



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในห้องปฏิบัติการจาก
สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติพืชสกุล Piper

STUDY OF IN VITRO ANTI-INFLAMMATION OF
NATURAL PRODUCTS FROM PIPER SPP.

โดย นันทนา อรุณฤกษ์

กรกฎาคม พ.ศ.2554

Project Code: RMU 5180003

Project Title: Anti-inflammation activities of Piperine and amide compounds on *in vitro* LPS-induced cells

Investigator: Nuntana Aroonrerk, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok

Apichart Suksamrarn, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok

Bunak Yingyongnarongkul, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok

Saowanee kumpun, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok

E-mail Address: nuntana@swu.ac.th

Project Period: May 15, 2008-May 14, 2011

Abstract

Piperine and related compounds, main components of *Piper nigrum* Linn., is a plant with a long history of medical use. Piperine exhibits anti-inflammatory activity; however, the underlying mechanism remains unknown. We examined the *in vitro* effects of piperine on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in human gingival fibroblasts and macrophage cell line U937. Piperine inhibited the production of PGE₂ and total COX activity from LPS-induced cells but not of interleukin (IL)-6. But 2 related piperine compounds were shown to inhibit IL-6, PGE₂ and total COX activity from both types of cells. Piperine is an amide compound, we then synthesized 79 amide compounds and tested. We found that 3 of those compounds were shown to have high activity by inhibited the production of IL-6, PGE₂ and total cox activity. But they could not inhibit IL-6 production from macrophage cell line. These results suggest that piperine and some amide compound structure inhibits the production of IL-6, PGE₂ and total cox activity from LPS-induced human gingival fibroblasts and macrophage cell line.

Keywords: IL-6, PGE₂, human gingival fibroblasts, inflammation

รหัสโครงการ: RMU 5180003

ชื่อโครงการ:ฤทธิ์ต้านการอักเสบของ *Piperine* และสารกลุ่มเอไมด์หลังกระตุ้นเซลล์ด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ในห้องปฏิบัติการ

ชื่อนักวิจัย: นันทนา อรุณฤกษ์ ภาควิชาโณษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
เสาวนีย์ คำพันธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

E-mail Address: nuntana@swu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 พฤษภาคม 2551-14 พฤษภาคม 2554

บทคัดย่อ

สารกลุ่ม piperine เป็นสารหลักของพืช *Piper nigrum* Linn. ซึ่งเป็นพืชที่มีการนำมาใช้ทางการแพทย์มานาน piperine มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกแน่นอน ดังนั้น เราได้ทำการศึกษาผลของสาร piperine ต่อเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ในห้องปฏิบัติการ เซลล์ที่ใช้คือ เซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก และเซลล์ไลน์มาโครฟาจ U937 ผลการทดสอบพบว่า สาร piperine มีผลในการยับยั้งการผลิต PGE_2 และ total COX activity จากเซลล์หลังกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ แต่ไม่ยับยั้งการผลิต IL-6 ส่วนสารสกัดกลุ่มเดียวกับ piperine อีก 2 ชนิด นั้น สามารถยับยั้งทั้ง IL-6, PGE_2 และ total COX activity จากเซลล์ทั้ง 2 ชนิด เนื่องจาก piperine เป็นสารกลุ่มเอไมด์ เราได้ทำการสังเคราะห์สารกลุ่มเอไมด์ทั้งหมด 79 ชนิด นำมาทดสอบเช่นเดียวกัน พบสารกลุ่มเอไมด์ 3 สาร ที่มีผลด้านการผลิต IL-6, PGE_2 และ total cox activity แต่สารเอไมด์ทั้ง 3 สาร ไม่ยับยั้งการผลิต IL-6 จากเซลล์ไลน์มาโครฟาจเลย จากผลการทดสอบเหล่านี้ ทำให้ทราบว่า สาร piperine และสารเอไมด์มีฤทธิ์ต้านการผลิต IL-6, PGE_2 และ total cox จากเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือกและเซลล์ไลน์มาโครฟาจหลังกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์

Keywords: IL-6, PGE_2 , human gingival fibroblasts, inflammation

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ ดร.เสาวณีย์ คำพันธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ที่ให้ความช่วยเหลือในการแยกสารสกัด สารสกัดแยกส่วน และสารบริสุทธิ์ ตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปี 2551 ในการให้ดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

นันทนา อรุณฤกษ์

บทนำ

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่มากระตุ้นด้วยระบบภูมิคุ้มกัน สาเหตุอาจเกิดได้จากการกระทบกระแทก ภูมิแพ้ การติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันทำร้ายตัวเอง ปัจจุบันโรคที่ทำให้มีการอักเสบในช่องปากมีเพิ่มมากขึ้น เช่น แผลร้อนใน โรคปริทันต์ โรคไลเคนพลาเนีย และการติดเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก อาการของโรคเหล่านี้จะรุนแรงมากในผู้ที่อยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ฮีโมโกลินผิดปกติ และผู้ที่มีอาการผิดปกติกับระบบเลือด เป็นต้น ผู้ป่วยบางรายเป็นเรื้อรังและมีการอักเสบในช่องปากเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าจะทำการรักษาอย่างถูกวิธี รวมทั้งการได้รับยาปฏิชีวนะ ผู้ป่วยเหล่านี้ต้องรับประทานยาปฏิชีวนะ ติดต่อกันเป็นเวลานาน เพื่อไม่ให้เกิดการลุกลามของรอยโรค หรือเพื่อให้พ้นจากระยะเรื้อรัง หรือเพื่อไม่ให้เกิดอาการซ้ำ การรับประทานยาปฏิชีวนะนาน ๆ อาการข้างเคียง ได้แก่ การแพ้ยา การรบกวนระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรียภายในร่างกาย และการใช้ยาแก้อักเสบที่ออกฤทธิ์กว้างบางตัว จะไปทำลายเชื้อโรคในช่องคลอด ลำไส้ หรือ ปาก ทำให้เกิดตกขาวจากเชื้อรา, ท้องเสีย, เชื้อราขึ้นในช่องปาก เป็นต้น

