหาร ไต และเกร็ดเลือด จึงมักพบ COX-1 ได้ทั่วไปในร่างกาย การยับยั้งการทำงานของ COX-1 โดยยาระงับปวดและ nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ทำให้เกิดผลไม่พึงประสงค์ของยา เช่น แผลในทางเดินอาหาร ภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร ส่วนเอนไซม์ COX-2 จะถูกสร้างขึ้นเฉพาะเมื่อเกิดกระบวนการอักเสบ สามารถตรวจพบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ใน macrophages, endothelial cells และ fibroblast เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX-2 (selective COX-2 inhibitors) ซึ่งมีผลยับยั้งการอักเสบแบบจำเพาะเจาะจง โดยมีผลอันไม่พึงประสงค์น้อยกว่ายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX แบบไม่จำเพาะเจาะจง

รายงานการวิจัยหลายชิ้นได้แสดงถึงการเหนี่ยวนำการทำงานของ iNOS และ COX-2 (Kujubu et al., 1991; Lowenstein et al., 1993) ในกระบวนการอักเสบ โดยพบว่า NO และ PGE₂ จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณสูงมากในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ

จากสาร LPS ซึ่งกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นมีผลให้การทำงานของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้น ตามลำดับ จากการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่า การควบคุมการทำงานของยีน iNOS และ COX-2 ถูกควบคุมผ่านกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยอาศัยการทำงานของ nuclear factor- κ B (NF- κ B) (Baeuerle et al., 1991) ข้อมูลการศึกษาโครงสร้างของยีน iNOS และ COX-2 ในบริเวณ 5'-flanking region ของยีนดังกล่าว พบว่ามี cis-acting NF- κ B element (Kujubu et al., 1991; Lowenstein et al., 1993) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ inhibitor κ B kinase (IKK) ผ่านกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีน inhibitor κ B (IKB) ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน IKB จึงทำให้โปรตีน NF- κ B หลุดออกมา แล้วจึงเกิดการเคลื่อนที่ (translocation) ของโปรตีน NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเข้าจับบริเวณ cis-acting NF- κ B element บนยีน iNOS และ COX-2 ทำให้ยีนเหล่านี้สามารถทำงานได้และส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมา (Griscavage et al., 1996)

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ถูกผลิตโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดเช่น โมโนไซต์ (monocyte) และแมคโครฟาจ (macrophage) ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอมหรือระบบภูมิคุ้มกัน ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ทั้งชนิดบี และที รวมทั้งไฟโบรบลาสต์ TNF- α จัดเป็นสารชัยโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตชัยโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิดอื่นๆ และสารตัวกลางสำหรับกระบวนการอักเสบ (inflammatory mediators) หลายชนิด เช่น interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) และ granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) นอกจากนั้น TNF- α ยังกระตุ้นให้ไฟโบรบลาสต์สร้างโมเลกุลสำหรับยึดติด (adhesion molecule) ออกมาที่ผิว ซึ่งตัวโมเลกุลยึดติดเหล่านี้จะจับกับลิแกนด์ (ligand) บนผิวของลิมโฟไซต์ ทำให้มีลิมโฟไซต์เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้น (Shanahan and Clair, 2002)

2.4 ยาต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory drugs)

ยาต้านการอักเสบในปัจจุบันแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

2.4.1 ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)

ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้โดยกลไกหลักจากการยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandins ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบ (inflammatory mediators) ที่สำคัญชนิดหนึ่งในการก่อให้เกิดความเจ็บปวด การบวม อาการไข้ ร่วมกับสารสื่อการอักเสบชนิดอื่นๆ ได้แก่ kinin, histamine, lymphokines, neuropeptide, leukotrienes และ platelet activating factor (PAF) เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้จะยับยั้งการเปลี่ยน arachidonic acid ไปเป็น cyclic endoperoxide (PGG₂ และ PGH₂) โดยการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ cyclooxygenase เป็นผลให้การสร้าง prostaglandins ทุกชนิดน้อยลง เช่น PGE₂, prostacyclin, thromboxane A₂ และในส่วนของ

เอนไซม์ lipoxxygenase ที่ทำให้มีการสร้าง leukotrienes ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง พบว่าขนาดของยา NSAIDs ที่ใช้ในการรักษานั้นส่วนใหญ่จะไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ lipoxxygenase ได้ แสดงให้เห็นว่าการที่ยากลุ่มนี้ทำให้อาการปวด บวม บรรเทาลงน่าจะเป็นผลมาจากการยับยั้งการสร้างสารสื่อการอักเสบจากเอนไซม์ cyclooxygenase เท่านั้น ซึ่งยาแต่ละตัวมีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง COX-1 และ COX-2 แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น celecoxib และ rofecoxib มีความจำเพาะต่อ COX-2 สูง aspirin, indomethacin, piroxicam และ sulindac จะยับยั้ง COX-1 ได้ดีกว่า COX-2 ส่วน ibuprofen และ meclofenamate จะยับยั้ง COX-1 ได้พอๆ กับ COX-2 ได้มีการรักษาด้วย NSAIDs ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจำเพาะต่อ COX-2 แต่มีผลข้างเคียงต่อทางเดินอาหารลดลง (ณัฐฐิยา พงศ์ผาสุก, 2546)

2.4.2 ยาต้านการอักเสบในกลุ่มของสเตียรอยด์ (Steroidal anti-inflammatory drugs)

สเตียรอยด์เป็นฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อร่างกาย และนำมาใช้เป็นยาต้านอักเสบและแก้แพ้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง phospholipase A₂ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างมาจาก phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์ phospholipase A₂ สามารถกระตุ้นการหลั่ง arachidonic acid และถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ COX-2 ให้ได้เป็นสาร PGE₂ ซึ่งเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญตัวหนึ่ง นอกจากนี้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ยังออกฤทธิ์ยับยั้ง migration inhibitory factor ของ macrophages ลดการซึมผ่านของหลอดเลือดและยับยั้งการหลั่งสาร kinin และ prostaglandins ใช้รักษาโรคได้อย่างกว้างขวางซึ่งยาในกลุ่มนี้มีประโยชน์ช่วยบรรเทาอาการของโรคเท่านั้นโดยไม่ได้รักษาที่สาเหตุ การใช้ในโรค เช่น rheumatoid arthritis, osteoarthritis, nephrotic syndrome และ collagen diseases เช่น systemic lupus erythematosus, polyarteritis nodosa และ allergic diseases เช่น serum sickness, contact dermatitis, ลมพิษ, แพ้ยา, angioneurotic edema และ anaphylactic reaction, โรคหอบหืดในกรณี status asthmaticus และเรื้อรังที่มีอาการรุนแรงเท่านั้น, โรคผิวหนัง เช่น eczema, psoriasis, atopic dermatitis และ pruritis, โรคมะเร็งบางชนิด เช่น acute lymphocytic leukemia, lymphoma, breast cancer, โรคตา เช่น allergic ocular diseases ต่างๆ และโรคอื่นๆ เช่น sarcoidosis, thrombocytopenia, idiopathic thrombocytopenia, hemolytic anemia และการผ่าตัด organ transplantation เพื่อป้องกันการปฏิเสธอวัยวะที่ปลูกถ่ายเข้าไป ยากลุ่มสเตียรอยด์สามารถระงับการอักเสบทั้งในระยะเริ่มต้นและระยะสุดท้ายคือ ยับยั้งได้ทั้งอาการ ปวด บวม แดง ร้อน รักษาข้อเข่าเสื่อม และกระบวนการซ่อมแซมและสมานตัวของแผลในระยะของการอักเสบชนิดเรื้อรัง โดยกลไกการออกฤทธิ์มีหลายกลไกด้วยกัน เป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า สเตียรอยด์ยับยั้งการสร้างสารสื่อหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบจากเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและ fibroblast (จิรเดช มโนสร้อยและคณะ, 2546)

Prednisolone เป็นยามาตรฐานในกลุ่มสเตียรอยด์ที่ใช้ในการวินิจฉัยครั้งนี้ ซึ่งสังเคราะห์มาจากadrenal corticosteroid โดยเป็นสารที่สร้างจากธรรมชาติ (adrenal glands) มีคุณสมบัติต้าน

การอักเสบได้อย่างดีและเป็นยาที่มีข้อบ่งใช้อย่างกว้างขวางในสภาวะการอักเสบ เช่น อาการแพ้, การอักเสบบริเวณจมูกและตา, หลอดลมอักเสบ, ผื่นคันที่ผิวหนัง, rheumatic fever, colitis, chronic active hepatitis rheumatoid arthritis, systemic lupus, acute gouty arthritis, psoriatic arthritis, ulcerative colitis และ Crohn's disease เป็นต้น โดยสรุปจะใช้รักษาอาการอักเสบ (ประกอบด้วย อาการ 4 อย่าง คือ ปวด บวม แดง ร้อน) และ กดอาการแพ้ต่างๆให้มีอาการลดลง

ผลข้างเคียงจากการใช้ยากลุ่มสเตียรอยด์ที่พบบ่อย

พิษในระยะสั้น อาจทำให้แผลในกระเพาะอาหารกำเริบ น้ำตาลในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง ลดภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ติดเชื้อ (เช่น วัณโรค ปอดอักเสบ) ง่าย หน้าบวม มีหนวดขึ้น เป็นสิว

พิษในระยะยาว การใช้ยาเป็นเวลานาน หรือ รับประทานยาในขนาดสูง นอกจากจะมีพิษในระยะสั้นแล้วยังอาจทำให้เกิด cushing syndromes เช่น มีการสะสมของไขมันบริเวณหน้าและลำตัว หลังมีลักษณะเป็นหนอก (buffalo hump) กระดูกผุ กระดูกหักง่าย แผลหายช้า มีไข้เรื้อรังขึ้นตาม ผิวหนัง เกิดแผลในร่ายกายเสียความสมดุล หน้าบวมเหมือนพระจันทร์ (moon face) ลำตัวบวมทำให้เห็นว่าหน้าและตัวอ้วนกลมผิดปกติแต่แขนขาลีบ โรคจิตประสาท ตาเป็นต้อกระจกหรือต้อหิน ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง กระดูกพรุน ทำให้สูญเสียสารโปแตสเซียมในเลือดและระคายเคืองกระเพาะอาหาร พิษที่รุนแรงที่สุดคือ ทำให้ต่อมหมวกไตฝ่อ เมื่อเกิดภาวะเครียดของร่างกาย อาจทำให้ช็อคถึงตายได้ เรียกภาวะนี้ว่า “ภาวะวิกฤตจากต่อมหมวกไตฝ่อ”

2.5 วิธีทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ลดปวดทางเภสัชวิทยา

2.5.1 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน

2.5.1.1 วิธี Rat hind paw edema model (ปณต ตั้งสุจริต และคณะ, 2549)

เป็นการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูโดยการฉีดสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้า หนู โดยการฉีดสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น yeast, carrageenan, bradykinin, histamine หรือ serotonin แล้วเปรียบเทียบขนาดของเท้าหนูในเวลาต่างๆ ในการทดลองนี้ใช้ carrageenan เป็นตัวกระตุ้นการอักเสบ โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบ กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบ หลังจากนั้น 1 ชั่วโมงจึงกระตุ้นให้หนูเกิดการบวมโดยการฉีด 1% carrageenan ปริมาณ 0.1 ml เข้าที่อุ้งเท้า (subplantar injection) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของเท้าหนูที่บวมขึ้น ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบกับกลุ่มควบคุม

2.5.1.2 วิธี Croton oil induced ear edema in mice (Gomig et al., 2008)

อาการบวมในหนูถีบจักรถูกเหนี่ยวนำขึ้นด้วยสาร croton oil (0.1 mg/ear) โดยการทา croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบ กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับทาที่บริเวณใบหู ด้านนอก กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบ ในปริมาณต่างๆกันที่หูด้านนอก หลังจากนั้น 6 ชั่วโมง

ทำการวัดความหนาของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นโดยใช้ digital vernia caliper จากนั้นเปรียบเทียบความหนาของหูที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

2.5.1.3 วิธี Histamine, 5-HT and PGE₁-induced acute inflammation in rats (Kale et al., 2007)

เป็นการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบขึ้นที่อุ้งเท้า โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบก่อน 30 นาที กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบ อาการอักเสบเหนี่ยวนำโดยฉีดสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น histamine, 5-HT and PGE₁ ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เข้าทางขาหลังด้านขวา และวัดขนาดเท้า หนูหลังฉีดสารสื่อทันทีโดยเริ่มจากนาทีที่ 0 ถึง 30 โดยใช้ plethysmometer วัดเปอร์เซ็นต์การอักเสบโดยดูจากปริมาตรเท้าหนูที่บวมขึ้นและเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

2.5.1.4 วิธีอื่นๆ

มีวิธีอื่นๆ ที่ใช้ศึกษาการอักเสบแบบเฉียบพลัน ได้แก่ TPA-induced mouse ear oedema (Sanchez-Mateo et al., 2006) Xylene-induced ear oedema in mice, Acetic acid-induced vascular permeability in mice, Carrageenan-induced pleurisy in rats (Wu et al., 2006)

2.5.2 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบแบบเรื้อรัง

2.5.2.1 วิธี Formaldehyde induced arthritis (ณัฐฐิยา พงศ์ผาสุก, 2546 อ้างถึงใน Saxena et al., 1984)

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัวกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบ ฉีด 0.1 ml ของสารละลาย 2% formaldehyde เข้าใต้พังผืดยึดกล้ามเนื้อ (subaponeurotic) ที่เท้าขวาของหนู ในวันแรกและวันที่ 3 หนูจะได้รับยาทุกวันเป็นเวลา 10 วัน โดยมีการวัดขนาดของเท้าทุกวันด้วย plethysmometer จากการศึกษา formaldehyde ทำให้เท้าหนูบวมมากในวันที่ 1 และ 4 หลังฉีด จากนั้นการบวมจะลดลงในช่วงเวลา 10 วัน และเปรียบเทียบปริมาตรเท้าหนูที่บวมขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

2.5.2.2 วิธี Cotton pellet implantation in rats (Panthong et al., 2007)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบ เตรียมก้อนสำลีที่ผ่านการ sterile แล้วจำนวน 1 ก้อนน้ำหนัก 20±1 มิลลิกรัม ขนาด 0.5 cm จากนั้นสลบหนูด้วยการฉีด pentobarbital sodium จำนวน 50 mg/kg (intraperitoneal) และผ่าตัดเพื่อเอาก้อนสำลีใส่เข้าไปใต้ผิวหนังของหนู (subcutaneous) โดยใช้ sterile technique หลังจากนั้นป้อนสารที่จะทดสอบความเข้มข้นต่างๆ กันและยา prednisolone ขนาด 5 mg/kg สำหรับกลุ่ม positive control ส่วนหนูกลุ่ม negative control ได้รับเฉพาะน้ำกลั่นโดยให้ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นผ่าตัดเอาก้อนสำลีออกมาแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อที่จะดูน้ำหนักแห้ง การที่

น้ำหนักของก้อนสาลีเพิ่มขึ้นจะเป็นตัววัดถึงการอักเสบแบบเรื้อรังและใช้ในการคำนวณต่อไป
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักก้อนสาลีของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

2.5.2.3 วิธีอื่นๆ ในการศึกษาการอักเสบแบบเรื้อรัง

วิธีอื่นๆ ที่นิยมใช้ศึกษา คือ Adjuvant-induced arthritis (Yin et al., 2003) Turpentine oil-induce granuloma in rats (Kale et al., 2007)

2.5.3 การศึกษาฤทธิ์ลดปวด

2.5.3.1 วิธี Writhing test (Panthong et al., 2007)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammation analgesia) โดยจะทำการสังเกตอาการที่หนูมีการบิดตัว เอาท้องถูแนบไปกับพื้น และเหยียดขาหลังออก เรียกว่า writhing response โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบ 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบกัน หลังจากนั้น 1 ชั่วโมงเหนี่ยวนำให้หนูเกิด writhing response โดยการฉีด 0.75 % acetic acid (10 ml/kg) เข้าที่ช่องท้องหนู (intraperitoneal) แล้วบันทึกจำนวนของ writhing response ที่เกิดขึ้นภายในช่วงเวลาเวลา 15 นาที โดยจะเริ่มจากนาทีที่ 5 หลังจากฉีด acetic acid และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวน writhing response และนำค่ามาเปรียบเทียบหาค่า % inhibition ของหนูที่ได้รับสารสกัดเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐาน

2.5.3.2 วิธี Formalin test (Panthong et al., 2007)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยแบ่งหนูเพศผู้ (male mice) น้ำหนักระหว่าง 30-40 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับสาร vehicle และ ยามาตรฐาน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบ ทำการสังเกตพฤติกรรมของหนูหลังฉีด formalin เข้าที่ฝ่าเท้า ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 phases คือ early phase (neurogenic phase) และ late phase (inflammatory phase) โดยทำการทดลองดังนี้