ในกระบวนการหรือเส้นทางการอักเสบ เกิดจากการสร้าง prostaglandins (PGs) ซึ่งต้องอาศัย เอนไซม์ cyclooxygenase [1] ในร่างกายมนุษย์ มี COX อยู่ 2 ชนิด ชนิดแรก เป็นเอนไซม์ COX ที่ถูกสร้างและทำงานในภาวะปกติให้ PGs ทำหน้าที่รักษาภาวะทางสรีรวิทยาของร่างกาย (homeostasis) เรียกเอนไซม์ COX ในรูปแบบนี้ว่า COX-I (constitutive isoform) ชนิดที่ 2 -เป็นเอนไซม์ที่สร้างเมื่อถูกกระตุ้นจากพยาธิสภาพในร่างกาย เช่น การอักเสบ เรียกว่า COX-2 (inducible isoform) ระบบหลังนี้ในภาวะปกติเกือบตรวจพบไม่ได้เลย ยกเว้นในบางเนื้อเยื่อ เช่น สมอง ปัจจุบันยาลดการอักเสบ เป็นยาที่ลดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในขบวนการที่จะทำให้เกิดการอักเสบ โดยการหยุดยั้งขั้นตอนหนึ่งในขบวนการสร้าง PGs ยากลุ่มนี้มีชื่อเรียกว่า Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs หรือเขียนย่อว่า NSAIDs บทบาทของยากลุ่มนี้ โดยทั่วไป ใช้รักษา ข้ออักเสบ กล้ามเนื้ออักเสบ แต่ก็มีผลข้างเคียง เช่น การระคายเคืองในกระเพาะอาหาร ลำไส้ ทำให้เกิดแผล มีนิ่ว มีเลือดในปัสสาวะ หรือลมพิษ ถ่ายเหลว หรือ ท้องผูกก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ยา NSAIDs ที่ใช้กันในตลาด จะทำการยับยั้งทั้งการทำงานของ COX-I และ COX-2 ดังนั้นจึงปรากฏผลเสมอว่า นอกจากรักษาหรือลดอาการอักเสบจากโรค โดยยับยั้งการทำงานของ COX-2 แล้ว ยังก่อผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่อปกติโดยยับยั้งการทำงานของ COX-I

โดยทั่วไปในการรักษาการอักเสบในช่องปาก เช่น โรคปริทันต์ ทันตแพทย์ส่วนใหญ่ไม่นิยมทำการรักษาแบบเฉพาะที่ เช่น การใช้เจลที่มีตัวยาต้านการอักเสบใส่ในร่องลิ้นปริทันต์ ซึ่งจะทำหลังจากขจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกและใต้เหงือก แต่เนื่องจากเจลต่าง ๆ ที่มีใช้ในท้องตลาดมีราคาแพงมาก ไม่คุ้มกับค่ารักษาดังนั้นในการรักษาจะเน้นการผ่าตัดขึ้นเนื้อที่อักเสบออก รักษารากฟัน พร้อมทั้งรับประทานยาปฏิชีวนะไปด้วย และรอให้แผลผ่าตัดหาย หรือถ้าเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันถูกทำลายมาก อาจต้องทำการถอนฟันหรือรักษาการอักเสบ ดังนั้นถ้ามีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารที่พบในพืชสกุล *Piper* หรือสารสังเคราะห์ที่เลียนแบบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่มีศักยภาพในการต้านการอักเสบ อาจเป็นการเริ่มต้นเพื่อการพัฒนาไปสู่การ

หาผลิตภัณฑ์ทางยาในการรักษาการอักเสบในช่องปากแบบเฉพาะที่ เช่น โรคมปริทันต์ แผลร้อนใน แผลอักเสบจากการติดเชื้อ หรือการรักษาการอักเสบในช่องปากทางระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการต้านการอักเสบของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากพืชสกุล *Piper* หรือสารสังเคราะห์ที่เลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จำนวน 2-3 ชนิด

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

การติดเชื้อในกระแสเลือดและภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock) เป็นผลมาจากการผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากผลของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อส่วนประกอบของแบคทีเรียที่สำคัญคือ ลิโปโพลีแซคคาไรด์ ลิโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นให้เซลล์มาโครฟาจผลิตไซโตไคน์ต่าง ๆ และ eicosanoids ในการตอบสนองต่อการกระตุ้นการกระตุ้นด้านการอักเสบ รวมทั้ง prostaglandin (PGs)[2] เซลล์สำคัญที่มีบทบาทในการผลิต PGs ในระหว่างที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดคือ มาโครฟาจ หลังจากที่มาโครฟาจได้รับการกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ เซลล์เหล่านี้จะผลิต PGs โดยเฉพาะ PGE₂ และ proinflammatory cytokine อื่น ๆ ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันแบบ autocrine หรือ paracrine [3]

เอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ PG คือ เอนไซม์ prostaglandin endoperoxidase H synthase (cyclooxygenase or COX) ซึ่งมีอยู่ 2 isomers คือ COX-1 และ COX-2 [4] เอนไซม์ COX-1 เป็น constitutive isoform ที่มีการสร้างตลอดเวลา พบในเนื้อเยื่อหลายชนิด มีบทบาทในการสังเคราะห์ PG ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการไหลเวียนของเลือดในไต และการทำงานของเกล็ดเลือด [5] COX-2 เป็น inducible isoform เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ผลิตขึ้นหลังจากได้รับการกระตุ้นระดับเซลล์โดยลิโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรีย [5] และเมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหนือกได้รับการกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถชักนำให้สร้าง COX-2 ได้ [6-8] Tippon และคณะ (ค.ศ.2003) พบว่า COX-2 inhibitors อาจมีบทบาทในการควบคุมการผลิต IL-6 และ PGE₂ ในผู้ป่วยโรคปริทันต์ได้ ปัจจุบัน COX-2 inhibitor หมายถึงสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของ COX-2 isoform โดยไม่มีผลกระทบต่อ COX-1 isoform ยา NSAID โดยทั่วไปยับยั้งการสังเคราะห์ PG โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ COX-2 เป็นการยับยั้งการอักเสบ แต่ความสามารถในการยับยั้ง COX-1 อาจมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการได้ [9, 10]

ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์หนึ่งของ mesenchymal cells ที่ถูกควบคุมการทำงานโดยไซโตไคน์ที่ผลิตโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ขณะเดียวกันเซลล์ไฟโบรบลาสต์เองก็ผลิตไซโตไคน์ด้วย ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นส่วนหนึ่งของ cytokine network ที่มีบทบาทในการทำให้เกิดการอักเสบเฉพาะที่ IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่มีความสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบโดยทำให้เกิดการละลายของกระดูก โดยกระตุ้นให้มีการชุมนุมและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ osteoclast [11-14] มีรายงานของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิด refractory periodontitis มีระดับ IL-6 ในน้ำเหลืองเหนือกในปริมาณสูง [13] และพบ IL-6 mRNA เพิ่มขึ้นในรอยโรค [15, 16] Takahashi et al. [17] รายงานว่า เซลล์เอนโดทีเลียล เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และมาโครฟาจ มีบทบาทในขบวนการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์โดยการผลิตไซโตไคน์ IL-6 โดยเฉพาะรายงานการผลิตไซโตไคน์ IL-6 จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคนปกติ [18] นอกจากนี้ลิโปโพลีแซคคาไรด์ของ *A. actinomycetemcomitans* และ *E. coli* กระตุ้นให้เซลล์ไฟ