1. ป้อนสารที่จะทดสอบความเข้มข้นต่างๆ กัน
2. หลังจากนั้น 1 ชั่วโมงทำการฉีด formalin เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ปริมาณ 20 μ l (1% formalin in NSS) เข้าทางขาหลังด้านขวา
3. นับจำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูระหว่างช่วงเวลาที่ 0-5 นาที (สำหรับ early phase) และระหว่างเวลาที่ 20-30 นาที (สำหรับ late phase)
4. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งในการเลียเท้าของกลุ่มที่ได้รับสารที่จะทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม (negative control) และกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐาน

2.5.3.3 วิธี Tail flick test (ปณต ตั้งสุจริตและคณะ, 2549)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวด โดยใช้ความร้อนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวด การทำการทดลองโดยวิธีเอาหางหนูจุ่มลงในน้ำอุณหภูมิ 50 °C และจับเวลาที่หนูถอนความร้อนโดยไม่สะบัดหางหนี แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ normal saline และ morphine (10 mg/kg, ฉีดเข้าช่องท้อง) ตามลำดับ ในกลุ่มที่ 3-5 จะได้รับสารทดสอบโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องหนู (intraperitoneal) ในขนาดต่างๆ กัน โดยหนูทั้งหมดจะได้รับการบันทึก response time ก่อนให้ยา และหลังให้ยาแล้ว 10, 30, 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูถอนความร้อนโดยไม่สะบัดหางหนีในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐาน

2.5.3.4 วิธีอื่นๆ

นอกจากนี้ยังมีวิธีการศึกษาฤทธิ์ลดปวดอีกหลายวิธี เช่น Tail formalin test (Delporte et al., 2007) Hot-plate test (Yin et al., 2003; Witaicenis et al., 2007)

2.6 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพรรางจืด



ก. ใบ



ข. ลำต้นและใบ



ค. ดอก

ภาพที่ 2 -1 แสดงส่วนประกอบของต้นรางจืด ใบ (ก), ลำต้นและใบ (ข) และดอก (ค)

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Thunbergia laurifolia</i> Linn.
ชื่อวงศ์	Acanthaceae
ชื่อท้องถิ่น	กำลังช้างเผือก, ยาเขียว, เครือเถาเขียว, ขอบชะนาง (ไทย), ดุเหว่า (ปัตตานี), คาย (ยะลา), ปังกะละ, ย้าแย้ (อุตรดิตถ์), หนามแน่น (พายัพ), ขอบชะนาง, รางจีต (ภาคกลาง), รางเย็น (ยะลา) จอลอดิเออ, ซั้งกะ, ปังกะละ, พอหน่อเตอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), ทิดพุต (นครศรีธรรมราช), น้ำนอง (สระบุรี), แอดแอ (เพชรบูรณ์)
ลักษณะทั่วไป	
ต้น	เป็นพรรณไม้เถาชนิดหนึ่ง หรือเป็นไม้ล้มลุก (herb) ต้นตั้งตรง สูง 79-91 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8.64-11.62 มิลลิเมตร ลำต้นสีเขียวอมน้ำตาล มีขนปกคลุมปานกลาง ที่มีกพบอยู่ตามซายป่าดงดิบ ชอบอาศัยพันเกาะเกี่ยวกับต้นไม้ใหญ่ มีเถาที่แข็งแรงมาก ลักษณะของเถานั้นจะกลม เป็นข้อปล้อง มีสีเขียว
ใบ	เป็นไม้ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ และขนาดของใบนั้น จะไล่กันขึ้นไป ตั้งแต่ขนาดใหญ่ คือ ตรงโคนกันไปหาขนาดเล็กคือ ปลายก้าน ใบเป็นสีเขียวเข้ม ผิวเกลี้ยง ลักษณะของใบเป็นรูปหัวใจ ตรงโคนใบจะเว้า ปลายใบจะเป็นติ่งแหลม ใบจะมีความกว้างยาวประมาณ 2 นิ้วและยาวประมาณ 4-5 นิ้ว การเรียงตัวของใบแบบมี 3 ใบย่อยและมีก้านใบ (pinnately-trifoliate) ใบรูปหอก (lanceolate) ใบบนมีความยาว 3.04-4.0 เซนติเมตร กว้าง 1.22-3.34 เซนติเมตร ใบข้างยาว 2.07-3.13 เซนติเมตร กว้าง 0.75-1.05 เซนติเมตร เข้ม หน้าใบไม่มีขน มีขนที่หลังใบ ปานกลาง ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยห่าง (serrate) ก้านใบยาว 2.15-3.63 เซนติเมตร มีขนปกคลุมปานกลาง
ดอก	ช่อดอกแบบช่อกระจุก (raceme) ยาว 17.7-25.5 เซนติเมตร กลุ่มดอก (head) ยาว 8.49-17.65 เซนติเมตร ดอกเดี่ยวมี 23-55 ดอกต่อช่อ ดอกรูปดอกถั่วมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่ออยู่ตามง่ามใบ ช่อ ๆ หนึ่งจะมีดอกอยู่ 3-4 ดอก ห้อยระย้าลงมา ลักษณะของดอกเป็นกรวย หลอดกรวยยาวประมาณ 1 ซม. ตรงปลายดอกก็จะแยกเป็นแฉกอยู่ 5 แฉก หรือ 5 กลีบ ดอกจะเป็นสีม่วงอ่อน ๆ หรือสีคราม ดอกที่ยังอ่อน จะมีกาบห่อหุ้มอยู่ ดอกบานเต็มที่ประมาณ 3 นิ้ว ภายในหลอดดอกนั้น เป็นสีขาวมีเกสรตัวผู้อยู่ประมาณ 4 อัน จะผลิดอกในเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนมกราคม
ผล	พอดอกนั้นร่วงโรยไป ก็จะติดเป็นผล ซึ่งมีลักษณะเป็นฝักตรงปลายฝักจะแหลม คล้ายกับปากนก ส่วนโคนใบนั้นกลม ยาวประมาณ 1-1.5 นิ้ว เมื่อผลแก่ก็จะแตกออกเป็น 2 ซีก

ถิ่นที่อยู่ พบได้ทั่วไปทั้งป่าดงดิบชื้นจนถึงป่าเบญจพรรณ ป่าละเมาะหรือทุ่งหญ้า ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ต่างประเทศพบทั่วไปในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ส่วนที่ใช้ ทั้งต้น รากและเถา ใช้เป็นยา

สรรพคุณ

ทั้งต้น จะมีรสเย็นใช้ถอนพิษยาเบื่อเมา หรือใช้ปรุงเป็นยาเขียว ถอนพิษไข้

ใบสด ใช้คั้นน้ำ แก้ไข้ ถอนพิษต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น อาการแพ้อาหาร เป็นต้น การทดลองเพื่อใช้แก้พิษ ที่เกิดจากยาฆ่าแมลงโพลิดอลในสัตว์ ได้ผลดีพอสมควร สรุปได้ว่า อาจใช้น้ำคั้นใบสด ให้ผู้ป่วยที่กินยาฆ่าแมลง ดื่มเป็นการปฐมพยาบาล ก่อนนำผู้ป่วยส่งโรงพยาบาลได้ แต่จะไม่ให้ผลในการกินเพื่อป้องกัน ก่อนสัมผัสยาฆ่าแมลง

รากและเถา ใช้กินเป็นยารักษาอาการร้อนในกระหายน้ำ รักษาพิษร้อน

ใบและราก ใช้ปรุงเป็นยาถอนพิษไข้ เป็นยาพอกบาดแผล น้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ทำลายพิษยาฆ่าแมลง พิษจากสตริกนินให้เป็นกลาง พิษจากดื่มเหล้ามากเกินไป หรือยาเบื่อชนิดต่างๆ เข้าสู่ร่างกาย (มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา, 2548)

สารประกอบทางเคมี

ตารางที่ 2-2 สารเคมีที่พบในส่วนใบและดอกรางจืด

ส่วนของพืช	สารที่พบ	กลุ่มของสาร
ใบ, ดอก	Apigenin	flavonoid
ใบ, ดอก	Apigenin-7-o-Beta-D-glucopyranoside	flavonoid
ใบ, ดอก	Delphinidin-3,5-di-o-Beta-D-glucopyranoside	flavonoid

(Purnima and Gupta, 1978; Kanchanapoom et al., 2002)

ภูมิปัญญาพื้นบ้าน

1. ใช้รักษาอาการแพ้ ท้องร่วงและผื่นคัน เนื่องจากเป็นพิษจากอาหารบางชนิด (เห็ดพิษ, กลอย, ผักหวาน, ว่านทอด) หรือพิษจากสัตว์

ส่วนที่ใช้ : ใบและเถาสด

ขนาดและวิธีใช้ : 4-5 ใบ โขลกตำผสมน้ำหรือน้ำซาวข้าว แล้วคั้นเอาน้ำดื่ม หรือจะใช้รางจืดแห้ง 300 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร และให้ดื่มน้ำรางจืด 200 มิลลิลิตร ทุก 2 ชั่วโมงหรือใช้ใบสดสับใส่น้ำให้ท่วม ต้มให้เดือด 10 นาที ดื่มน้ำบ่อยๆ จะช่วยถอนพิษ

2. ใช้แก้พิษที่เกิดจากยาฆ่าแมลงโพลิดอล

ส่วนที่ใช้ : น้ำคั้นใบสดให้ผู้ป่วยดื่มเป็นการปฐมพยาบาลก่อนนำผู้ป่วยส่งโรงพยาบาลได้ แต่จะไม่ให้ผลในการกินเพื่อป้องกันก่อนสัมผัสยาฆ่าแมลง

3. ใช้ปรุงเป็นยาเขียว ถอนพิษไข้และพิษอื่นๆ
4. ใช้เป็นยาแก้ร้อนใน กระหายน้ำ
5. ใช้ต้มในรูปชาขงรางจืดเพื่อขับปัสสาวะ

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (ภาคภูมิ พาณิชยุปกานันท์, 2544)

ตารางที่ 2-3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของต้นรางจืด

ส่วนที่ใช้	สารละลาย	ฤทธิ์/การนำไปใช้
Dried leaf	Petroleum ether	antibacterial activity - <i>Aerobacter aerogenes</i>
Dried root+stem	ไม่ระบุ	Used for fever Used for antitoxicity
Fresh leaf	H ₂ O	Antagonize the effect of Folidol [®] (SC injection)
Dried entire plant	ไม่ระบุ	Used for cancer
Dried root	hot H ₂ O	Used as an antinflammatory agent
Dried leaf	hot H ₂ O	Antidote against poisons ex. Strychnine, Arsenic, Insecticides, ect.
Dried leaf	ไม่ระบุ	Neuromuscular blocking activity
Fresh leaf	H ₂ O	Used to bath a child with fits

ในวงการแพทย์แผนไทยเชื่อว่ารางจืดมีสรรพคุณเป็นยาถอนพิษ แก่พิษเบื่อเมาหรือใช้ปรุงเป็นยาเขียวถอนพิษไข้ แก่ร้อนในกระหายน้ำและเข้ายารักษาโรคอักเสบและปวดบวม (ชะลอ, 2539; นันทวัน และอรนุช, 2539) ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข อนุญาตให้ใช้ใบรางจืดเป็นสมุนไพรที่ชุมชนสามารถผลิตเพื่อเศรษฐกิจชุมชน เพื่อแก้ไข้ แก่ร้อนใน

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในรางจืดพบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ เอพิจินิน (apigenin) โคสโมซิน (cosmosin) และ delphinidin-3,5-di-O- β -D-glucose (นันทวัน และอรนุช, 2539; ภูมิพิชญ์, 2539) จากการศึกษาสารเคมีในรางจืดของ Kanchanapoom *et al.* (2002) พบว่า ส่วนลำต้นและใบประกอบด้วย two iridoid glucosides, 8-*epi*-grandifloric and 3'-O- β -glucopyranosyl-stibericoside apigenin (4, 5, 7- trihydroxyflavone) และพบสารอีก 7 ชนิดคือ benzyl β -glucopyranoside, benzyl β -2'-O- β -glucopyranosyl, glucopyranoside, grandifloric acid, E-2-hexenyly β -glucopyranoside, hexanol β -glucopyranoside, 6-C-glucopyranosylapigenin และ 6, 8-di-C-glucopyranosyl ส่วนในดอกและใบพบสารออกฤทธิ์พวก

phenolic compound รวมไปถึงสาร delphinidin 3:5-di-O- β -d-glucopyranoside, apigenin, apigenin-7-O- β -d-glucopyranoside และ chlorogenic acid (Purnima and Gupta, 1978; Thongsaard and Marsden, 2002)

Apigenin เป็นสารจำพวก flavonoid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง prostaglandin (PGs) และ proinflammatory cytokine ใน cell culture models (Smolinski and Pestka, 2003) นอกจากนี้ สารฟลาโวนอยด์อื่นๆ เช่น apigenin, quercetin และ galangin ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (J774A.1) (Raso et al., 2000) จากการศึกษาของ Liang et al. (1999) พบว่า apigenin มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ของ iNOS และ COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง IKB kinase ซึ่ง apigenin และสาร flavonoid อื่นๆ มีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งและการอักเสบ นอกจากนี้ apigenin ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง inflammatory mediators เช่น nitric oxide และ prostaglandin E_2 ที่สร้างจาก inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยการกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Hougee et al., 2005) และ apigenin ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (สุรีย์ ศุภลักษณ์นารี, 2542) และจากการศึกษาของ Smolinski และ Pestka (2003) พบว่าสาร apigenin มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในหนู B6C3F1 mice เพศเมีย

รายงานการศึกษาล่าสุดพบว่ารังสีมีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น ด้านแบคทีเรีย ด้านไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพลกซ์ ลดความดันโลหิต และลดพิษจากยาฆ่าแมลง (Tejasen and Thongthapp, 1992) จากการศึกษาของสกุลรัตน์ อุษณารักษ์ และคณะ (2543) รายงานว่าสารสกัดจากใบรางจืดสามารถช่วยลดพิษพาราควอตในหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการวิจัยของ Chanawirat (2000) และ Pramyothin et al., (2005) พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดสามารถช่วยป้องกันการทำลายตับจากการเหนี่ยวนำด้วยเอทานอลในหนูขาวและหนูถีบจักรได้

พาดิ เตชะเสน และชัชวดี ทาบทอง (2523) พบว่าเมื่อให้หนูกินสารสกัดรางจืดสามารถลดอัตราการตายของหนูจากการได้รับสารฟอสฟอไรต์ ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate ได้ดีกว่าการฉีดสารสกัดจากใบรางจืดสด, ใบแห้ง, รากและเปลือกแห้งสามารถลดพิษจากยาฆ่าแมลง, แอลกอฮอล์, อาเซนิคและ strychnine ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรากแห้งมีฤทธิ์ต้านอักเสบและลดไข้ (Thongsaard and Marsden., 2002)

จากการศึกษาของ Chan และ Lim (2005) พบว่าสารสกัดใบรางจืดที่ทำให้แห้งด้วยเครื่อง microwave มีปริมาณ total phenolic content (TPC) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Srida et al., 2002) มากกว่าสมุนไพรที่มีขายตามท้องตลาด รายงานการวิจัยของ Khunkitti et al. (2003) พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดอย่างหยาบ (crude extract) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืดนั้นได้มีรายงานการวิจัยหลายชิ้นดังนี้ Charumanee et al. (2001) พบว่าสารสกัดรางจืดด้วย ethanol และ hexane สามารถลดอาการอักเสบของอุ้งเท้าและไขวของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดความเข้มข้น 30% สามารถลดอาการอักเสบได้

เทียบเท่า 1% diclofenac จากการศึกษาของมณเฑียร เปส และคณะ (2544) พบว่าในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้ rat ear edema model สารสกัดรางจืดด้วย ethanol ความเข้มข้น 50% สามารถลดอาการบวมแดงที่ใบหูของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่น้อยกว่า 0.1% triamcinolone จากการศึกษาโดยวิธี carageenan induced rat paw edema พบว่าสารสกัดรางจืด (1 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู) มีฤทธิ์ป้องกันการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยลดการบวมได้มากกว่าร้อยละ 50 นอกจากนั้น การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากรางจืดพบว่าสารสกัดรางจืดหยาบไม่มีพิษต่อสัตว์ทดลองจากการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง

วิวรรธณ วิสิฐพงศ์พันธ์ (2545) ศึกษาความเป็นพิษของรางจืดในหนูขาว เมื่อบริโภคขนาดสูงและขนาดเท่ากับการดื่มชาในคนทุกวันต่อเนื่องกัน โดยใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เป็นสัตว์ทดลอง และศึกษาฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของรางจืด โดยใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ผลการทดลองพบว่า น้ำสารสกัดขนาดสูง 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนูขาวและไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายใน และเมื่อทดสอบให้น้ำสารสกัดใบรางจืดขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน พบว่า ไม่มีหนูขาวตัวใดเสียชีวิตในระหว่างการทดสอบ ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของหนูขาวทุกกลุ่ม นอกจากนี้พบว่า ระดับ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลผลิตของการเกิด lipid peroxidation ในซีรัมของหนูขาวเพศผู้ลดลงอย่างชัดเจน ($p < 0.001$) และรางจืดความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิตรไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากผลการทดลองสรุปได้ว่า รางจืดไม่เป็นพิษต่อหนูขาวเมื่อได้รับในขนาดสูงได้ครั้งเดียวและไม่ทำให้เกิดพฤติกรรมของหนูขาวเปลี่ยนไป และสารสกัดใบรางจืดไม่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ รวมทั้งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนแบคทีเรีย

ณัฐธิดา พงศ์ผาสุก (2546) ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ลดการบวมได้แก่ สารสกัดจากพญายอ, กรรณิการ, หนุ้าเหว้หมู, มังคุดและรางจืด ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดรางจืดมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการบวมได้ดีที่สุดประมาณ 70% รองลงมาคือ สารสกัดมังคุด 45% การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดรางจืดกับมังคุด พบว่า รางจืดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงกว่ามังคุด ประมาณ 2 เท่า (ED_{50} รางจืดเท่ากับ 2.51 กรัม/กิโลกรัม ED_{50} มังคุดเท่ากับ 5.51 กรัม/กิโลกรัม) เมื่อศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและเรื้อรังพบว่ารางจืดไม่มีผลทำให้หนูตาย แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของสมุนไพรรางจืด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี (Chemicals)

RPMI 1640 medium, Antibiotic/Antimycotic (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B), Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA จากบริษัท Gibco (USA), PGE₂ assay kit และ TNF- α assay kit จาก Cayman chemical, Lipopolysaccharide (LPS), Dimethyl sulfoxide (DMSO), TRIZOL[®] Reagent, iNOS, COX-2 และ GAPDH oligonucleotide primers จากบริษัท Sigma-Aldrich. ประเทศเยอรมันนี, MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide จากบริษัท Eugene (USA)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ (Instruments)

เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator), เครื่องระเหยแห้ง (Freeze dry), เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge), ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator), Autoclave, Laminar air flow carbinet, Silicagel GF254 precoated plate, Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA), Gel casting platform, Horizontal gel electrophoresis apparatus, Thermal cycler, UV spectrophotometer และ UV transilluminator

3.2. วิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)

โครงการวิจัยนี้แบ่งการดำเนินการออกเป็นกิจกรรมต่างๆ ดังนี้

3.2.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรใบรางจืด

1. เก็บใบรางจืดสดจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและบริเวณคณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ โดยเปรียบเทียบกับรางจืดที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น Herbarium No. 282

2. นำใบรางจืดสดมาล้างน้ำทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตรแล้วเติม 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:4 (หรืออัตราส่วนระหว่างใบรางจืด 10 กรัม ต่อ 95% ethanol จำนวน 40 มิลลิลิตร) แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วันจากนั้นกรองเอากากใบรางจืดทิ้งไป คงเหลือไว้เฉพาะส่วนใสแล้วทำการกรองซ้ำอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no.1)

3. นำกากใบรางจืดที่กรองได้ ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 เป็นจำนวน 3 ครั้ง จนกระทั่งกากใบรางจืดที่ได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

4. รวบรวมสารละลายที่สกัดได้จากใบรางจืดมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสาร (rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป จนกระทั่งได้สารสกัดใบรางจืดที่มีความเข้มข้นสูง

5. นำสารสกัดใบรางจืดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dry เพื่อระเหยเอาน้ำออกไป แล้วจึงนำสารสกัดจากใบรางจืดที่ได้มาชั่งน้ำหนัก บรรจุในภาชนะปิดสนิทและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป ในการสกัดใบรางจืดจะทำการสกัดไว้เป็นปริมาณที่มากพอที่จะใช้จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

3.2.2 ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในสัตว์ทดลอง

(Animal models)

3.2.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ หนูถีบจักร (mice) สายพันธุ์ ICR เพศผู้มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 30-40 กรัม ชื้อมาจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำหนูที่จะทำการทดลองมาพักเพื่อให้หนูได้คลายความเครียด (stress) จากการขนส่ง และเป็นการเตรียมสัตว์ให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพในห้องทดลองก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจะควบคุมให้อยู่ระหว่าง 25±2 องศาเซลเซียส ระดับความชื้น 70% ควบคุมไฟเปิดปิดทุก 12 ชั่วโมง เปิดจาก 06.00 น. ถึง 18.00 น. และติดตั้งพัดลมดูดอากาศเข้าและออกเพื่อถ่ายเทอากาศ ส่วนกรงที่ใช้เลี้ยงหนูทดลองนั้นจะปูรองพื้นด้วยขี้เลื่อยที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อโรคแล้ว เพื่อใช้ดูดซับสิ่งปฏิกูล ที่กรงจะมีช่องสำหรับให้น้ำและอาหารแก่หนูทดลองได้ดื่มและกินตลอดเวลา

3.2.2.2 Writhing test (ปณต ตั้งสุจริตและคณะ, 2549; Panthong et al., 2007)

1. เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยแบ่งหนูเพศผู้ (male mice) น้ำหนักระหว่าง 30-40 กรัม ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว จากนั้นทำการฉีดสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ละลายใน 1% Methyl cellulose (MC) เข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) แก่หนูกลุ่มทดสอบส่วนหนูกลุ่ม positive control ได้รับการฉีดยาแอสไพรินขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (s.c.) ที่ละลายใน 1% MC และกลุ่ม negative control ฉีดเฉพาะ 1% MC (s.c.) หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้หนูเกิด writhing response (อาการเจ็บปวดภายในช่องท้องซึ่งแสดงออกโดยการเกร็งของกล้ามเนื้อบริเวณหน้าท้องโดยจะสังเกตอาการที่หนูมีการบิดตัว เอาท้องถูแนบไปกับพื้นและเหยียดขาหลังออก) ด้วยการฉีด 0.75% acetic acid aqueous solution ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อ 10 กรัม น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal)

2. นำหนูใส่กล่องพลาสติกโปร่งใสโดยจะเริ่มนับจำนวน writhing response ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 15 นาที โดยจะเริ่มจากนาทีที่ 5 หลังจากฉีด acetic acid นำจำนวน writhing response มาคำนวณ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งคำนวณโดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{จำนวนครั้งที่เกิด writhing ของหนูกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{จำนวนครั้งที่เกิด writhing ของหนูกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

(Percentage of inhibition)

3. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเกิด writhing response ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.2.3 Formalin test (Tjolsen et al., 1992; Panthong et al., 2007)

1. เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว โดย formalin test จะแบ่งออกเป็น 2 phases คือ early phase (neurogenic phase) และ late phase (inflammatory phase) หลังจากนั้นทำการฉีดสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ละลายใน 1% Methyl cellulose (MC) เข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) และกลุ่ม positive control ฉีดยาแอสไพรินขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (s.c.) และกลุ่ม negative control ได้รับการฉีด 1% MC (s.c.) หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง ฉีด formalin เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร (1% formalin in NSS) เข้าทางขาหลังด้านขวา

2. นับจำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูระหว่างช่วงเวลาที่ 0-5 นาที (สำหรับ early phase) และระหว่างช่วงเวลาที่ 20-30 นาที (สำหรับ late phase) เปอร์เซนต์การยับยั้งคำนวณโดย

$$\text{เปอร์เซนต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{จำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{จำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

(Percentage of inhibition)

3. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.2.4 Croton oil-induced ear edema in mice (Gomig et al., 2008)

อาการบวมในหนูถีบจักรถูกเหนี่ยวนำขึ้นด้วยสาร croton oil (0.1 mg/ear) โดยการทา croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู ในกลุ่มควบคุมจะทา vehicle คือ DMSO ที่บริเวณใบหูด้านนอก สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาสารสกัดจากใบรางจืดในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear ที่หูด้านนอก หลังจากนั้น 6 ชั่วโมงทำการวัดความหนาของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นโดยใช้ digital vernia caliper จากนั้นเปรียบเทียบความหนาของหูที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

1. แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว อาการบวมในหนูถีบจักรถูกเหนี่ยวนำขึ้นด้วยสาร croton oil (0.1 mg/ear) โดยการทา croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาสารสกัดจากใบรางจืดในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear ที่หูด้านนอก และกลุ่ม positive control ทายา indomethacin (0.1 mg/ear) และกลุ่ม negative control จะทา vehicle คือ DMSO ที่บริเวณใบหูด้านนอก

2. หลังจากนั้น 6 ชั่วโมงทำการวัดความหนาของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นโดยใช้เครื่อง digital vernia caliper จากนั้นทำการเปรียบเทียบความหนาของหูที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอาการบวม

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{ความหนาใบหูของหนูกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{ความหนาใบหูของหนูกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

(Percentage of inhibition)

3. ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาของใบหูของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.2.5 Cotton pellet-induced granuloma in mice (Modified from Panthong et al., 2007)

1. เป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยแบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว จากนั้นสลบนูด้วย ether และผ่าตัดเพื่อเอาก้อนสำลีที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขนาด 0.5 เซนติเมตร ใส่เข้าไปในใต้ผิวหนังของหนู (subcutaneous) จำนวน 1 ก้อน น้ำหนัก 10 ± 1 มิลลิกรัม โดยใช้ sterile technique หลังจากนั้นกลุ่มทดลองจะได้รับการฉีดสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ละลายใน 1% Methyl cellulose (MC) เข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) กลุ่ม positive control ได้รับยา prednisolone ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (s.c.) ส่วนหนูกลุ่ม negative control ได้รับการฉีด 1% MC (s.c.) โดยฉีดทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสลบนูด้วย ether

2. หลังจากครบ 7 วัน ทำการสลบนูด้วย ether แล้วผ่าตัดเอาก้อนสำลีออกมาแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อที่จะดูน้ำหนักแห้ง การที่น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นจะเป็นตัววัดถึงการอักเสบและใช้ในการคำนวณต่อไป เนื่องจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell) เข้ามาสะสมบริเวณที่มีการผ่าตัดเอาก้อนสำลีใส่เข้าไปดังนั้นจึงทำให้น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นในบริเวณที่มีการอักเสบ

3. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักก้อนสำลีของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.3 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay (Jantaratnotai et al., 2006)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin และ 25 µg/ml amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C และทำการ sub-cultured ทุกๆ 3 วัน

2. นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ

1×10^5 เซลล์ต่อ 1 หลุม จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C

3. หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดใบรางจืดละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืดแล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นเตรียมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5% v/v จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที

5. เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) จากนั้นเติม 100% DMSO ปริมาณ 200 $\mu\text{l/well}$ เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA)

6. คำนวณค่า cell viability ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (0.5% DMSO treated control) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) มีค่า cell viability เท่ากับ 100% ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.4 ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Kim et al., 2003)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C

2. นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO_2 incubator ที่มี CO_2 5% และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เตรียมสารละลายสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำมาเติมลงให้ได้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml และ 25 µg/ml ตามลำดับ) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง NO จากเอนไซม์ iNOS จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะใช้สาร L-NAME ความเข้มข้น 20 µM เป็น positive control

4. ตรวจวัด NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาผสมกับ Griess reagent (2% sulfanilamide in 4% phosphoric acid และ 0.2% naphthylethylenediamide) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA)

5. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) โดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle มีปริมาณ nitrite เป็น 100% และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.2.5 ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin E₂ (PGE₂) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Kim et al., 2003)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin และ 25 µg/ml amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 °C

2. เตรียมเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO₂ incubator ที่มี CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 °C

3. เตรียมสารละลายสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml และ 25 µg/ml ตามลำดับ) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้างสาร PGE₂ จาก COX-2 จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5%

CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะใช้สาร NS-398 ความเข้มข้น 10 µM เป็น positive control

4. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 50 mM arachidonic acid จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ 5% และอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

5. ตรวจวัดปริมาณสาร PGE₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ PGE₂ assay kit

6. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ PGE₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) เพียงอย่างเดียวโดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้ vehicle-treated มีปริมาณ PGE₂ เป็น 100% และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.2.6. ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้างสาร tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Hwang et al., 2011)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin และ 25 µg/ml amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 °C

2. เตรียมเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 °C

3. เตรียมสารละลายสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml และ 25 µg/ml ตามลำดับ) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง TNF- α จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ตรวจวัดปริมาณสาร TNF- α ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ TNF- α assay kit

5. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF- α ในอาหารเลี้ยงเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) เพียงอย่างเดียวโดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้ vehicle-treated มีปริมาณ TNF- α เป็น 100% และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.2.7 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน

inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ TNF- α ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค **Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

3.2.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์และกระตุ้นการสร้าง iNOS, COX-2 และ TNF- α ด้วย LPS

1. นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3 cm ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 และ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin และ 25 μ g/ml amphotericin B เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO₂ incubator ที่มี CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α ของสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย DMSO จากนั้นนำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25, 12.5 และ 25 μ g/ml ตามลำดับ) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร LPS ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นเก็บรวบรวมเซลล์ภายใน 3 cm disc ด้วย TRIZOL[®] Reagent ปริมาณ 1 ml แล้วนำไปสกัด total RNA ในขั้นต่อไป

3.2.7.2 การสกัด total RNA

1. สกัด total RNA ด้วย TRIZOL[®] Reagent จำนวน 1 ml และเติม chloroform จำนวน 200 μ l หลังจากนั้น vortex เป็นเวลา 15 วินาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 °C เป็นเวลา 2-3 นาทีและนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (12,000 rpm) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 15 นาที

2. ปิเปตส่วนที่เป็น aqueous phase จำนวน 400 μ l ใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ หลังจากนั้นตกตะกอนด้วย isopropyl alcohol จำนวน 500 μ l และทิ้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (12,000 rpm) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 10 นาที

3. ปิเปตเอาส่วนใส (supernatant) ออกไปและล้าง RNA pellet ด้วย 75% ethanol จำนวน 1 ml จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (7,500 rpm) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำ RNA pellet ให้แห้ง จึงเติม deionized water จำนวน 50 μ l

4. นำ total RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นโดย UV spectrophotometer

3.2.7.3 การสร้างสาย complementary DNA (cDNA)

1. นำส่วนผสมประกอบต่างๆ ใส่ลงใน microcentrifuge tube ได้แก่ total RNA จำนวน 5 µg, 50 µM oligo (dT) จำนวน 1 µl, 10 mM dNTP Mix (10 mM ของ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) จำนวน 1 µl และ DNase free water จำนวน 13 µl

2. นำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (2,000×g) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมส่วนผสมประกอบต่างๆ คือ 5x First-Strand Buffer จำนวน 4 µl, 0.1 M DTT จำนวน 1 µl, RNaseOUT™ จำนวน 1 µl และ SuperScript™ III RT (200 unit/µl) จำนวน 1 µl ผสมโดย pipette ขึ้นลงเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30-60 นาทีและหยุดปฏิกิริยาโดยผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.2.7.4 การทำเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1. นำสาย single strand cDNA ที่สร้างได้เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ สำหรับการทดลอง PCR โดยเตรียม reaction mixture สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยนำส่วนผสมประกอบต่างๆ ใส่ลงในหลอดขนาด 200 µl sterile PCR tubes

cDNA single strand	1.0 µl
10 µM COX-2 (F)	1.5 µl
10 µM COX-2 (R)	1.5 µl
10x Taq PCR buffer	3.0 µl
2.5 µM dNTP _s mix	2.0 µl
Taq polymerase	1.0 µl
Nuclease-free distilled water	20.0 µl
Total	30.0 µl

2. นำหลอด PCR ใส่ลงใน thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้

Step 1	94 °C	30 s
Step 2	94 °C	30 s
Step 3	60 °C	30 s
Step 4	72 °C	30 s
Step 5	29× to step 2, 3 และ 4	
Step 6	72 °C	5 min

3. นำสาย cDNA ที่ได้ ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF-α และ GAPDH โดยใช้ agarose gel electrophoresis annealing temperature

3.2.7.5 การทำเทคนิค Agarose gel electrophoresis

1. เตรียมสารละลาย 2% agarose gel โดยชั่งผง agarose มา 4.8 g ใส่ลงใน 0.5x TBE buffer จำนวน 240 ml ละลายผงเจลโดยใช้ความร้อน
2. เตรียม gel tray รอโดยใส่ comb row เข้าไปให้พอดีกับแต่ละ block ของ gel tray หลังจากเนื้อ gel ละลายดีแล้วก็นำออกมาจากเครื่อง microwave แล้วเติม ethidium bromide จำนวน 5 μ l แล้วผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำมาเทลงบน gel tray ที่เตรียมไว้แล้ว
3. หลังจาก gel แข็งตัวแล้วก็ค่อยๆ ดึง comb row ออกอย่างช้าๆ ระมัดระวังอย่าให้ gel แตกหลังจากนั้น load sample ที่เตรียมไว้โดยดูการแสดงผลของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α
4. หลังจากทำ load sample แล้วก็นำชิ้นส่วน gel ไปวางใน tank ซึ่งภายใน tank จะเติม 0.5x TBE buffer พอท่วม gel โดย tank จะต่อกับ power supply ซึ่ง set power supply ไว้ที่ 30 นาที หลังจากนั้นก็ run gel เมื่อครบเวลา 30 นาที นำแผ่น gel ไปถ่ายรูปภายใต้แสง UV เพื่อดูแถบ PCR ที่เกิดขึ้น