โบริบลาสเหงือกของคนปกติและผู้ป่วยหลัง IL-6 [18-20] เชื่อเหล่านี้ไม่เพียงแต่ทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์โดยตรง แต่ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิต mediators และไซโตไคน์เช่นกัน [21-23]

ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ในการต้านการอักเสบมากมาย ได้แก่ การนำว่านหางจระเข้ใช้ในการรักษาแผลไฟไหม้ [24, 25] สมุนไพรจิงขี้ขี้ COX-2 [26] สาร genistein ซึ่งสกัดได้จากชาเขียว มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ PGE_2 ได้เช่นเดียวกับสาร pyenogenol ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากเมล็ดองุ่น [27] การใช้ Cat's claw ในการยับยั้งการอักเสบโดยมีฤทธิ์ด้านการทำงานของ NF- κ B ในการต้านการอักเสบในโรคข้ออักเสบ สำหรับพืชสกุล *Piper* ได้แก่ ชะพลู พริกไทยดำ สำหรับพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการเพิ่มการทำงานของ เอนไซม์ β -glucuronidase ในลำไส้ การย่อยพริกไทยดำนั้นสามารถลดระดับของเอนไซม์ mucinase ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ได้ [28] นอกจากนี้ยังลดอาการเจ็บปวด แก้อาการปวด และรักษาโรคผิวหนัง สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบ ได้มีการศึกษาจากสารสกัดเอธานอลของ *Piper* พบว่า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากการทดสอบโดย auricle swelling ที่ได้รับการกระตุ้นโดย xylene [29] ยับยั้งการผลิต nitric oxide [30] และลดการบวมในอุ้งเท้าหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย carrageenan [31] อย่างไรก็ตาม การนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใช้ในการต้านการอักเสบ ยังไม่แพร่หลายนัก ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ที่เลียนแบบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชสกุล *Piper* ที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ PGE_2 , COX-2 และ IL-6 จากเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือกและเซลล์มาโคฟาจ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยลิโพโพลิแซคคาไรด์ โดยเปรียบเทียบกับสารทดสอบกับ NS-398 ซึ่งเป็น COX-2 inhibitor และ prednisolone ที่เป็น IL-6 inhibitor ทั้งนี้ สารที่ได้ อาจเป็นอีกทางเลือกในการนำมาใช้ในพัฒนาไปสู่การนำไปใช้เพื่อลดการอักเสบทั้งในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์หรือโรคติดเชื้ออื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีผลข้างเคียงเกิดขึ้นน้อยที่สุด

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ขั้นตอนการเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช *Piper* และสารเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เตรียมจากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ทดสอบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสจากเนื้อเยื่อเหงือกเป็นวิธี standard method [32] เตรียมเซลล์โดยการขูดเนื้อเยื่อเหงือกที่ติดมากับฟันที่ถูกถอนแล้ว มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้ววางลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร นำ cover slip ปลอดเชื้อวางทับ เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อเหงือกเคลื่อนย้าย จนกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจะคลานออกจากชิ้นเนื้อ เซลล์ไฟโบรบลาสที่ใช้ในการทดลองมาจากเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในรุ่นที่ 3-10 อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นชนิด DMEM ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum ร้อยละ 10 และเพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินซัลเฟตอย่างละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะถูกเลี้ยงภายในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นประจำทุกสัปดาห์จนกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจะเพิ่มจำนวนให้เห็น หลังจากนั้นใส่ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ร้อยละ 0.05 เพื่อแยกเซลล์ให้หลุดจากกันและหลุดจากจานเลี้ยง เพื่อเพิ่มจำนวนหรือขยายปริมาณเซลล์เพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงแบบนี้จนกระทั่งถึงขั้นตอนนำเซลล์มาทดสอบ

สำหรับเซลล์ไลน์มาโครฟาจ U937 เพาะเลี้ยงใน RPMI medium ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum ร้อยละ 10 และเพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินซัลเฟตอย่างละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนทดสอบ ใส่สาร PMA 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปเพื่อให้เซลล์เป็นมาโครฟาจ และเกาะติดอยู่กับ จานเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารและ DMSO ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

การทดสอบนี้ได้ถูกอธิบายโดย Denizot และ Lang ในปี ค.ศ. 1986 [33]

4. การทดสอบความสามารถของเซลล์ในการผลิต IL-6 หลังกระตุ้นด้วยลิโพโพลีแซคคาไรด์

นำเซลล์ไฟโบรบลาสเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใน 96 well-plate ที่ความหนาแน่น 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย ดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ไม่มีซีรัม 1 ครั้ง หลังจากนั้น ใส่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี หรือ ไม่มีลิโพโพลีแซคคาไรด์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1- 48 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ทำการทดสอบปริมาณ IL-6, PGE₂, COX II

6. การวัดปริมาณ IL-6

การวัดปริมาณ IL-6 จากน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำได้โดยวิธี ELISA ตามวิธีของ Shirai และคณะ [34]
สำหรับการวัดปริมาณ PGE2 และ COX II ใช้ ELISA test kits

ผลการทดลอง

1. การเตรียมสารบริสุทธิ์จากพืชสกุล *Piper* ซึ่งเป็นการดำเนินงานโดยกลุ่ม ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ

ในการดำเนินงาน โดยกลุ่มของ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ตั้งแต่ เดือน พฤษภาคม 2551 – เมษายน 2552 นั้น ได้ทำการแยกขณะนี้ได้สารสกัดหยาบ 3 ตัวอย่าง สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ (สารธรรมชาติ 5 ตัวอย่าง สารสังเคราะห์ที่เลียนแบบสารสกัดธรรมชาติจำนวน (สารสังเคราะห์) 79 สาร

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหงือกและคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ที่เหมาะสมนั้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากแต่ละบุคคล หรือแต่ละรุ่น มีความสามารถในการผลิต PGE_2 และ IL-6 ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เมื่อได้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมแล้ว จะทำการแช่แข็งไว้ใน liquid nitrogen เพื่อรอการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาจากเนื้อเยื่อเหงือก ในช่วงเวลา 6 เดือนที่ผ่านมา ได้ขึ้นเนื้อเหงือกทั้งสิ้น 50 ชิ้น แต่ในการทำการเพาะเลี้ยง พบว่า ส่วนใหญ่ติดเชื้อ และบางชิ้นหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 1 สัปดาห์แล้ว ก็ยังไม่สามารถทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์คลานออกมาจากชิ้นเนื้อ อาจเป็นเพราะการหั่นชิ้นเนื้อและการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินยังไม่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์แยกออกมาจากชิ้นเนื้อใหญ่ได้มากพอ หรือชิ้นเนื้อไม่สมบูรณ์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามได้เซลล์ไลน์ที่ทำการทดสอบเบื้องต้นว่า ไม่สร้าง IL-6 ในภาวะปกติ หรือยังไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยลิโพโพลิแซคคาไรด์ จำนวนที่พร้อมทำได้ถึง 10 ไลน์ ขณะเดียวกันเราก็ยังทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มเติมตลอดเวลา เพราะ แต่ละไลน์สามารถใช้ได้ประมาณ 8-10 passages เท่านั้น

สำหรับเซลล์ไลน์มาโครฟาจ U937 ก็ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบความเป็นพิษก่อนที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการสร้าง IL-6, PGE_2 และ COX-2 ต่อไป

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

จากสารทดสอบทดสอบทั้งหมดขณะนี้มียู่ 88 สาร ส่วนใหญ่ไม่มีความเป็นพิษ โดยพบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มาโครฟาจเลย สำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ก็มีความเป็นพิษบ้างแต่ไม่มาก มีความเป็นพิษเพียงร้อยละ 10-15 และมีจำนวนเพียง 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 14.77 ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 1

ดังนั้นสารทั้งหมดจึงสามารถนำไปใช้ในการทดสอบต่อไปได้

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสารทดสอบที่มีความเป็นพิษและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 2 ชนิด

สารทดสอบ	จำนวนสารทั้งหมด	จำนวนสารที่มีความเป็นพิษ/จำนวนสารที่ไม่มีความเป็นพิษ	
		เซลล์ไฟโบรบลาสต์	เซลล์ไลน์มาโครฟาจ
สารสกัดหยาบ	3	0/3	0/3
สารธรรมชาติ	6	1/5	0/6
สารสังเคราะห์	79	12/67	0/79
รวม	88	13/75	0/88

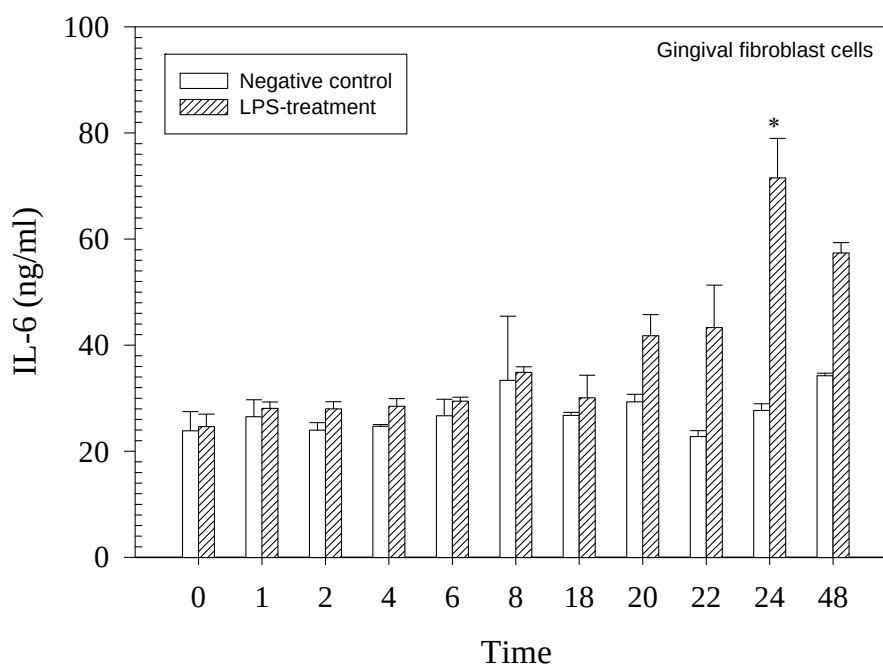
4. การทดสอบผลของลิโปโพลิแซคคาไรด์ต่อการผลิต IL-6 ของเซลล์

4.1 เซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก

ในการทดสอบนำเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือกจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงใน 96-well plate หลังจากนั้น ใส่สารลิโปโพลิแซคคาไรด์ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่เวลาต่างกันจาก 1 - 48 ชั่วโมง นำ supernatant มาหาปริมาณ IL-6 ผลแสดงในตารางที่ 2 และกราฟ รูปที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงผลของลิโปลิแซคคาไรด์ต่อการผลิต IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก

Time (hr)	Negative Control		Lipopolysaccharide	
	Mean	SE	Mean	SE
0	23.855	3.612	24.655	2.327
1	26.509	3.200	28.073	1.212
2	23.964	1.430	28.000	1.333
4	24.691	0.315	28.473	1.455
6	26.691	3.103	29.455	0.727
8	33.345	12.097	34.873	1.067
18	26.764	0.558	30.073	4.242
20	29.309	1.406	41.745	4.024
22	22.764	1.115	43.309	8.000
24	27.673	1.285	71.527	7.467
48	34.255	0.436	57.345	1.988



รูปที่ 1 แสดงผลของลิโปลิแซคคาไรด์ต่อการผลิต IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก

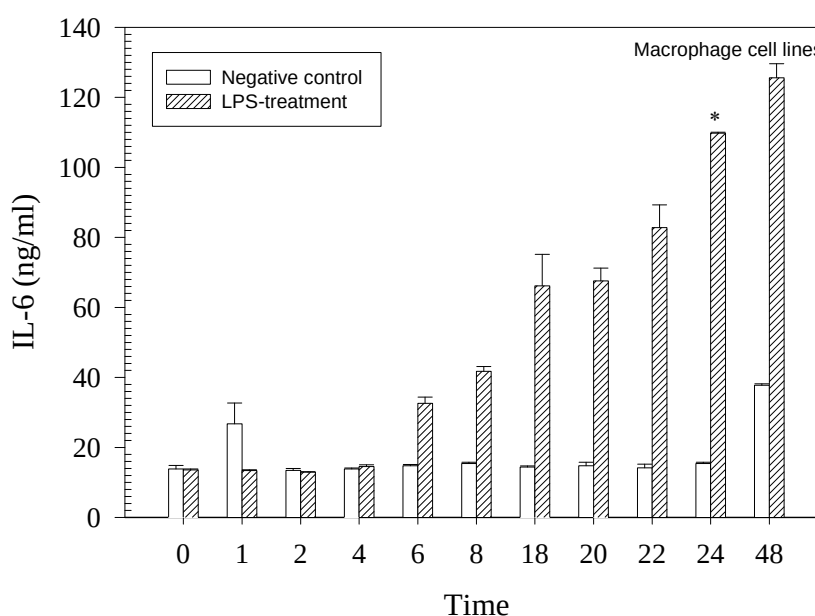
จากกราฟ จะพบว่า สารลิโปลิแซคคาไรด์ที่สามารถกระตุ้นให้สร้างได้สูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส นาน 24 ชั่วโมง