3.2.8. ศึกษาความสามารถในการจับ nitric oxide (NO scavenging activity) ของ สารสกัดใบรางจืด

หลักการ: NO ถูกสร้างมาจากปฏิกิริยาการสลายตัวของสาร Sodium nitroprusside ใน phosphate buffer saline ในตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนแล้วถูกเปลี่ยนเป็น ไนไตรท์ และไนเตรท ซึ่งไนไตรท์สามารถทำปฏิกิริยากับ Greiss reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diaminehydrochloride, 2.5 % H_3PO_4) ได้เป็นสารประกอบสีชมพู ที่คงตัว ถ้าสารสกัดที่นำมาทดสอบสามารถจับกับ NO ได้สารที่ได้ก็จะมีสีชมพูจางลง และ สารประกอบสีชมพูที่ได้สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

1. ศึกษาความสามารถในการจับ NO โดยผสมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กับสาร sodium nitroprusside (10 mM) เป็นเวลา 180 นาที
2. นำสารละลายไปตรวจวัดปริมาณของ NO ที่เหลืออยู่ในสารละลายโดยปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา % inhibition จากนั้นนำค่าร้อยละที่ได้ไปสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50}

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด รางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Duncan's test กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 สารสกัดสมุนไพรใบรางจืด

ทำการเก็บรวบรวมใบรางจืดจากสวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 3200 กรัม จากการสกัดใบรางจืดด้วย 95% ethanol และรวบรวมสารละลายที่สกัดได้จากใบรางจืด มาระเหยด้วย เครื่องระเหยสาร (rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป จนกระทั่งได้สารสกัดใบรางจืดที่มีความเข้มข้นสูง นำสารสกัดใบรางจืดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry ได้น้ำหนักของสารสกัดแห้งรวม 66.56 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 2.08 % ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ได้มีปริมาณเพียงพอต่อการใช้จนสิ้นสุดการศึกษา

4.2 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการลดปวดและต้านอักเสบในสัตว์ทดลอง

4.2.1 Writhing test

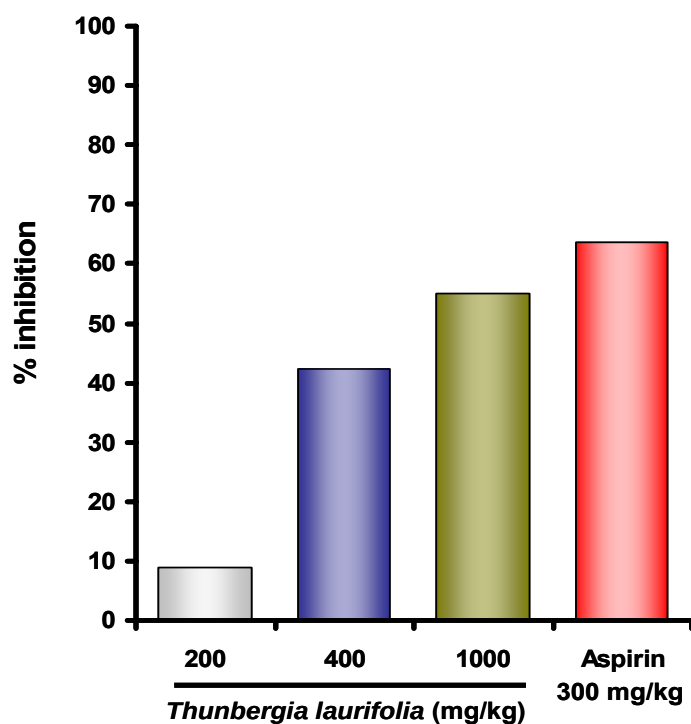
Writhing เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการปวดของหนู โดยแสดงพฤติกรรมเอาท้องสัมผัสกับพื้นพร้อมกับการยืดตัวออก สารที่นิยมนำมาฉีดเข้าทางช่องท้องหนูเพื่อให้เกิดการปวด ได้แก่ phenylquinone และ acetic acid เป็นต้น การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดใบรางจืดโดยใช้ writhing test เป็นการตรวจคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ โดยใช้ขนาดของสารสกัดใบรางจืด 200, 400, 1000 mg/kg และ ใช้ aspirin 300 mg/kg เป็นยามาตรฐาน ผลการทดสอบพบว่ายา aspirin สามารถลดจำนวนครั้งการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle ในกลุ่มทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 200 mg/kg ไม่มีผลลดจำนวนครั้งที่หนูเกิด writhing response อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพิ่มขนาดของสารสกัดขึ้นพบว่าสารสกัดใบรางจืดในขนาด 400 และ 1,000 mg/kg สามารถลดจำนวนการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4-1

จากผลการทดลองนี้เมื่อนำจำนวนครั้งของ writhing response มา คำนวณหา % inhibition พบว่ายา aspirin สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้ 63.49 % และสารสกัดใบรางจืด ตั้งแต่ความเข้มข้น 200, 400 และ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้ 8.96 %, 46.26 % และ 54.90 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลของยา aspirin และสารสกัดใบรางจืดต่อการเกิด writhing response ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด 0.75% acetic acid เข้าทางช่องท้อง

Group	N	Number of writhing in 10 min (Mean $\pm$ SE)
Control (1% MC)	7	21.53 $\pm$ 1.86
Aspirin 300 mg/kg	7	7.86 $\pm$ 1.75 *
รางจืด 200 mg/kg	7	19.60 $\pm$ 1.89
รางจืด 400 mg/kg	7	11.57 $\pm$ 2.17 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	9.71 $\pm$ 0.71 *

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)



รูปที่ 4-1 เปอร์เซนต์การยับยั้ง writhing response ของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ถูกฉีด acetic acid เข้าภายในช่องท้อง (n = 7)

4.2.2 Formalin test

เป็นวิธีทดสอบการปวดของหนู โดยการฉีดสารละลายเจือจางของ formalin เข้าทางอุ้งเท้าหลัง โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง หนูจะแสดงพฤติกรรมการยกเท้าข้างที่ถูกฉีด formalin ขึ้นเลีย ซึ่งวิธีนี้ทดสอบได้ทั้งการปวดและการอักเสบ โดยใน early phase คือช่วงระยะเวลา 0-5 นาทีหลังการฉีด หนูจะมีปฏิกิริยาตอบสนองทันทีต่อความเจ็บปวด ซึ่งเป็นการปวดแบบเฉียบพลัน ส่วน late phase เป็นการปวดเนื่องจากการอักเสบ ซึ่งจะเกิดในช่วงระยะเวลา 20-30 นาที

ผลการทดสอบพบว่ายา aspirin สามารถลดจำนวนครั้งการยกเท้าข้างที่ถูกฉีด formalin ขึ้นเลีย ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle ทั้งในช่วงระยะเวลา 0-5 นาทีหลังการฉีด (early phase) และ 20-30 นาที (late phase)

ในกลุ่มทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 200, 400 และ 1,000 mg/kg สามารถลดจำนวนครั้งการยกเท้าข้างที่ถูกฉีด formalin ขึ้นเลีย ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle ทั้งในช่วงระยะเวลา 0-5 นาทีหลังการฉีด (early phase) และ 20-30 นาที (late phase) โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และ 4-3

ตารางที่ 4-2 ผลของยา aspirin และสารสกัดใบรางจืดต่อการยกเท้าขึ้นเลียของหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าทางอุ้งเท้าหลัง ในช่วงเวลา 0-5 นาที (early phase)

Group	Early phase (0-5 min)	
	N	Number of licking (Mean $\pm$ SE)
Control (1% MC)	7	20.43 $\pm$ 1.18
Aspirin 300 mg/kg	7	10.89 $\pm$ 1.64 *
รางจืด 200 mg/kg	7	14.43 $\pm$ 1.29 *
รางจืด 400 mg/kg	7	13.83 $\pm$ 0.91 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	10.71 $\pm$ 0.99 *

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

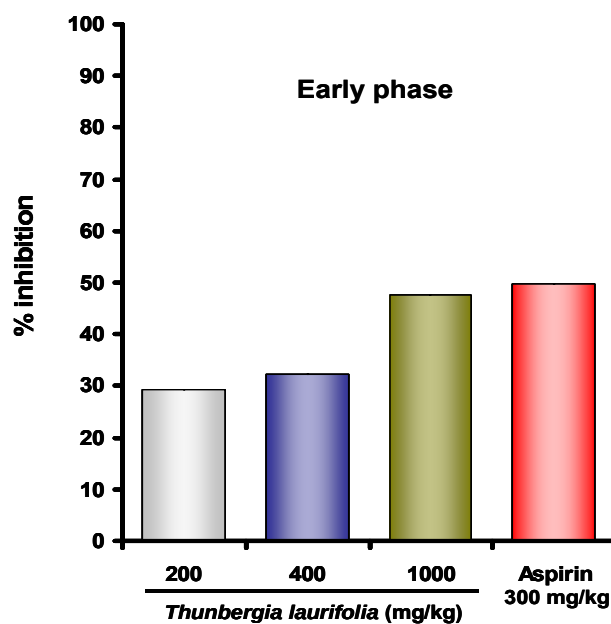
ตารางที่ 4-3 ผลของ aspirin และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยกเท้าขึ้นเลียของหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าทางอุ้งเท้าหลัง ในช่วงเวลา 20-30 นาที (late phase)

Group	Late phase (20-30 min)	
	N	Number of licking (Mean $\pm$ SE)
Control (1% MC)	7	17.00 $\pm$ 1.33
Aspirin 300 mg/kg	7	6.11 $\pm$ 1.51 *
รางจืด 200 mg/kg	7	8.14 $\pm$ 1.77 *
รางจืด 400 mg/kg	7	5.17 $\pm$ 1.20 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	4.29 $\pm$ 1.34 *

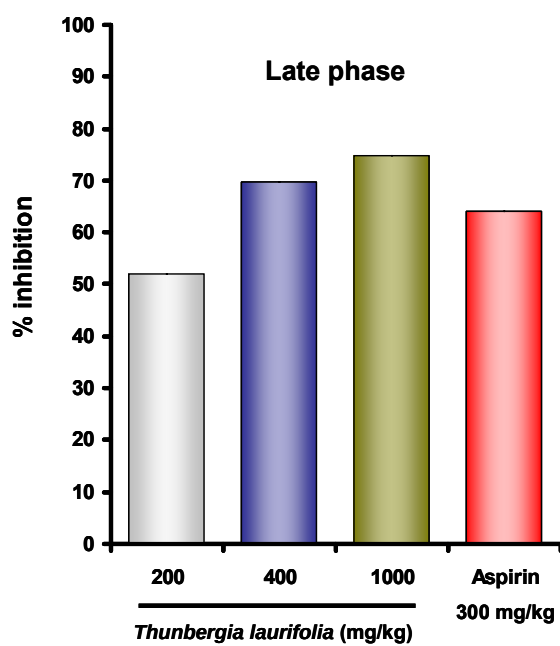
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

จากผลการทดลองนี้เมื่อนำจำนวนครั้งที่หนูยกเท้าขึ้นเลียในช่วง 0-5 นาทีแรก (early phase) มาคำนวณหา % inhibition พบว่ายา aspirin สามารถยับยั้งการยกเท้าขึ้นเลียได้ 46.69 % และสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้น 200, 400 และ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการยกเท้าขึ้นเลียได้ 29.36 %, 32.31 % และ 47.57 % ตามลำดับ

เมื่อนำจำนวนครั้งที่หนูยกเท้าขึ้นเลียในช่วง 20-30 นาที (late phase) มาคำนวณหา % inhibition พบว่ายา aspirin สามารถยับยั้งการยกเท้าขึ้นเลียได้ 64.05 % และสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้น 200, 400 และ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการยกเท้าขึ้นเลียได้ 52.12 %, 69.59 % และ 74.76 % ตามลำดับ



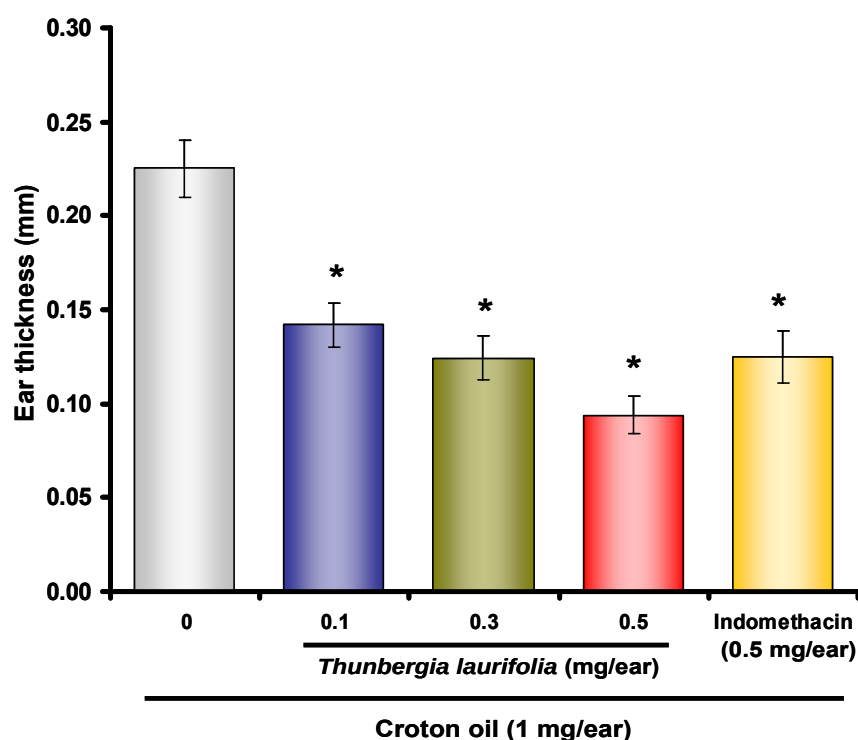
รูปที่ 4-2 เปอร์เซนต์การยับยั้งความเจ็บปวดของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าที่เท้าในระยะ early phase ระหว่างช่วงเวลาที่ 0-5 นาที (n = 7)



รูปที่ 4-3 เปอร์เซนต์การยับยั้งความเจ็บปวดของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าที่เท้าในระยะ late phase ระหว่างช่วงเวลาที่ 20-30 นาที (n = 7)

4.2.3 Croton oil-induced ear edema in mice

อาการบวมในหนูถีบจักรถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นด้วยสาร croton oil (0.1 mg/ear) โดยการทา croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู ในกลุ่มควบคุมจะทา vehicle คือ DMSO ที่บริเวณใบหูด้านนอก สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาสารสกัดจากใบรางจืดในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear ที่หูด้านนอก หลังจากนั้น 6 ชั่วโมงทำการวัดความหนาของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นโดยใช้ digital vernia caliper จากนั้นเปรียบเทียบความหนาของหูที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ยา indomethacin (0.5 mg/ear) เป็น positive control ผลการทดสอบพบว่ายา indomethacin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสามารถลดการบวมของหูหนูที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถยับยั้งการบวมได้ 44.44 % ในกลุ่มทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear สามารถลดการบวมของหูได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยสารสกัดใบรางจืดขนาด 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear สามารถยับยั้งการบวมของหูหนูที่เกิดจาก croton oil ได้ 36.89 %, 44.86 % และ 58.22 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4-4



รูปที่ 4-4 ผลของ ยา indomethacin และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการบวมของใบหูหนู mice ที่ได้รับสาร croton oil เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 7)
* $p < 0.05$ เปรียบเทียบ กับกลุ่มควบคุม

4.2.4 Cotton pellet-induced granuloma in mice

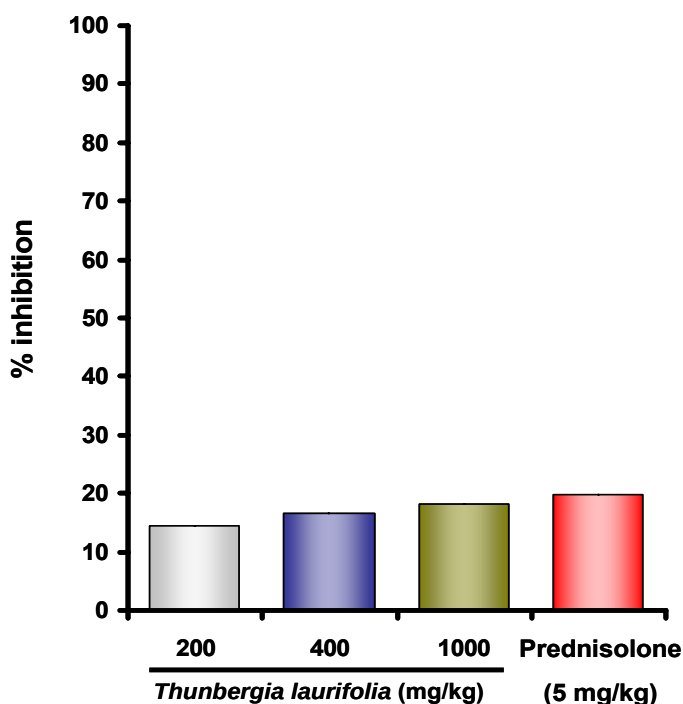
เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยแบบเรื้อรังโดยผ่าตัดเพื่อเอาก้อนสำลีใส่เข้าไปใต้ผิวหนังของหนู (subcutaneous) โดยใช้ sterile technique หลังจากนั้น 7 วัน ผ่าตัดเอาก้อนสำลีออกมาแล้วทำให้แห้ง การที่น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นจะเป็นตัววัดถึงการอักเสบแบบเรื้อรัง ผลการทดสอบพบว่ายา prednisolone ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสามารถลดน้ำหนักก้อนสำลีที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle เพียงอย่างเดียว ในกลุ่มทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดขนาด 200, 400 และ 1,000 mg/kg สามารถลดน้ำหนักก้อนสำลีที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดใบรางจืดทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถลดน้ำหนักก้อนสำลีที่เพิ่มขึ้นได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ผลของ prednisolone และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิด tissue granulation ภายในเวลา 7 วัน หลังจากผ่าตัดฝังก้อนสำลีลงใต้ผิวหนังหนู

Group	N	Granuloma weight (Mean $\pm$ SEM)
Control (1% MC)	7	22.78 $\pm$ 0.82
Prednisolone 5 mg/kg	7	18.27 $\pm$ 0.52 *
รางจืด 200 mg/kg	7	19.51 $\pm$ 0.58 *
รางจืด 400 mg/kg	7	19.01 $\pm$ 0.95 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	18.66 $\pm$ 0.55 *

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

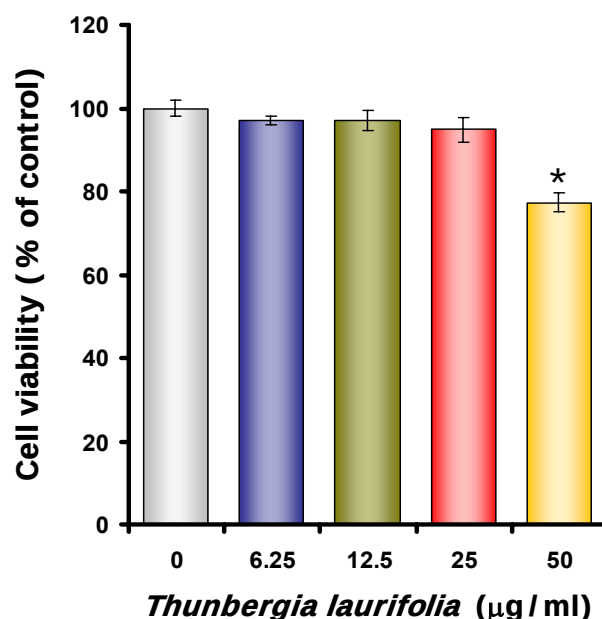
เมื่อนำน้ำหนักของสำลีมาคำนวณหา % inhibition พบว่ายา prednisolone สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสำลีได้ 19.80 % และสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้น 200, 400 และ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสำลีได้ 14.35 %, 16.55 % และ 18.09 % ตามลำดับ (รูปที่ 4-5)



รูปที่ 4-5 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเกิด tissue granulation ของสารสกัดใบรางจืดและ prednisolone ในหนู mice ที่ได้รับการผ่าตัดเอาก้อนสาลีสเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหน้าท้อง, (n = 7)

4.3 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบรางจืด โดยการ incubate เซลล์กับสารสกัดจากใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างกัน (6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่า cell viability โดยใช้ MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดที่สามารถใช้ในการทดสอบในกิจกรรมต่อไปโดยที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบรางจืดที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีค่า cell viability ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4-6) อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากใบรางจืดความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ จะมีผลทำให้ค่า cell viability ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป จากข้อมูลที่ได้ทำหาคณะผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดที่ 6.25, 12.5 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับทำการทดสอบในกิจกรรมต่อไป



รูปที่ 4-6 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว

4.4 ศึกษาผลของสารสกัดจากรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)

ในขั้นตอนเริ่มต้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร LPS ที่สามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจให้สร้างไนตริกออกไซด์ได้ โดยที่ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย incubate เซลล์กับ LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (10 ng/ml, 100 ng/ml และ 1 µg/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของไนโตรที่ที่เกิดขึ้นใน culture medium โดยใช้ Griess reagent และตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์โดย MTT assay จากการศึกษาพบว่า สาร LPS ทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจให้ทำการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ผลของ LPS ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ

Treatment	ปริมาณของไนตริกที่เกิดขึ้นใน culture medium ในรูป % of Control
Control (vehicle treated)	100.00 ± 10.63
LPS (10 ng/ml)	645.28 ± 4.49 *
LPS (100 ng/ml)	708.35 ± 17.752 *
LPS (1000 ng/ml)	749.17 ± 8.12 *

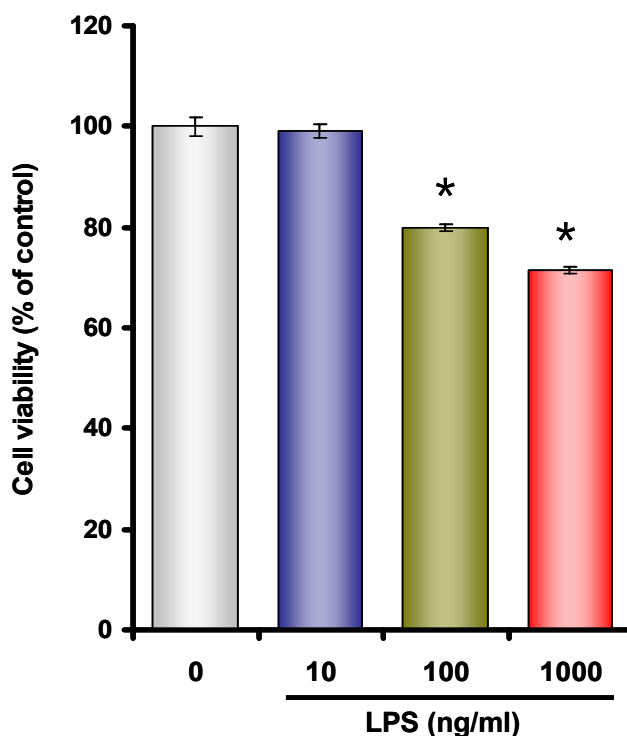
ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± SE (n=8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร LPS (vehicle treated)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร LPS พบว่าสาร LPS ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามพบว่าสาร LPS ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml ขึ้นไปแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทำให้ ค่า cell viability ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4-7)

จากข้อมูลที่ได้ทำให้คณะผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของ LPS ที่ 10 ng/ml สำหรับทำการทดสอบผลการยับยั้งการสร้าง NO, PGE₂ และ TNF- α ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจต่อไป

N (G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) เป็นสารกลุ่ม L-arginine analog ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ iNOS ดังนั้นในการศึกษาผลของสารสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ จึงใช้สาร L-NAME เป็น positive control

ดังนั้นจึงศึกษาผลของสาร L-NAME ต่อต่อความมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้สาร L-NAME ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าสาร L-NAME ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นสูงกว่า 20 ไมโครโมลาร์ พบว่า L-NAME เริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงเลือกใช้ L-NAME ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็น positive control สำหรับการทดลองนี้

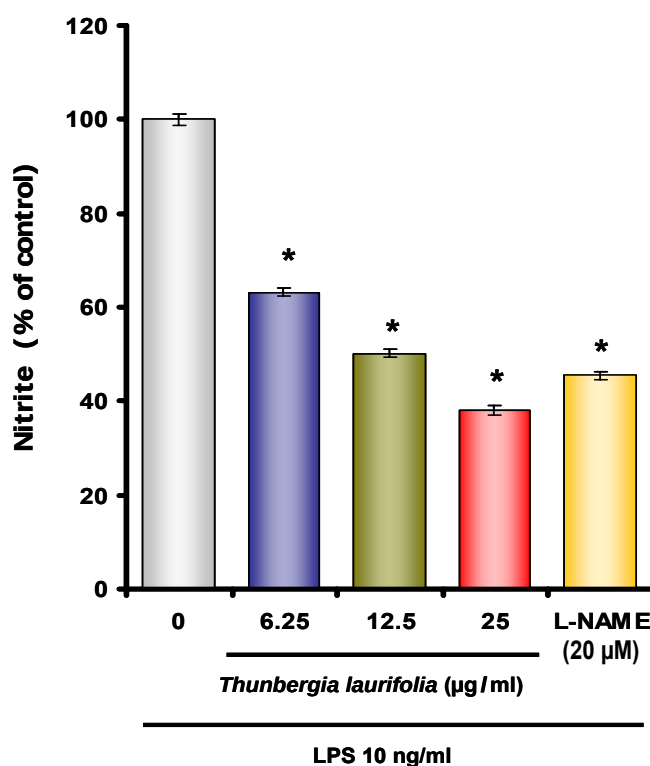


รูปที่ 4-7 ผลของ LPS ที่มีต่อความมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร LPS ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ข้อมูลแสดงในรูป Mean $\pm$ SE (n=8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร LPS

จากนั้นทำการทดสอบผลของสารสกัดใบรางจืดและ L-NAME ที่ให้ร่วมกับ LPS ต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยใช้สารสกัดใบรางจืดหรือสาร L-NAME ให้ร่วมกับ สาร LPS ความเข้มข้น 10 ng/ml เพื่อทดสอบว่าสาร LPS เมื่อให้ร่วมกับสารสกัดใบรางจืดหรือสาร L-NAME จะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7)

จากผลการทดลองพบว่าสาร LPS ความเข้มข้น 10 ng/ml เมื่อทดสอบร่วมกับสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ L-NAME ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ไม่ทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ทดลองกับเซลล์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดใบรางจืด หลังจากกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจให้สร้าง NO โดยการ incubate กับสาร LPS (10 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาร L-NAME (20 μ M) ที่ใช้เป็น positive control สามารถลดการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว โดยมี % inhibition = 45.43 % ส่วนสารสกัดใบรางจืดเมื่อให้ร่วมกับสาร LPS สามารถลดการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยพบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μ g/ml สามารถลดการสร้าง NO ได้ 11.86 %, 18.82 %, 36.34 % ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4-8)



รูปที่ 4-8 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างไนตริกออกไซด์ด้วยสาร LPS ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 8) * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS

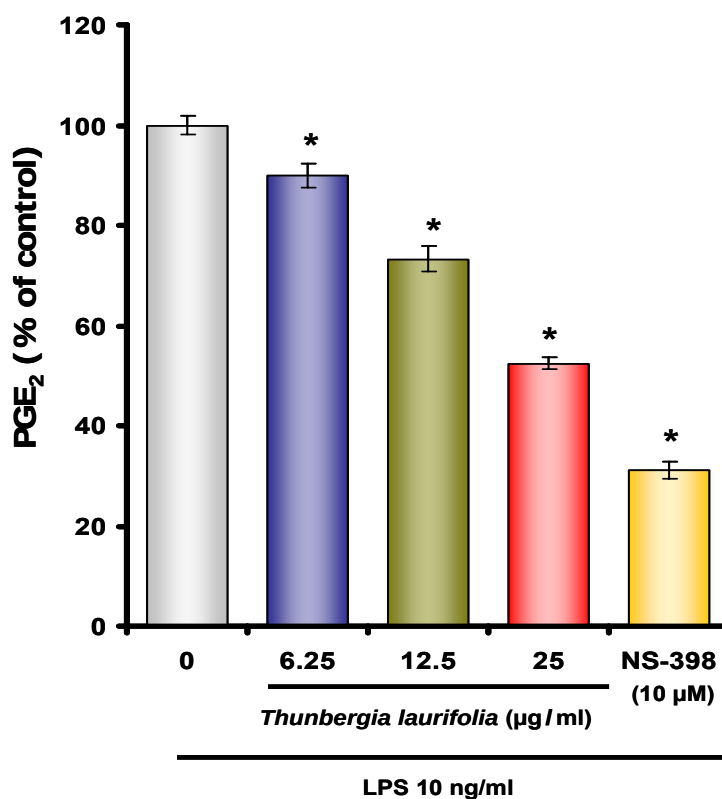
4.5 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง prostaglandin E₂ (PGE₂) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)

NS-398 เป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ enzyme COX-2 อย่างจำเพาะเจาะจง (specific COX-2 inhibitor) ดังนั้นในการศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง PGE₂ จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ จึงใช้สาร NS-398 เป็น positive control

จากการศึกษาผลของสาร NS-398 ต่อต่อความมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้สาร NS-398 ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ พบว่าสาร NS-398 ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่จะเริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 10 ไมโครโมลาร์ขึ้นไป (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงใช้เลือกใช้ NS-398 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็น positive control สำหรับการทดลองนี้

จากนั้นทำการทดสอบผลของ NS-398 ที่ให้ร่วมกับ LPS ต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยใช้สาร NS-398 co-incubated กับสาร LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบว่าสาร NS-398 เมื่อให้ร่วมกับสาร LPS ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองพบว่าสาร NS-398 เมื่อทดสอบร่วมกับ LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ไม่ทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ในการทดลองได้โดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

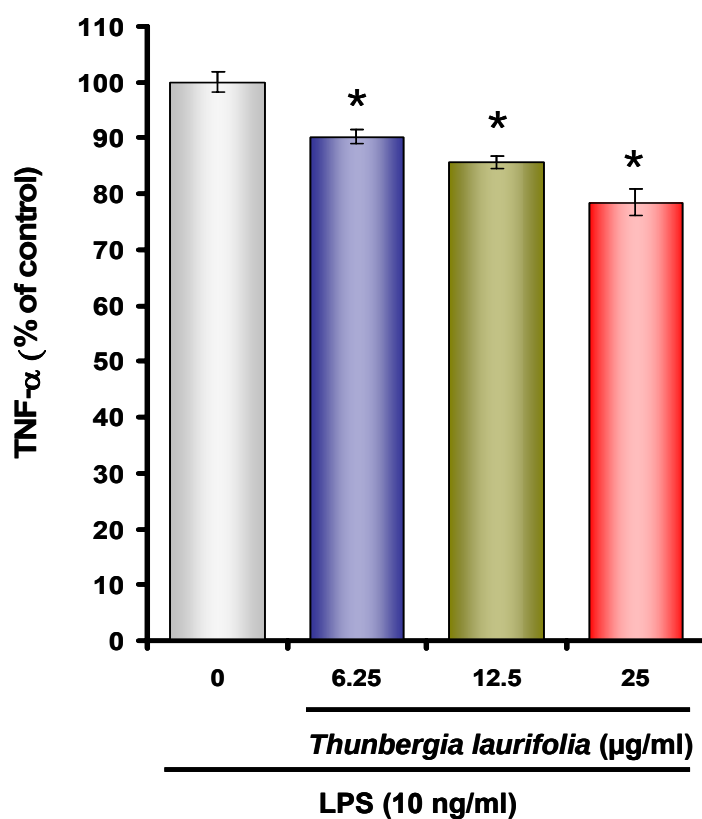
เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง PGE₂ ของสารสกัดใบรางจืด หลังจากกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจให้สร้างสาร PGE₂ โดยการ incubate กับ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาร NS298 (10 ไมโครโมลาร์) สามารถลดการสร้าง PGE₂ ได้ 79 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการสร้าง PGE₂ ได้ 10.14 %, 26.68 % และ 62.59 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4-9)



รูปที่ 4-9 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้าง PGE₂ ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว

4.6 ผลของสารสกัดจากรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง TNF- α ของสารสกัดใบรางจืด หลังจากกระตุ้นเซลล์ มาโครฟาจให้สร้างสาร TNF- α โดยการ incubate กับ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการสร้าง TNF- α ได้ 9.80 %, 14.34 % และ 21.53 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4-10)



รูปที่ 4-10 ผลของสารสกัดใบรางจืด ต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ข้อมูลแสดงในรูป mean $\pm$ SE (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียว

4.7 ความสามารถในการจับไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide scavenging activity) ของสารสกัดจากรางจืด

จากการศึกษาความสามารถในการจับไนตริกออกไซด์ที่ปลดปล่อยจากการสลายตัวของสาร sodium nitroprusside พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดสามารถจับกับไนตริกออกไซด์ได้ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 206.91 µg/ml