4.2 การทดสอบผลของลิโปลิแซคคาไรด์ต่อการผลิต IL-6 ของเซลล์ไลน์มาโครฟาจ

ในการทดสอบนำเซลล์ไลน์มาโครฟาจจำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงใน 96-well plate หลังจากนั้นใส่สาร PMA เพื่อให้เซลล์เกาะจานเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 3 วัน หลังจากนั้น จึงใส่สารลิโปลิแซคคาไรด์ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่เวลาต่างกันจาก 1 - 48 ชั่วโมง นำ supernatant มาหาปริมาณ IL-6 ผลแสดงในตารางที่ 3 และกราฟ รูปที่ 2

ตารางที่ 3 แสดงผลของลิโปลิแซคคาไรด์ต่อการผลิต IL-6 ของเซลล์ไลน์มาโครฟาจ

Time (hr)	Negative Control		Lipopolysaccharide	
	Mean	SE	Mean	SE
0	13.855	15.600	13.564	0.242
1	26.727	13.527	13.382	0.242
2	13.418	14.400	12.945	0.097
4	13.855	13.418	14.545	0.461
6	14.727	14.727	32.582	1.794
8	15.382	14.727	41.745	1.358
18	14.400	14.509	66.145	8.994
20	14.727	16.473	67.527	3.709
22	14.182	17.018	82.764	6.497
24	15.382	14.945	109.782	0.242
48	37.745	38.182	125.600	3.976



รูปที่ 2 แสดงผลของลิโปลิแซคคาไรด์ต่อการผลิต IL-6 ของเซลล์ไลน์มาโครฟาจ

จากกราฟ จะพบว่า สารลิโปโพลิแซคคาไรด์ที่สามารถกระตุ้นให้สร้างได้สูงขึ้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มาโครฟาจนานขึ้น แต่พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสม เพราะค่า negative control น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ เมื่อบ่มเพาะนาน 48 ชั่วโมง

5. ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 และ PGE₂ จากสารทดสอบ

5.1 ผลการทดสอบของสารทดสอบต่อการผลิต IL-6 และ PGE₂ ในเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 และ PGE₂ จากสารทดสอบ โดยเซลล์ไฟโบรบลาส

กลุ่มสาร	IL-6 (ng/ml)	% control (IL-6 production)	PGE ₂ Production (pg/ml)	% Control (PGE ₂ Production)
Neg. control	51.01 ± 0.01	11.93 ± 0.01	10	1.11
LPS-induced	427.33 ± 2.11	100 ± 2.11	900	100
Crude 862	408.83 ± 3.01	55.15 ± 3.01	140	15.56
Crude 863	216.67 ± 1.82	50.70 ± 1.82	64	7.11
Crude 864	340.67 ± 2.17	79.72 ± 2.17	30	3.33
Pure 865	244.67 ± 3.01	57.25 ± 3.01	0	0
Pure 867	587.67 ± 5.21	137.33 ± 5.21	560	61.1
Pure 868	419.33 ± 5.01	98.12 ± 5.01	120	13.32
Pure 869	214.48 ± 2.17	76.06 ± 2.17	0	0
BYNA 870 (Piperine)	417.35 ± 4.01	98.08 ± 4.01	30	3.33

พบว่า ผลการยับยั้งการผลิต IL-6 ของ สารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน นั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ได้ดี จึงนำสารบริสุทธิ์ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ มาแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป โดยได้ทำการทดสอบ ทั้งฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6, PGE₂ ด้วย โดยทำการทดสอบทั้งเซลล์ ไฟโบรบลาสเหงือก ดังแสดงในตารางที่ 4

นอกจากนี้ ทางห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มีความเห็นว่า สารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดจากพืชโดยตรงนั้น มีน้อยมาก เลยทำการสังเคราะห์สารอนาล็อก ที่มีโครงสร้างคล้าย piperine เพิ่มเติม และนำมาทดสอบ ผลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 และ PGE₂ จากสารสังเคราะห์โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์

กลุ่มสาร	% control (IL-6 production)	% Control (PGE ₂ Production)
Neg. control	11.93 ± 0.14	1.11
LPS-induced	100	100
BYNA 891	99.09 ± 0.31	98.53
BYNA 892	73.58 ± 0.11	20.00
BYNA 893	84.01 ± 0.12	89.72
BYNA 894	67.40 ± 0.22	15.63
BYNA 895	70.80 ± 0.12	30.5
BYNA 896	82.03 ± 0.32	87.32
BYNA 897	77.83 ± 0.13	50.13
BYNA 898	85.71 ± 0.68	87.56
BYNA 899	112.87 ± 0.83	100.31
BYNA 900	97.62 ± 0.48	99.95
BYNA 901	93.25 ± 0.61	95.41
BYNA 902	86.45 ± 0.28	89.74
BYNA 903	87.87 ± 0.72	88.63
BYNA 904	76.36 ± 0.92	57.13
BYNA 905	94.84 ± 0.17	100.04
BYNA 906	90.65 ± 0.21	98.93
BYNA 907	94.50 ± 0.13	99.05
BYNA 908	85.43 ± 0.35	87.92
BYNA 909	99.55 ± 0.21	100.32
BYNA 910	92.91 ± 0.35	99.87
BYNA 911	83.67 ± 0.21	88.76
BYNA 912	76.17 ± 0.25	10.00
BYNA 913	80.44 ± 0.35	28.88
BYNA 914	88.61 ± 0.48	89.05
BYNA 915	85.98 ± 0.61	87.52

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 และ PGE₂ จากสารสังเคราะห์โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (ต่อ)

กลุ่มสาร	% control (IL-6 production)	% Control (PGE ₂ Production)
BYNA 916	138.43 + 0.18	101.82
BYNA 917	92.63 ± 0.35	94.23
BYNA 918	148.46 ± 0.22	102.35
BYNA 919	93.36 ± 0.42	95.32
BYNA 920	133.47 ± 0.35	100.62
BYNA 921	142.99 ± 0.98	96.53
BYNA 922	59.88 + 0.25	8.92
BYNA 923	98.00 + 0.37	99.23
BYNA 924	60.34 + 0.28	15.62
BYNA 925	99.23 + 0.81	100.62
BYNA 926	108.85 + 0.84	100.24
BYNA 927	75.08 + 0.23	43.22
BYNA 928	94.37 + 0.35	95.52
BYNA 929	127.94 + 0.15	100.02
BYNA 930	75.08 + 0.52	45.27
BYNA 931	72.57 + 0.51	58.49
BYNA 932	40.12 + 0.55	8.91
BYNA 933	82.96 + 0.21	89.20
BYNA 934	102.51 + 0.25	90.12
BYNA 935	66.07 + 0.65	39.83
BYNA 936	89.05 + 0.48	97.82
BYNA 937	116.17 + 0.61	100.82
BYNA 938	63.77 + 0.58	35.21
BYNA 939	70.42 + 0.25	37.63
BYNA 940	85.11 + 0.30	90.29
BYNA 941	76.51 + 0.82	43.94
BYNA 942	77.38 + 0.79	44.84