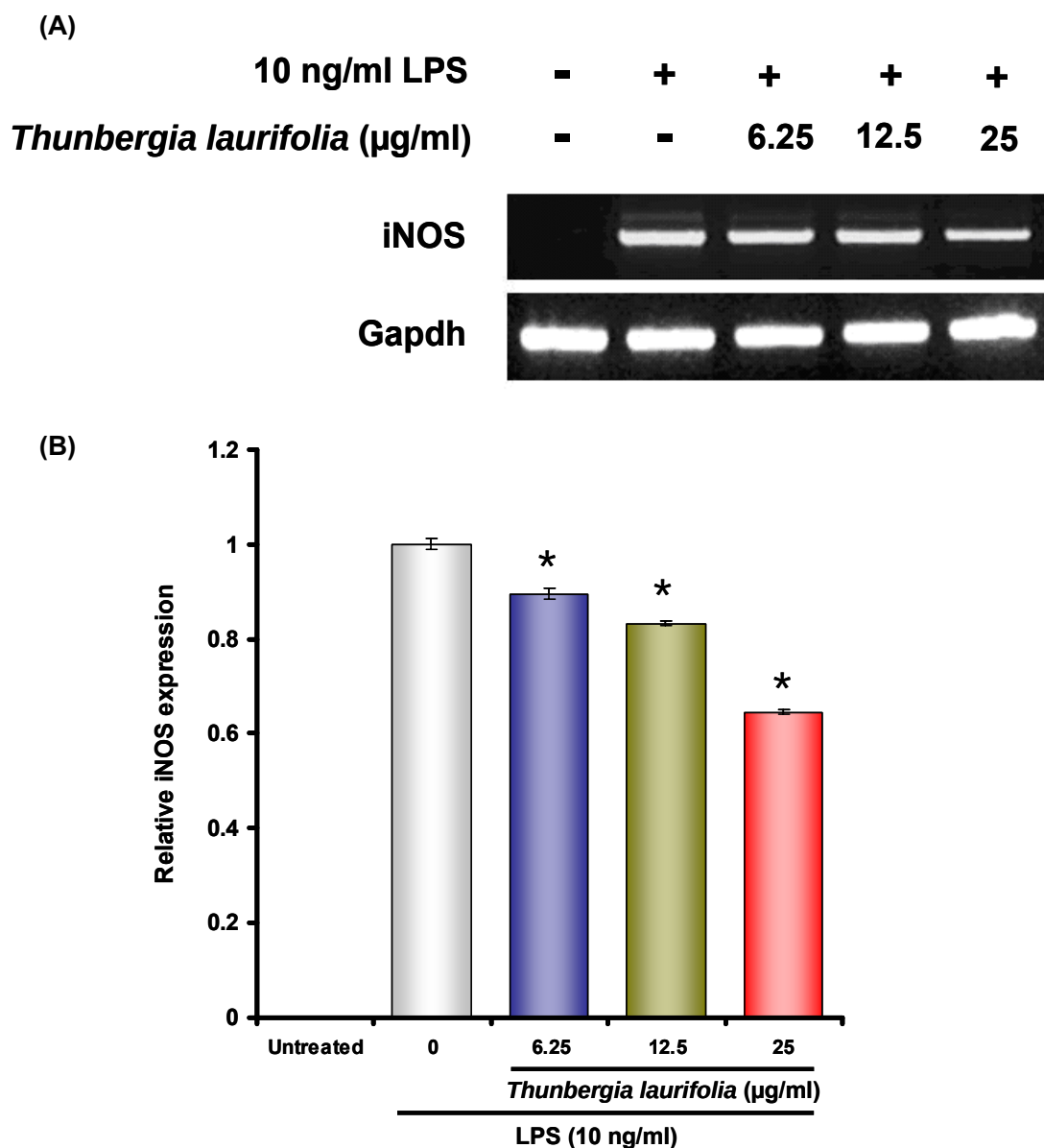
ตารางที่ 4-6 ความสามารถจับสาร nitric oxide ของสารสกัดจากใบรางจืด

ความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืด (µg/ml)	% Inhibition
20	7.70
50	22.88
100	38.98
200	51.27
500	63.94

4.8 ผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)

4.8.1 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการแสดงออก iNOS mRNA

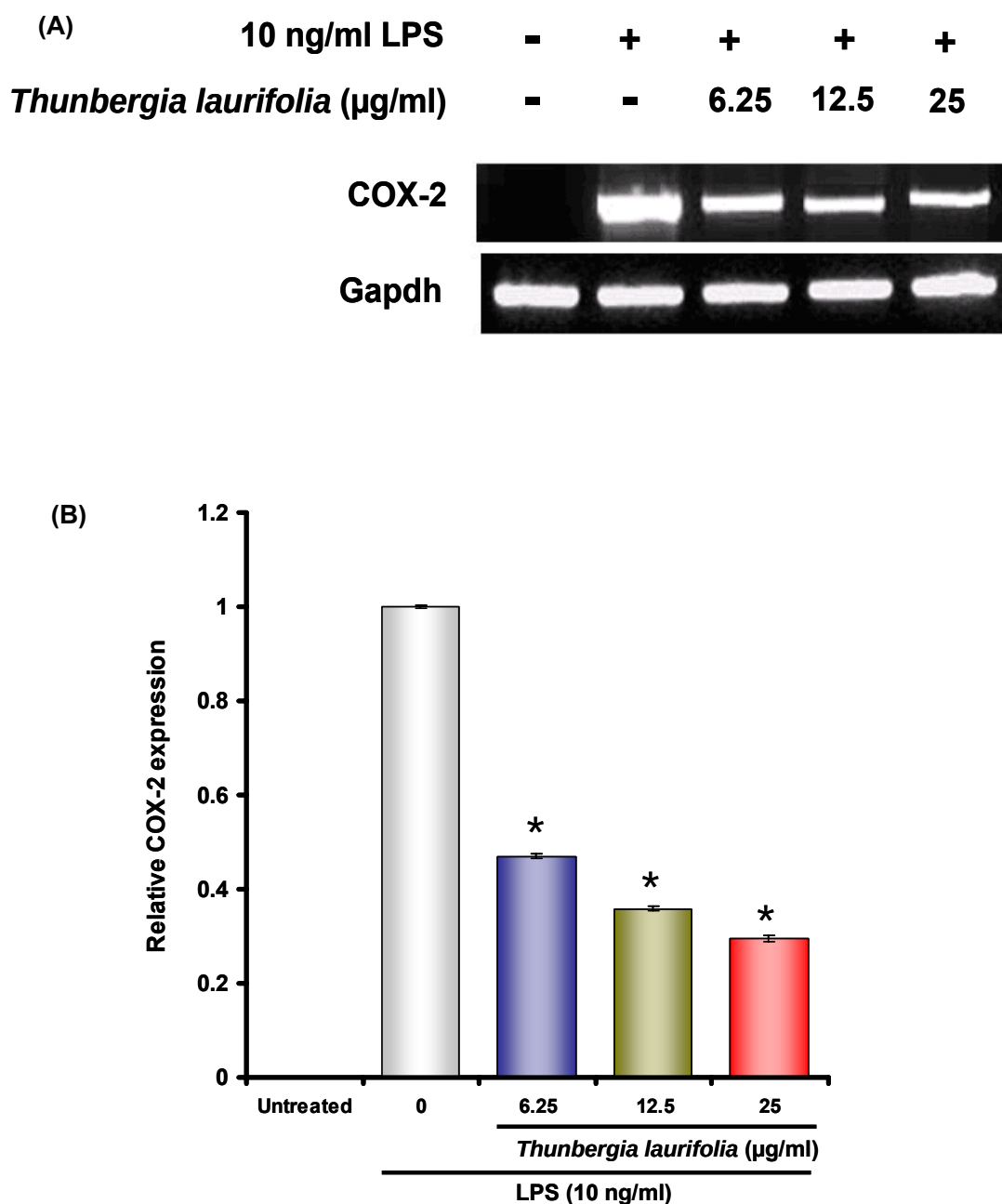
การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ด้วยวิธี RT-PCR นั้น โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) อย่างเดียว หรือ ได้รับ LPS (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) พร้อมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ (6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (unstimulated RAW 264.7 cells) ไม่พบการแสดงออกของ iNOS mRNA ในทางตรงกันข้าม กลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่าการสังเคราะห์ iNOS mRNA ในปริมาณสูง จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ iNOS mRNA ได้ (รูปที่ 4-11(A)) โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด จากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นจากรูปถ่าย gel electrophoresis พบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS mRNA ได้ร้อยละ 20-40 (รูปที่ 4-11(B)) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับระดับไนตริกออกไซด์ที่สร้างขึ้นจากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)



รูปที่ 4-11 ผลของสารสกัดใบรางจืด ต่อการแสดงออกของ iNOS mRNA (A) ผลการยับยั้งการสร้าง iNOS mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) กราฟแท่งแสดงผลการยับยั้งการสร้าง iNOS mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n = 3) * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS

4.8.2 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 mRNA

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน COX-2 โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่เซลล์สร้างขึ้นภายใน ด้วยวิธี RT-PCR นั้น เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร อย่างเดียว หรือ ได้รับ LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พร้อมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของยีน COX-2 ในเซลล์แต่ละกลุ่ม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4-12 (A) พบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (unstimulated RAW 264.7 cells) ไม่พบการแสดงออกของ COX-2 mRNA ในขณะเดียวกัน เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่ามีการสังเคราะห์ COX-2 mRNA ในปริมาณสูง จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืดพบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ COX-2 mRNA โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นจากรูปถ่าย gel electrophoresis พบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 mRNA ได้มากถึงร้อยละ 40-50 (รูปที่ 4-12 (B)) ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการยับยั้งการสร้าง PGE₂ ของสารสกัดใบรางจืด (รูปที่ 4-9)



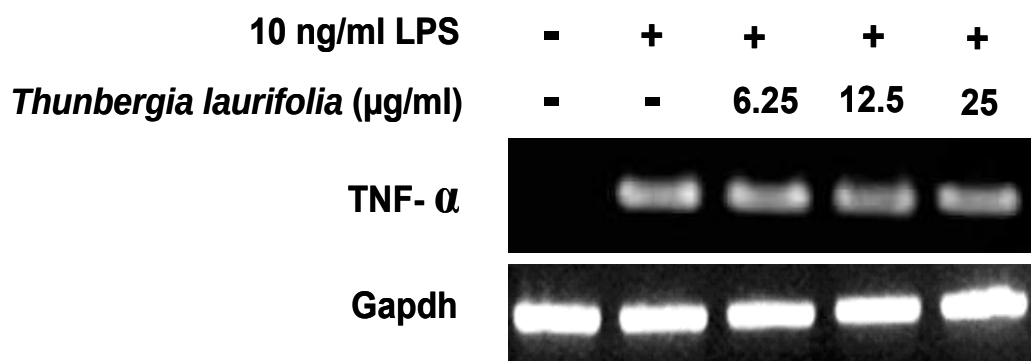
รูปที่ 4-12 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการแสดงออกของ COX-2 mRNA (A) ผลยับยั้งการสร้าง COX-2 mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) กราฟแท่งแสดงผลการยับยั้งการสร้าง COX-2 mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n = 3)

* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS

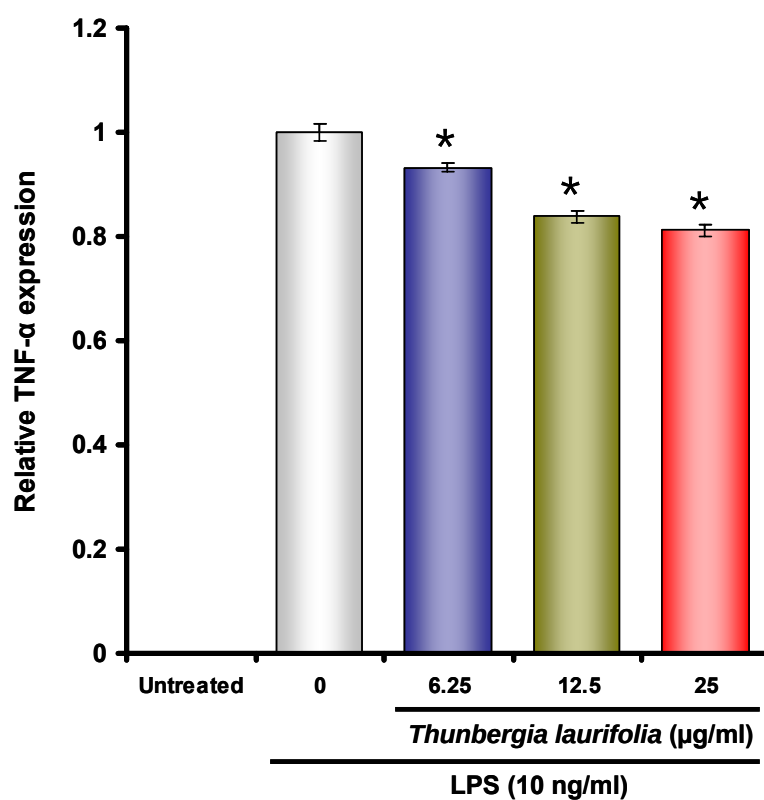
4.8.3 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α mRNA

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน TNF- α โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่เซลล์สร้างขึ้นภายใน ด้วยวิธี RT-PCR นั้น เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร อย่างเดียว หรือ ได้รับ LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พร้อมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของยีน COX-2 ในเซลล์แต่ละกลุ่ม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4-13 (A) พบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (unstimulated RAW 264.7 cells) ไม่พบการแสดงออกของ TNF- α mRNA ในขณะเดียวกัน เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่ามีการสังเคราะห์ TNF- α mRNA ในปริมาณสูง จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืดพบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ TNF- α mRNA โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นจากรูปถ่าย gel electrophoresis พบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α mRNA ได้ประมาณร้อยละ 6-20 (รูปที่ 4-13 (B)) ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการยับยั้งการสร้างสาร TNF- α ของสารสกัดใบรางจืด (รูปที่ 4-10)

(A)



(B)



ภาพที่ 4-13 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการแสดงออกของ TNF- α mRNA (A) ผลยับยั้งการสร้าง TNF- α mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) กราฟแท่งแสดงผลการยับยั้งการสร้าง TNF- α mRNA ของสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n = 3) * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

5.1 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) เป็นพืชในตระกูล Acanthaceae ซึ่งในวงการแพทย์แผนไทย รายงานว่ามีสรรพคุณในการรักษาอาการชักและ มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาแก้ปวดและ ต้านอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูงและมีผลข้างเคียงต่ำ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยในเชิง วิทยาศาสตร์ที่รับรองเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืดทั้งในระดับชีวเคมีและระดับ โมเลกุล ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืดใน สัตว์ทดลอง และ ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) โดยศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้างสาร inflammatory mediators ที่สำคัญเช่น nitric oxide (NO), สาร prostaglandin E₂ (PGE₂) และ สาร tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ใน เซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) รวมทั้ง ศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารดังกล่าว

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืดในสัตว์ทดลอง เมื่อทดสอบฤทธิ์ลด ปวดและต้านอักเสบโดยวิธี writhing test พบว่ายามาตรฐานที่ใช้คือ aspirin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบใน ระยะเฉียบพลันได้ดี (Sanchez-Mateo et al., 2006) สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 63.49 % ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่าสารสกัดใบรางจืด สามารถลดการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมี ความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัดโดยสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ที่ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้ถึง 54.90 % ซึ่งน้อยกว่ายามาตรฐาน aspirin (300 mg/kg) เล็กน้อย

การเกิด writhing response โดยการเหนี่ยวนำด้วยการฉีด acetic acid เข้าช่องท้องจะทำให้ เกิดการสร้างสาร inflammatory mediators ชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก เช่น serotonin, histamine, bradykinin, substance P และ prostaglandin (Collier et al., 1968; Raj, 1996; Intahphuak et al., 2004) รวมไปถึงการหลั่งของของเหลวในช่องท้อง นอกจากนี้ acetic acid ยังไป เพิ่มการหลั่งสาร arachidonic acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cyclooxygenase ส่งผล ให้เกิดการการสร้าง PGE₂ เพิ่มมากขึ้น (Yin et al., 2003; Daud et al., 2006) ทำให้เกิดการ กระตุ้นปลายประสาททำให้รู้สึกเจ็บปวดและส่งผลให้เกิดอาการ writhing