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 และ PGE ₂ จากสารสังเคราะห์โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (ต่อ)		
BYNA 943	64.84 ± 0.96	24.41
BYNA 944	100.15 ± 0.21	100.02
BYNA 945	108.80 ± 0.25	102.91
BYNA 946	48.87 ± 0.22	9.64
BYNA 947	75.03 ± 0.48	33.82
BYNA 948	70.47 ± 0.61	43.78
BYNA 949	78.15 ± 0.58	49.36

5.2 ผลการทดสอบของสารทดสอบต่อการผลิต IL-6 และ PGE₂ ในเซลล์ไลน์มาโครฟาจหลังกระตุ้นด้วย LPS

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 และ PGE₂ จากสารทดสอบ โดยเซลล์ไลน์มาโครฟาจ

กลุ่มสาร	IL-6 (ng/ml)	% control (IL-6 production)	PGE ₂ Production (pg/ml)	% Control (PGE ₂ Production)
Neg. control	127.67 ± 0.01	25.30 ± 0.01	8	0.89
LPS-induced	504.67 ± 1.11	100	450	100
Crude 862	490.64 ± 2.21	97.22 ± 2.21	122	5.36
Crude 863	487.79 ± 1.82	96.67 ± 1.82	32	3.13
Crude 864	532.68 ± 2.12	105.55 ± 2.12	22	2.11
BYNA 865	422.00 ± 3.01	83.62 ± 3.01	0	0
BYNA 867	518.35 ± 4.21	102.71 ± 4.21	270	21.32
BYNA 868	467.02 ± 4.01	92.54 ± 4.01	55	7.21
BYNA 869	532.02 ± 2.11	105.42 ± 2.11	0	0
BYNA 870 (Piperine)	487.64 ± 2.21	96.22 ± 2.21	14	1.23

พบว่า ผลการยับยั้งการผลิต IL-6 ของ สารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน นั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดี จึงนำสารบริสุทธิ์ ที่แยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบต่อไป และนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 แต่ในการทดสอบความสามารถในการผลิต PGE₂ โดยมาโครฟาจนั้น พบว่า หลังจากกระตุ้นเซลล์ มาโครฟาจด้วย ลิโปโพลีแซคคาไรด์แล้ว ผลิต PGE₂ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 จากสารสังเคราะห์โดยเซลล์ไลน์มาโครฟาจ

กลุ่มสาร	% control (IL-6 production)	กลุ่มสาร	% control (IL-6 production)
Neg. control	25.30 $\pm$ 0.15	BYNA 917	143.44 $\pm$ 0.32
LPS-induced	100	BYNA 918	141.41 $\pm$ 0.22
BYNA 891	88.38 $\pm$ 0.11	BYNA 919	162.64 $\pm$ 0.22
BYNA 892	90.36 $\pm$ 0.14	BYNA 920	135.26 $\pm$ 0.21
BYNA 893	95.44 $\pm$ 0.22	BYNA 921	126.71 $\pm$ 0.28
BYNA 894	95.31 $\pm$ 0.25	BYNA 922	128.81 $\pm$ 0.24
BYNA 895	95.38 $\pm$ 0.17	BYNA 923	124.16 $\pm$ 0.33
BYNA 896	91.81 $\pm$ 0.42	BYNA 924	147.41 $\pm$ 0.21
BYNA 897	101.19 $\pm$ 0.13	BYNA 925	132.63 $\pm$ 0.21
BYNA 898	101.98 $\pm$ 0.28	BYNA 926	135.86 $\pm$ 0.34
BYNA 899	106.21 $\pm$ 0.43	BYNA 927	139.91 $\pm$ 0.13
BYNA 900	99.06 $\pm$ 0.42	BYNA 928	135.03 $\pm$ 0.12
BYNA 901	96.17 $\pm$ 0.41	BYNA 929	127.68 $\pm$ 0.11
BYNA 902	92.01 $\pm$ 0.22	BYNA 930	118.15 $\pm$ 0.42
BYNA 903	92.40 $\pm$ 0.22	BYNA 931	118.90 $\pm$ 0.21
BYNA 904	99.67 $\pm$ 0.52	BYNA 932	115.30 $\pm$ 0.45
BYNA 905	93.92 $\pm$ 0.14	BYNA 933	120.56 $\pm$ 0.21
BYNA 906	92.40 $\pm$ 0.11	BYNA 934	115.83 $\pm$ 0.25
BYNA 907	103.83 $\pm$ 0.11	BYNA 935	123.11 $\pm$ 0.45
BYNA 908	100.40 $\pm$ 0.15	BYNA 936	127.23 $\pm$ 0.44
BYNA 909	95.71 $\pm$ 0.21	BYNA 937	121.31 $\pm$ 0.35
BYNA 910	93.53 $\pm$ 0.35	BYNA 938	120.03 $\pm$ 0.52
BYNA 911	95.90 $\pm$ 0.11	BYNA 939	118.00 $\pm$ 0.25
BYNA 912	92.87 $\pm$ 0.21	BYNA 940	116.88 $\pm$ 0.30
BYNA 913	89.50 $\pm$ 0.25	BYNA 941	114.85 $\pm$ 0.62
BYNA 914	96.50 $\pm$ 0.33	BYNA 942	121.31 $\pm$ 0.49
BYNA 915	147.49 $\pm$ 0.71	BYNA 943	120.48 $\pm$ 0.96
BYNA 916	127.16 $\pm$ 0.21	BYNA 944	120.48 $\pm$ 0.96

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 จากสารสังเคราะห์โดยเซลล์ไลน์มาโครฟาจ (ต่อ)			
กลุ่มสาร	% control (IL-6 production)	กลุ่มสาร	% control (IL-6 production)
BYNA 945	130.31 ± 0.25	BYNA 948	122.51 ± 0.21
BYNA 946	100.15 ± 0.21	BYNA 949	131.36 ± 0.33
BYNA 947	120.48 ± 0.32		

จากผลการทดสอบกับเซลล์มาโครฟาจ พบว่า สารทดสอบทั้งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากธรรมชาติกับสารสังเคราะห์ ไม่มีฤทธิ์ด้านการผลิต IL-6 จากเซลล์มาโครฟาจ หรือมีฤทธิ์น้อยมาก % control ไม่ต่ำกว่า 90

ทำให้เราไม่ทำการทดสอบในการด้านฤทธิ์การผลิต PGE_2 และ COX activity กับทุกสารทดสอบ เลือกทดสอบเพียงบางสารเท่านั้น จากการทดสอบจะพบว่า บางสารมีการอักเสบมากกว่า ที่กระตุ้นด้วย LPS

ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 8 และตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แสดงผลของ COX activity ของสารทดสอบหลังกระตุ้นด้วย LPS

	Gingival fibroblasts			Macrophage cell lines		
Sample	Total COX activity (U/ml)	COX-2 (%)	COX-1 (%)	Total COX activity (U/ml)	COX-2 (%)	COX-1 (%)
NC	37.5	60.00	40.00	40.48	49.14	50.86
LPS	60.35	74.52	25.48	88.68	81.65	18.35
BY-NA862	59.09	69.99	30.01	80.56	74.46	25.54
BY-NA863	63.54	69.99	30.01	85.44	84.99	15.01
BY-NA864	59.41	70.01	29.99	88.31	85.01	14.99
BY-NA865	50.28	58.88	41.12	62.42	57.63	42.37
BY-NA866	57.82	69.99	30.01	72.10	62.45	37.55
BY-NA867	57.5	70.00	30.00	80.32	75.22	24.78
BY-NA868	56.55	82.59	17.41	73.06	63.84	36.16
BY-NA869	58.72	68.96	31.04	72.50	62.72	37.28
BY-NA870	52.82	64.99	35.01	77.67	59.54	40.46
BY-NA872	57.41	69.02	30.98	80.31	77.69	22.31
BY-NA873	57.14	69.05	30.95	87.35	85.00	15.00
BY-NA874	57.33	69.23	30.77	83.54	78.97	21.03
BY-NA891	57.31	69.72	30.28	88.94	89.41	10.59
BY-NA907	57.21	69.45	30.55	78.80	92.89	7.11
BY-NA893	57.82	69.99	30.01	80.45	75.28	24.72
BY-NA894	56.55	70.00	30.00	72.10	62.32	37.68
BY-NA897	57.22	69.11	30.89	80.21	94.01	5.99
BY-NA910	58.45	70.00	30.00	80.43	93.24	6.76
BY-NA911	57.18	70.01	29.99	80.15	75.01	24.99
BY-NA912	56.86	69.98	30.02	72.43	62.90	37.10
BY-NA913	56.23	66.14	33.86	72.73	85.01	14.99
BY-NA914	57.22	69.48	30.52	80.48	92.96	7.04
BY-NA915	56.55	68.60	31.40	80.84	92.63	7.37
BY-NA922	50.33	63.62	36.38	63.05	58.55	41.45
BY-NA926	60.04	72.21	27.79	80.23	75.09	24.91
BY-NA927	57.18	71.03	28.97	80.33	74.84	25.16
BY-NA930	55.91	67.17	32.83	80.22	74.75	25.25
BY-NA932	50.28	62.85	37.15	61.14	55.26	44.74
BY-NA938	56.86	69.98	30.02	80.24	74.28	25.72
BY-NA946	51.99	63.85	36.15	62.52	57.55	42.45

ตารางที่ 9 แสดงผลของ COX activity (% Control) ของสารทดสอบหลังกระตุ้นด้วย LPS

	Gingival fibroblasts	Macrophage cell lines
sample	Total COX activity (% Control)	Total COX activity (% Control)
NC	62.14	45.65
LPS	100.00	100.00
BY-NA862	97.91	90.84
BY-NA863	105.29	96.35
BY-NA864	98.44	99.58
BY-NA865	83.31	70.39
BY-NA867	95.28	90.57
BY-NA868	93.70	82.39
BY-NA869	97.30	81.75
BY-NA870	87.52	87.58
BY-NA872	95.13	90.56
BY-NA873	94.68	98.50
BY-NA874	95.00	94.20
BY-NA891	94.96	100.29
BY-NA893	95.81	90.72
BY-NA894	93.70	81.30
BY-NA897	94.81	90.45
BY-NA907	94.80	88.86
BY-NA910	96.85	90.70
BY-NA911	94.75	90.38
BY-NA912	94.22	81.68
BY-NA913	93.17	82.01
BY-NA914	94.81	90.75
BY-NA915	93.70	91.16
BY-NA922	83.40	71.10
BY-NA926	99.49	90.47
BY-NA927	94.75	90.58
BY-NA930	92.64	90.46
BY-NA932	83.31	68.94
BY-NA938	94.22	90.48
BY-NA946	86.15	70.50

จากผลทดสอบทั้ง การทดสอบค่า IL-6, PGE₂ และ COX II พบว่า จำนวนสารทั้งหมดที่ได้ผลบวก จากการทดสอบ สรุปผลการทดสอบที่ได้ดังนี้

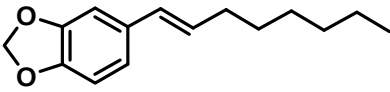
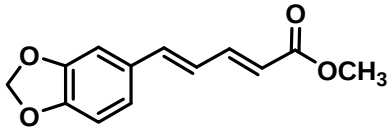
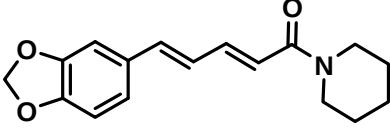
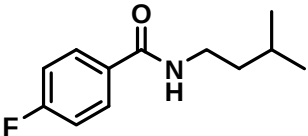
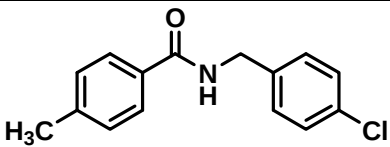
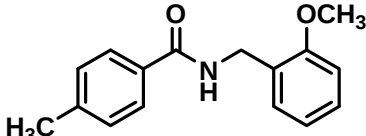
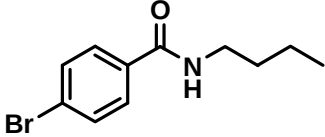
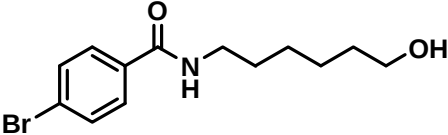
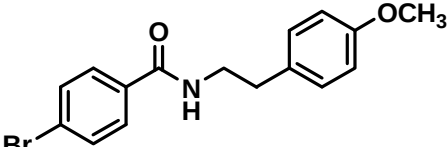
ตารางที่ 10 สรุปผลสารที่ได้คัดเลือกพร้อมผลการทดสอบ