จากผลการวิจัยข้างต้นทำให้แสดงให้เห็นว่าการที่สารสกัดใบรางจืดฤทธิ์ลดปวดหรือลด writhing response ส่วนหนึ่งน่าจะมีผลจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin E₂ ของสารสกัด ใบรางจืด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่พบว่าสาร สกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยวิธี formalin test โดยฉีด formalin เข้าที่เท้าของหนูเพื่อกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดบริเวณเท้าและกระตุ้นให้หนูแสดงพฤติกรรมเลียเท้าข้างที่ฉีดสาร ผลการศึกษาพบว่าในช่วง early phase (0-5 min) ยา aspirin (300mg/kg) สามารถยับยั้งความเจ็บปวดได้ 46.69 % และสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งความเจ็บปวดได้ 47.57 % ตามลำดับซึ่งมีความใกล้เคียงกับยา aspirin ส่วนในช่วง late phase (20-30 min) ยา aspirin (300mg/kg) สามารถยับยั้งความเจ็บปวดได้ 64.05 % และสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งความเจ็บปวดได้ 74.76 % ตามลำดับซึ่งมากกว่ายามาตรฐาน aspirin

สาร formalin สามารถกระตุ้นพฤติกรรมเลียเท้าดังกล่าวได้ทั้งใน early phase (0-5) และ late phase (20-30) (Abbott et al., 1995) โดยสามารถกระตุ้นผ่านระบบประสาท (nociceptive neurons) ได้โดยตรง (ระยะ early phase) และทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่ออย่างเฉียบพลัน (ระยะ late phase) (Hunskar and Hole, 1987) จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดอาการเจ็บปวดของหนูได้ทั้งในระยะ early phase และ late phase ในลักษณะแปรตามความเข้มข้น โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในระยะ late phase ได้ดีกว่า early phase จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบรางจืดมีผลลดความเจ็บปวดในระยะ early phase ได้โดยอาจมีผลยับยั้งผ่านระบบประสาทรับความรู้สึก (acute neurogenic pain) (Sanchez-Mateo et al., 2006) หรือผ่าน opioid receptors ในระบบประสาทส่วนกลาง (Gonzalez-Trujano et al., 2007) และลดการอักเสบในระยะ late phase โดยอาจแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin และสารสื่ออื่นๆ เช่น histamine, serotonin และ bradykinin (Yin et al., 2003; Young et al., 2005; Daud et al., 2006) จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการอักเสบได้ กลไกหลักน่าจะมีผลมาจากการออกฤทธิ์ยับยั้งสารสื่อการอักเสบเช่น PGE_2 และจากการศึกษาของ Yamamoto et al, (2002) พบว่าการศึกษาฤทธิ์ลดความเจ็บปวดโดยการฉีด formalin เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง PGE_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยวิธี croton oil-induced ear edema เป็นการกระตุ้นให้เกิดการบวมที่ใบหูของหนูโดยการทา croton oil พบว่ายา indomethacin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสามารถลดการบวมของหูหนูที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถยับยั้งการบวมได้ 44.44 % ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการบวมที่ใบหูหนู ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัดโดยสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (0.5 mg/ear) สามารถยับยั้งการบวมที่ใบหูหนู ได้ถึง 58.22 % ซึ่งยับยั้งได้มากกว่ายามาตรฐาน indomethacin (0.5 mg/ear)

Croton oil จัดเป็น phlogistic agent ที่สกัดมาจากต้นสลอด (*Croton tiglium*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ euphorbiaceae สารนี้จัดเป็นสารก่อความระคายเคืองต่อผิวหนัง ภายใน croton oil ประกอบไปด้วยสารกลุ่ม phorbol ester ชื่อ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) เป็นสารประกอบที่สำคัญ พบว่าเมื่อทา croton oil หรือ TPA ลงบนผิวหนังจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบแบบเฉียบพลันบริเวณที่สัมผัส โดยมีอาการ vasodilation, polymorphonuclear leukocyte infiltration ภายในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดอาการบวม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดผ่านการทำงานของโปรตีน kinase C (PKC) ส่งผลต่อเนื่องไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A₂ เป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ arachidonic acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cyclooxygenase ทำให้การสร้างสาร leukotriene และ prostaglandin โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PGE₂ มีเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่าอาการบวมที่โบทูหนูจาก croton oil มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร NO เนื่องจากพบว่าสาร L-N^ω-nitroarginine (L-NN) ที่มีฤทธิ์เป็น NOS inhibitor สามารถลดอาการบวมลดการบวมที่โบทูหนูที่เหนียวมาโดย croton oil ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Zuoqi et al., 2008)

จากผลการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการที่สารสกัดใบรางจืดฤทธิ์ลดการบวมที่โบทูหนูได้นั้น คาดว่าเกิดจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO และ PGE₂ ของสารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้างสาร NO และ PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเรื้อรังโดยวิธี cotton pellet-induced granuloma in mice โดยการผ่าตัดเอาก้อนสำลีใส่เข้าใต้ผิวหนังของหนูเพื่อทำให้เนื้อเยื่อเกิดการสะสมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (tissue granulation) เมื่อผ่าตัดเอาก้อนสำลีใส่เข้าใต้ผิวหนังของหนูจะทำให้เซลล์ macrophage และสารคัดหลั่งจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเคลื่อนเข้ามาสะสมในก้อนสำลี (neovascularization) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อและเกิดการบวม (Laupattarakasem et al., 2006) ซึ่งการเกิด granuloma ในการอักเสบแบบเรื้อรังนี้มีความเกี่ยวข้องกับสาร cytokine หลายชนิด เช่น interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrotic factor (TNF- α) เป็นต้น สารสื่อทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์กระตุ้น fibroblast มีผลเพิ่มจำนวน fibroblast กระตุ้นการสร้างเส้นใย collagen และ ทำให้มีลิ้มโฟซัยต์เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้น เป็นผลทำให้เกิด granuloma

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการเกิด granuloma ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยลดได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมจนถึง 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยสารสกัดใบรางจืดทั้งสามความเข้มข้นดังกล่าวมีผลไม่แตกต่างกันแต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ 1% MC ซึ่งอาจเกิดจากผลในการยับยั้งการเกิด tissue granuloma ของสารสกัดใบรางจืดถึง maximum effect แล้วตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป จากผลการวิจัยดังกล่าวสรุปได้ว่าสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นต้นไปสามารถลดการอักเสบในระยะเรื้อรังได้ดี และในการ

ทดลองใช้ยามาตรฐานคือ prednisolone เนื่องจากมีรายงานว่า aspirin ไม่สามารถลดการอักเสบในระยะเรื้อรังได้ดีเนื่องจากเป็นยาในกลุ่ม NSAID (ณัฐวิยา พงศ์ผาสุก, 2546; Intahphuak et al., 2004) ส่วนยา prednisolone เป็นยาในกลุ่ม steroid ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่แรงสามารถลดการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังได้ดีเนื่องจากเกิดการยับยั้งการสร้าง fibroblasts และการหลั่งของ neutrophils, collagen และ mucopolysaccharides ที่มาสะสมในก้อนลำไส้ (Perianayagam et al., 2006; Kale et al., 2007)

จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ต้านอักเสบแบบเรื้อรังได้ ซึ่งฤทธิ์ส่วนหนึ่งน่าจะมีผลจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร TNF- α ของสารสกัดใบรางจืด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้างสาร TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในสัตว์ทดลองทั้งสี่วิธีการทดลองทำให้ทราบว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืดน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับสารสื่อ (mediators) การอักเสบซึ่งสารสื่อการอักเสบที่มีบทบาทสำคัญในการทดลองทั้งสี่วิธีดังกล่าวน่าจะเป็นสาร PGE₂ เนื่องจากการทบทวนวรรณกรรมอื่นๆ มีความสอดคล้องกับการทดลองข้างต้น แต่ผู้วิจัยยังไม่สามารถยืนยันถึงกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบที่แน่นอนของสารสกัดจากใบรางจืดได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ด้านการอักเสบที่แท้จริงของสารสกัดใบรางจืด คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจทั้งในระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุลโดยเน้นศึกษาผลของสารสกัดต่อการสร้าง NO, PGE₂ และ TNF- α รวมถึงผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และยังศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน TNF- α อีกด้วย

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการผลิตสาร inflammatory mediators เช่น NO, PGE₂ และ TNF- α ที่มากเกินไปมีความสัมพันธ์กับการอักเสบ ดังนั้นการคุมการผลิต NO, PGE₂ และ TNF- α จึงมีความสำคัญในการบรรเทาอาการอักเสบ การให้เซลล์สัมผัสกับสาร LPS เป็นการจำลองการอักเสบจากการติดเชื้อจุลชีพในเซลล์มาโครฟาจโดยใช้ LPS กระตุ้นเซลล์มาโครฟาจทำให้มีการหลั่งสาร NO, PGE₂ และ TNF- α ออกมาในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลชีพ

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดด้วยวิธี MTT assay โดยวัดความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (cell viability) ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถทำปฏิกิริยากับสาร MTT และเปลี่ยนให้อยู่ในรูป formazan salt โดยไมโตคอนเดรียที่อยู่ภายในเซลล์ ถ้าเซลล์ใดที่ตายจะไม่สามารถเปลี่ยนสาร MTT ให้อยู่ในรูป formazan salt ได้ เมื่อละลายผลึก formazan salt ด้วย DMSO จะเห็นเป็นสีม่วงส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะเห็นเป็นสีจาง จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจและความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายแสดงให้เห็น

เห็นว่ารางจืดเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูง จากผลการศึกษาข้างต้นมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของมณฑิร เปสึ และคณะ (2544) และ วิวรรณ วิสิฐพงศ์พันธ์ (2545)

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจพบว่า สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการสร้างสาร NO และ PGE_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณ NO และ PGE_2 เป็นผลมาจากการลดปริมาณการผลิต ไม่ได้มาจากการที่เซลล์ตายเนื่องจากสารสกัด

การศึกษาความสามารถของสารสกัดใบรางจืดในการจับ NO ที่ถูกปลดปล่อยจากสาร sodium nitroprusside ใน physiological pH วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อตอบคำถามว่า ในกรณีที่สารสกัดรางจืดลดปริมาณของ NO ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide นั้นเกิดจากการที่สารสกัดจากรางจืดมีผลยับยั้งการสร้างสาร NO หรือมาจากความสามารถในการจับ NO (nitric oxide scavenging activity) โดยตรงของสารสกัด ซึ่งพบว่า สารสกัดจากใบรางจืดสามารถจับกับสาร NO ได้ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 206.91 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการศึกษาจะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดใบรางจืดสามารถจับกับสาร NO ได้น้อยเพียง 7.70 % เท่านั้น ในขณะที่ในการศึกษาผลการยับยั้งการหลั่งของสาร NO จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ พบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการหลั่งสาร NO ได้ถึง 36.34% ซึ่งสูงกว่ามากแสดงให้เห็นว่าผลของสารสกัดใบรางจืดมาจากการยับยั้งการสร้างมากกว่าการจับกับ NO โดยตรง

NO และ PGE_2 จัดเป็น inflammatory mediators ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ สารทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage สาร NO และ PGE_2 ถูกสร้างโดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จัดเป็น inducible enzyme โดยจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นจำนวนมาก ด้วยสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin สาร nitric oxide มีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่าน ของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ ในขณะที่สาร PGE_2 มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการสร้าง inflammatory mediator หลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดงและมีไข้ ดังนั้นการยับยั้งการหลั่งของสาร NO และ PGE_2 จึงเป็นแนวทางหลักสำคัญทางหนึ่งในการควบคุมกระบวนการอักเสบ โดยเฉพาะการอักเสบแบบเฉียบพลัน จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าการที่สารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบส่วนหนึ่งน่าจะมีผลจากการลดลงของ NO และ PGE_2 นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS และ COX-2 โดยดูผลการแสดงออกของ mRNA expression ของยีน iNOS และ COX-2 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ได้จากผลการวิจัยข้างต้นสรุปได้ว่าการที่สารสกัดใบ

รางวัลมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้นั้นส่วนหนึ่งน่าจะมีผลมาจากการยับยั้งการสร้างของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ส่งผลให้มีการหลั่งของสาร NO และ PGE₂ น้อยลง

การศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่า การควบคุมการทำงานของยีน iNOS และ COX-2 ถูกควบคุมผ่านกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยอาศัยการทำงานของ nuclear factor-KB (NF-KB) (Baeuerle, 1991) ข้อมูลการศึกษาโครงสร้างของยีน iNOS และ COX-2 ในบริเวณ 5'-flanking region ของยีนดังกล่าว พบว่ามี cis-acting NF-KB element (Kujubu et al., 1991; Lowenstein et al., 1993) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ inhibitor KB kinase (IKK) ผ่านกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีน inhibitor KB (IKB) ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน IKB จึงทำให้โปรตีน NF-KB หลุดออกมา แล้วจึงเกิดการเคลื่อนที่ (translocation) ของโปรตีน NF-KB เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเข้าจับบริเวณ cis-acting NF-KB element บนยีน iNOS และ COX-2 ทำให้ยีนเหล่านี้สามารถทำงานได้และส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมา (Griscavage et al., 1996) ดังนั้นการที่ปริมาณ NO และสาร PGE₂ ลดลงหลังจากได้รับสารสกัดใบรางจืดอาจเนื่องจากว่ายีน iNOS และ COX-2 ถูกยับยั้งด้วยเหตุนี้สารสกัดใบรางจืดจึงสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบได้

การศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการสร้างสาร TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณ TNF- α เป็นผลมาจากการลดปริมาณการผลิต ไม่ได้มาจากการที่เซลล์ตายเนื่องจากสารสกัด งานวิจัยครั้งนี้ยังทำการศึกษากลไกการยับยั้งการสร้าง TNF- α โดยดูผลการแสดงออกของ mRNA expression ของยีน TNF- α พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญ

สาร TNF- α ถูกผลิตโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดเช่น โมโนไซต์ (monocyte) และแมคโครฟาจ (macrophage) ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอมหรือระบบภูมิคุ้มกัน ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ทั้งชนิดบี และที รวมทั้งไฟโบรบลาสต์ TNF- α จัดเป็นสารช่วยโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตช่วยโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิดอื่นๆ และสารตัวกลางสำหรับกระบวนการอักเสบ (inflammatory mediator) หลายชนิด เช่น interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) และ granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) นอกจากนั้น TNF- α ยังกระตุ้นให้ไฟโบรบลาสต์สร้างโมเลกุลสำหรับยึดติด (adhesion molecule) ออกมาที่ผิว ซึ่งตัวโมเลกุลยึดติดเหล่านี้จะจับกับลิแกนด์ (ligand) บนผิวของลิมโฟไซต์ ทำให้มีลิมโฟไซต์เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้น (Shanahan and Clair, 2002)

นอกจากนี้ยังพบว่า $\text{TNF-}\alpha$ สามารถเหนี่ยวนำการสร้างสาร NO และ PGE_2 ได้ โดย $\text{TNF-}\alpha$ ที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นให้ NF-KB ทำงาน ซึ่งโดยปกติแล้ว NF-KB จะอยู่ในcytoplasm ในรูปที่ยังไม่พร้อมที่จะทำงาน (inactive form) เนื่องจากจับอยู่กับโปรตีนยับยั้ง (inhibitory protein) ชื่อ IKB แต่ในสภาวะที่มี $\text{TNF-}\alpha$ สารนี้จะกระตุ้นผ่าน signaling pathway ทำให้เอนไซม์ IKB kinase ทำงานโดยไปย่อยสลาย IKB ออกจากโมเลกุลของ NF-KB ทำให้ NF-KB อยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ (active form) ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ p50 หรือ p52 กับ p65 เมื่ออยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ NF-KB จะสามารถผ่านเข้าไปในนิวเคลียส ไปควบคุมการสร้างโปรตีน โดยไปจับกับโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีนส์ที่ควบคุมการสร้าง iNOS และ COX-2 เป็นผลให้มีการสร้าง NO และ PGE_2 ออกมามากขึ้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบ (Chanani et al., 2002)

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบส่วนหนึ่งน่าจะมีผลมาจากยับยั้งการแสดงออกของยีน $\text{TNF-}\alpha$ ส่งผลให้มีการหลั่งของสาร $\text{TNF-}\alpha$ น้อยลง ส่งผลต่อเนื้อให้มีสาร NO และ PGE_2 ลดลงด้วย

การศึกษครั้งนี้เน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบรางจืดมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ลดความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองและยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO, PGE_2 และ $\text{TNF-}\alpha$ รวมไปถึงยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ $\text{TNF-}\alpha$ ได้ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการศึกษาถึงองค์ประกอบหลักทางเคมีของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าใบรางจืดมีสารเคมีกลุ่ม flavonoid เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งตัวที่พบมากคือ apigenin

รายงานการวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า สาร apigenin ซึ่งเป็น flavonoids ที่พบได้ในพืชหลายชนิดรวมถึงใบรางจืด มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO, PGE_2 และ $\text{TNF-}\alpha$ จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจได้ (Liang et al., 1999; Nicolas et al., 2007) และยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ $\text{TNF-}\alpha$ ได้ ซึ่งได้โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของ NF-KB ในขบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีนดังกล่าว (Raso et al., 2000; Hougee et al., 2005; Nicolas et al., 2007) ผลการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยข้างต้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า สาร apigenin ที่พบในใบรางจืดอาจเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ ซึ่งคณะผู้วิจัยคิดว่าควรจะทำการศึกษาเพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ต้านอักเสบจากสาร apigenin ในใบรางจืดต่อไป

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ารางจืดเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการยับยั้งการอักเสบ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO และ PGE_2 ในเซลล์มาโครฟาจ และยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ $\text{TNF-}\alpha$ ในเซลล์มาโครฟาจและยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองได้ดี อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกยับยั้งการอักเสบอื่นๆ ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง เช่น การยับยั้งการทำงานของ NF-KB, $\text{TNF-}\alpha$, PPAR- γ และการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองโดยวิธีอื่นๆ ยังต้องการข้อมูลการศึกษาเพิ่มเติมซึ่งการทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบ จะเป็นข้อมูลสำคัญ ที่ยืนยันถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรรางจืด เพื่อให้ผู้ใช้

เกิดความมั่นใจ นอกจากนั้นยังเป็นการช่วยส่งเสริมการนำพืชสมุนไพรรางจืดมาใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานเพื่อพัฒนาเป็นยาแก้ปวดและต้านอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อยต่อไป อันจะเป็นการลดปัญหาสุขภาพของคนในชุมชนและเป็นการประหยัดเงินงบประมาณของชาติในการสั่งซื้อยาจากต่างประเทศ

5.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบรางจืดพบว่าไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) และไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ พบว่า สารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α ในลักษณะแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งผลการศึกษาในระดับโมเลกุลมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในระดับชีวเคมี โดยพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง NO, PGE₂ และ TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) จึงแสดงให้เห็นว่ารางจืดเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการยับยั้งการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง (potent inhibitor) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร inflammatory mediators ที่สำคัญได้หลายชนิดเช่นสาร NO, PGE₂ และ TNF- α เป็นต้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืดเช่น สาร apigenin และควรมีการศึกษากลไกยับยั้งการอักเสบอื่นๆในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง เช่นการยับยั้งการทำงานของ NF-KB, PPAR- γ รวมไปถึงการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองโดยวิธีการอื่นๆ นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบแบบเรื้อรังโดยใช้วิธี cotton pellet-induced granuloma ทำให้ทราบว่าการเกิด tissue granulation เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารสื่อการอักเสบตัวอื่นๆ เช่น IL-1, IL-2, IL-6 และ IL-8 (Franklin et al., 1995; Griffiths et al., 1996; Metwali et al., 1996) ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากใบรางจืดที่มีต่อสารสื่อการอักเสบเหล่านี้ การทราบถึงฤทธิ์ต้านอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืดที่มีข้อมูลยืนยันทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* models ที่มากเพียงพอแล้ว จะส่งผลให้สมุนไพรรางจืดได้รับการยอมรับ และสนับสนุนให้เป็นสมุนไพรใช้ในการรักษาอาการอักเสบเพิ่มมากขึ้น และในอนาคตอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับยาเพื่อใช้ในการวิจัยและศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลการวิจัยดังกล่าวไปประยุกต์ในการรักษากลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากการสร้างสาร NO, PGE₂ และ TNF- α ที่มากเกินไป เช่น rheumatoid arthritis และ osteoarthritis และโรคเมะเร็งบางชนิด ได้อีกด้วย

5.3. Output จากโครงการวิจัย

Output จากโครงการวิจัย การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด (DIGSI80028) ประกอบด้วย

1. การนำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนในรูปแบบ Poster Presentation (ชื่อเรื่องฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืด: ผลต่อการสร้างสาร Nitric oxide ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ในที่ประชุมวิชาการ The First Annual Northeast Pharmacy Research Conference 2009 ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 9-10 กุมภาพันธ์ 2552

บทคัดย่อของผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ The First Annual Northeast Pharmacy Research Conference 2009

ฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืด: ผลต่อการสร้างสาร Nitric oxide

ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)

อริป ลิ้มตระกูล, ปราโมทย์ มหคุณากร, อัจฉราวรรณ โตภาคงาม

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ในตำรายาสมุนไพร รายงานว่ารางจืดมีสรรพคุณในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืด ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืด โดยทำการศึกษาผลการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ซึ่งจัดเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญตัวหนึ่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นโดยสาร lipopolysaccharide (LPS) ผลการศึกษาพบว่าสาร สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/ml}$ และ L-NAME (20 μM) เมื่อให้ร่วมกับสาร LPS สามารถลดการหลั่งสาร nitric oxide จากเซลล์เพาะเลี้ยง มาโครฟาจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสาร LPS เพียงอย่างเดียว โดยมีผลยับยั้งได้ 11.86, 18.82, 36.34 และ 41.57 % ตามลำดับ จากการศึกษาความสามารถในการจับกับ NO (NO scavenging activity) พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถจับกับ NO ได้ โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 206.9 \mu\text{g/ml}$ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืดส่วนหนึ่งมีผลมาจากการยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งผลดังกล่าวคาดว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (i-NOS) มากกว่าผลจากการจับกับสาร NO โดยตรง

คำสำคัญ : รางจืด, ฤทธิ์ต้านอักเสบ, nitric oxide, i-NOS

2. บทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

บทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติอยู่ระหว่างการดำเนินการจัดทำต้นฉบับ (manuscript) ทั้งนี้คณะผู้วิจัยคาดการณ์ว่าจะส่งเพื่อรับการพิจารณาตีพิมพ์จำนวน 1 ฉบับได้แก่

1. Anti-inflammatory effect of *Thunbergia laurifolia* leaf extract in mice and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW 264.7 macrophage cells. คาดว่าจะส่งเพื่อรับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Journal of Ethnopharmacology หรือวารสารวิชาการอื่นที่มีความใกล้เคียง

บรรณานุกรม

- จินตนา จุลทัศน์. ส่วนประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากใบข่อย [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.
- จิรเดช มโนสร้อย, อรัญญา มโนสร้อย, พัฒนา ศรีพลากิจ. การผลิตด้วยยาสเดียรอยด์. เชียงใหม่: โรงพิมพ์คลองช้าง; 2545.
- ชะลอ อุทกภาชน. การใช้สมุนไพรรักษาคนไข้. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แพรววิทยา; 2539.
- ณัฐฐิยา พงศ์ผาสุก. การพัฒนาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบเพื่อใช้เป็นยาทาภายนอก [วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2546.
- นันทวัน บุญยะประภัตร, อรณัฐ โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (4). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ประชาชน; 2539.
- ปณต ตั้งสุจริต, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์, วันชัย ไอรารัตน์. การตรวจสอบฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบของพืชผักพื้นบ้านอีสาน. ว. ศรีนครินทร์เวชสาร 2549; 21(4): 305-310.
- พาณี เตชะเสน, ชัชวดี ทาบทอง. การทดลองใช้รางจืดแก้พิษยาฆ่าแมลง. ว. เชียงใหม่เวชสาร 2523; 19(3): 105-114.
- พิมพ์พรรณ เกิดอุดม. การอักเสบ ยาที่ใช้รักษาการอักเสบ การแพ้ฮีสตามีนและยาต้านฮีสตามีน. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2520.
- ภาคภูมิ พาณิขุปกานันท์. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของรางจืด [ออนไลน์]. 2544 [อ้างเมื่อ 23 พฤษภาคม 2551]. จาก: <http://www.pcog.pharmacy.psu.ac.th/thi/Article/11-44/Thunbergia.pdf>
- ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. พืชสมุนไพรที่ใช้เป็นยา (1). กรุงเทพฯ: อักษรภาพิพัฒน์; 2539.
- มณฑิยา เปสึ, วัชร คุณกิตติ, ฉันทนา อารมย์ดี, มุกดา จิตต์เจริญธรรม. การพัฒนาสารสกัดรางจืดเพื่อใช้รักษาแผลอักเสบในช่องปากในผู้ป่วยมะเร็ง. รายงานการวิจัย. ขอนแก่น: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2544.
- มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา. “รางจืด” สมุนไพรใช้ถอนพิษ. สมุนไพรเพื่อสุขภาพ 2548; 5: 93-94.
- วิวรรธน์ วิสิฐพงศ์พันธ์. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำสกัดใบรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) ในหนูขาว [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพิษวิทยา]. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2545.

- สกุลรัตน์ อุษณาวรรค์, ธานี เทศศิริ, ปราโมทย์ มหคุณากร, สุพัตรา ประสุพัฒนา. ผลของรังสีดต่อการลดพิษพาราควอด. ว. วิจัย มข. 2543; 5(1): 11-17.
- สุรีย์ ศุภลักษณ์นารี. การแยกสกัดสารที่เป็นองค์ประกอบหลักจากสมุนไพรรางจืดชนิดต่าง ๆ โดยวิธีทางเคมี. รายงานการวิจัย. ปทุมธานี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต; 2542.
- Abbott FV, Ocivirk R, Najafee R, Franklin KBJ. Improving the efficiency of the formalin test. **Pain** 1999; 83: 561-569.
- Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. **Curr Rheumatol Rep** 2001; 3(6): 535-541.
- Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. **Biochim Biophys Acta** 1991; 1072(1): 63-80.
- Chan EWC, Lim YY. Antioxidant activity of *Thunbergia laurifolia* tea. **Journal of tropical forest science** 2006; 18(2): 130-136.
- Chanani NK, Cowan DB, Takeuchi K, Poutias DN, Garcia LM, del Nido PJ, McGowan FX Jr. Differential effects of amrinone and milrinone upon myocardial inflammatory signaling. **Circulation** 2002; 106 (12 Suppl 1): I284-I289.
- Chanawirat A. **Protective effect of *thunbergia laurifolia* extract on ethanol-induced hepatotoxicity in mice** [Master Thesis in Toxicology]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University; 2000.
- Charumanee S, Taesotikul T, Netisingha W, Sirisaard P, Leelapornpisit P. Topical anti-inflammatory preparation from *Thunbergia laurifolia* Linn. In **Pharma Indochina II**; October 2001: p. 20-23.
- Claria J. Cyclooxygenase-2 biology. **Curr Pharm Des** 2003; 9(27): 2177-2190.
- Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology** 1968; 32(2): 295-310.
- Daud A, Habib N, Sanchez Riera A. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. **Journal of Ethnopharmacology** 2006; 108(2): 198-203.
- Delporte C, Backhouse N, Inostroza V, Aguirre MC, Peredo N, Silva X. et al. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 112(1): 162-165.

- Franklin GF, Coghill G, McIntosh L, Cree IA. Monocyte aggregation around agarose beads in collagen gels; a 3-dimensional model of early granuloma formation. **Journal of immunological methods** 1995; 186(2): 285-291.
- Griffiths MM, Langone JJ, Lightfoote MM. Biomaterials and granulomas. **A companion to methods in enzymology** 1996; 9(2): 295-304.
- Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93(8): 3308-3312.
- Gomig F, Pietrovski EF, Guedes A, Dalmarco EM, Calderari MT, Guimarães CL, Pinheiro RM, Cabrini DA, Otuki MF. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology** 2008; 118(2): 220-224.
- Gonzalez-Trujano ME, Pena EI, Martinez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Deciga-Campos M. et al. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 111(3): 476-482.
- Hougee S, Sanders A, Faber J, Graus YMF, Berg WB, Garssen J. et al. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon *in vitro* incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. **Biochemical Pharmacology** 2005; 69(2): 241-248.
- Hunnskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 1987; 30: 103-114.
- Hwang PA, Chien SY, Chan YL, Lu MK, Wu CH, Kong ZL, Wu CJ. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses by *Sargassum hemiphyllum* Sulfated Polysaccharide Extract in RAW 264.7 Macrophage Cells. **J Agric Food Chem** 2011; 59(5): 2062-2068.
- Intahphuak S, Panthong A, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Reutrakul, V. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Mallotus sporocarpus* Airy Shaw. **Journal of Ethnopharmacology** 2004; 90(1): 69-72
- Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. *Atractylodes japonica* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. **Biol. Pharm. Bull.** 2004; 27(3): 324-327.

- Jantaratnotai N, Utaisincharoen P, Piyachaturawat P, Chongthammakun S, Sanvarinda U. Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. **Life Sciences** 2006; 78(6): 571-577.
- Kale M, Misar AV, Dave V, Joshi M, Mujumdar AM. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 112(2): 300-304.
- Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia*. **Phytochemistry** 2002; 60(8): 769-771.
- Kim RG, Shin KM, Kim YK, Jeong HJ, Ha J, Choi JW. et al. Inhibition of methanol extract from the aerial parts of *Saururus chinensis* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production from murine macrophage RAW 264.7 cells. **Biol Pharm Bull** 2003; 26(4): 481-486.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester Tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J Biol Chem** 1991; 266(20): 12866-12872.
- Khunkitti W, Taweekaisupapong S, Aromdee A, Pesee M. **Antimicrobial activity of *Thunbergia Laurifolia* crude extract.** In: Proceedings of the 3rd World Congress on Medicinal Plant and Aromatic Plants for Human Welfare; Chiangmai, Thailand, February; 2003. p. 3-7.
- Laupattarakasem P, Wangsrimongkol T, Surarit R, Hahnvajanawong C. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory potential of *Cryptolepis buchanani*. **Journal of Ethnopharmacology** 2006; 108(3): 349-354.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. et al. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis** 1999; 20(10): 1945-1952.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval, P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW. et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90(20): 9730-9734.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol** 1997; 15: 323-350.

- Metwali A, Elliott D, Blum A, Weinstock JV. What models of granulomatous inflammation provide the immunologist. **A companion to methods in enzymology** 1996; 9(2): 305-310.
- Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality *in vivo* and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. **J Immunol** 2007; 179(10):7121-7127.
- Panthong A, Norkaew P, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Anantachoke N, Reutrakul V. et al. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboge from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 111(2): 335-340.
- Perianayagam JB, Sharma SK, Pillai KK. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology** 2006; 104(3): 410-414.
- Pramyothin P, Chirdchupunsare H, Runsipipat A, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective ctivity of *Thunbergia laurifolia* Linn. extract in rats treated with ethanol: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology** 2005; 102(3): 408-411.
- Purnima M, Gupta PC. Colouring matters from the flowers of *Thunbergia laurifolia*. **Journal of Indian Chemistry Society** 1978; 55(6): 622-23.
- Raj PP, Editor. **Pain Medicine: A Comprehensive Review**, 1st ed. Missouri: Mosby-Year Book, 1996; p. 12-23.
- Raso GM, Meli R, Carlo GD, Pacilio M, Carlo RD. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sciences** 2001; 68(8): 921-931.
- Sanchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Hernandez-Perez M, Rabanal RM. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. **Journal of Ethnopharmacology** 2006; 107(1): 1-6.
- Shanahan JC and Clair E. Tumor necrosis factor- α blockade: A novel therapy for rheumatic disease. **Clinical Immunology** 2002; 103: 231-42.

- Shin KM, Kim YH, Park WS, Kang I, Ha J, Choi JW. et al. Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin [correction of prostagladin] E₂, and tumor necrosis factor- α production from murine macrophage RAW 264.7 cells. **Biol Pharm Bull** 2004; 27(4): 538-543.
- Smolinski AT, Pestka JJ. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production *in vitro* and *in vivo* by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). **Food and Chemical Toxicology** 2003; 41(10): 1381-1390.
- Srida C, Hankete J, Khunkitti W, Aromdee C, Pese M. Antioxidant activity of *Thunbergia Laurifolia* ethanol extract. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences** 2002; p. 26.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 1992; 51: 5-17.
- Tejasen P, Thongthapp C. The study of the insecticide antitoxicity of *Thunbergia laurifolia* Linn. **Chiang Mai Bulletin** 1979; 19: 105-114.
- Thongsaard W, Marsden CA. A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on *in vitro* rat strial dopamine release. **Neuroscience Letters** 2002; 329(2): 129-132.
- Witaicenis A, Roldao EF, Seito LN, Rocha NP, Di Stasi LC. Pharmacological and toxicological studies of *Drimys angustifolia* Miers. (Winteraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 111(3): 541-546.
- Wu Y, Zhou C, Song L, Li X, Shi S, Mo J. et al. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. **Journal of Ethnopharmacology** 2006; 108(2): 243-250.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. **Pain medicine** 2002; 94: 962-967.
- Yin W, Wang TS, Yin FZ, Cai BC. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*. **Journal of Ethnopharmacology** 2003; 88(2-3): 205-214.
- Young HW, Luo YL, Cheng HW, Hsieh WC, Liao JC, Peng WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. **Journal of Ethnopharmacology** 2005; 96(1-2): 207-210.

Zeilhofer HU, Prostanoids in nociception and pain. **Biochem Pharmacol** 2007; 73(2): 165-174.

Zuoqi D, Yue D, Haiping H, Rong P, Xiujuan Y, Zhengtao W. Anti-Inflammatory Effects of Scopoletin and Underlying Mechanisms. **Pharmaceutical Biology** 2008; 46(12): 854–860.