กลุ่มสาร	% control, Gingival fibroblasts			% control, macrophage cell line		
	IL-6	PGE ₂	Total COX activity	IL-6	PGE ₂	Total COX activity
NC	11.93 ± 0.01	1.11	62.14	25.30 ± 0.01	0.89	45.65
LPS- induced	100 ± 2.11	100	100	100	100	100
สารธรรมชาติ						
BYNA 865	57.25 ± 3.01	0	83.31	83.62 ± 3.01	0	70.39
BYNA 867	137.33 ± 5.21	61.1	95.28	102.71 ± 4.21	21.32	90.27
BYNA 868	98.12 ± 5.01	13.32	93.70	92.54 ± 4.01	7.21	82.39
BYNA 869	76.06 ± 2.17	0	97.30	105.42 ± 2.11	0	81.75
BYNA 870	98.08 ± 4.01	3.33	87.52	96.22 ± 2.21	1.23	87.58
สารสังเคราะห์						
BYNA 922	59.88 ± 0.25	8.9	83.40	128.81 ± 0.24	13.26	71.10
BYNA 932	40.12 ± 0.55	8.9	83.31	115.30 ± 0.45	14.52	68.94
BYNA 946	48.87 ± 0.22	9.6	86.15	100.15 ± 0.21	35.56	70.50

จากผลการทดสอบต่าง ๆ จะเห็นได้ว่า สารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืชทั้งหมด 5 ชนิด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่แตกต่างกัน โดยสารธรรมชาติทั้ง 5 ชนิด จัดเป็นสารกลุ่ม piperine ที่มีฤทธิ์ด้านการผลิต PGE₂ และ COX activity ได้ทุกสาร โดยที่สารที่มีผลในการยับยั้ง PGE₂ และ COX activity ได้ดีที่สุดคือ สาร BYNA 865 รองลงมาเป็น สาร BYNA 869 เมื่อจัดการเรียงลำดับของสาร ดังนี้ BYNA 865 > BYNA 869 > BYNA 870 > BYNA 868 > BYNA 867 โดยที่ สาร BYNA 865 เป็นสารที่ให้ผลดีกับเซลล์ทั้ง 2 ชนิด และให้ผลต่อ Total cox activity กับเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเช่นกัน แต่สำหรับ piperine (BYNA 870) นั้น ไม่สามารถยับยั้งการผลิต IL-6 จากเซลล์ทั้ง 2 ชนิด แต่มีคุณสมบัติ ยับยั้งการผลิต PGE₂ และ COX activity ได้

สำหรับสารสังเคราะห์ พบเพียง 3 สารเท่านั้น ที่ให้ผลการทดสอบที่ดี และดีกว่า สารธรรมชาติ โดยที่ สาร BYNA 932 ให้ผลที่ดีที่สุด รองลงมาเป็น สาร BYNA 946 และ BYNA 922 ตามลำดับ จากผลการทดสอบต่าง ๆ โครงสร้างของสารที่ให้ผลแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงชื่อและโครงสร้างสาร

BY-NA 865	 1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-(1E)-octene
BY-NA 867	 Methyl piperate
BY-NA 870	 Piperine
BY-NA 868	กำลังพิสูจน์โครงสร้าง
BY-NA 869	กำลังพิสูจน์โครงสร้าง
BY-NA 894	
BY-NA 922	
BY-NA 924	
BY-NA 932	
BY-NA 935	
BY-NA 946	

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

Piperine เป็นสารประกอบหลักของพืช *Piper nigrum* Linn. ซึ่งมีประวัติในการนำมาใช้ในการต้านการอักเสบ เป็นสารกลุ่ม เอไมด์ อย่างไรก็ตาม กลไกในการต้านการอักเสบ ยังไม่เป็นที่ทราบกัน ดังนั้น เราจึงทำการทดสอบ ผลของสารกลุ่ม piperine ที่สกัดแยกจากพืช จำนวนทั้งหมด 5 สาร กับเซลล์ทดสอบ หลังจากกระตุ้นด้วย LPS เซลล์ที่ใช้ คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์ไลน์มาโครฟาจ U 937

จากผลการทดสอบ พบว่า สารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืชทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งเป็นสารกลุ่ม piperine ทั้งหมด มีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งหมดมากขึ้นแตกต่างกัน โดยสารธรรมชาติทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ต้านการผลิต PGE_2 และ COX activity ได้ทุกสาร โดยที่สารที่มีผลในการยับยั้ง PGE_2 และ COX activity ได้ดีที่สุดคือ สาร BYNA 865 รองลงมาเป็น สาร BYNA 869 เมื่อจัดการเรียงลำดับของสาร ดังนี้ $BYNA\ 865 > BYNA\ 869 > BYNA\ 870 > BYNA\ 868 > BYNA\ 867$ โดยที่ สาร BYNA 865 เป็นสารที่ให้ผลดีกับเซลล์ทั้ง 2 ชนิด และให้ผลต่อ Total cox activity กับเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเช่นกัน แต่สำหรับ piperine (BYNA 870) นั้น ไม่สามารถยับยั้งการผลิต IL-6 จากเซลล์ทั้ง 2 ชนิด แต่มีคุณสมบัติ ยับยั้งการผลิต PGE_2 และ COX activity ได้ จากการศึกษาวิจัย ของ Bae GS และคณะ (2010)[35] พบว่า สาร piperine มีผลในการยับยั้งการผลิต tumor necrosis factor (TNF- α) จากเซลล์มาโครฟาจที่แยกมาได้จากช่องท้องหนูหลังกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการผลิต IL-6 และ IL-1 beta ซึ่งผลการสอดคล้องกับการทดสอบครั้งนี้ ที่พบว่า สาร piperine ไม่มีผลในการยับยั้งการผลิต IL-6 กับทั้งเซลล์ไลน์มาโครฟาจและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในห้องปฏิบัติการ

สาร BYNA 865 และ BYNA 869 มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตทั้ง IL-6 และ PGE_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ และ สาร BYNA 865 เป็นสารเดียวที่สามารถลด COX activity ให้ผล % control ประมาณ 70

จากการทดสอบ ฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง กับหนู rat [36] พบว่า piperine มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากผลการทดสอบเบื้องต้นกับสารบริสุทธิ์ที่ได้จากพืช *Piper nigrum* 5 สาร โครงสร้างกลุ่ม piperine ประกอบด้วย เอไมด์ เป็นส่วนประกอบ ดังนั้น เราจึงทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มเอไมด์ ทั้งหมด 79 สาร ได้สารที่มีผลในการยับยั้งการผลิต IL-6 จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จำนวน 3 สาร คือ BYNA 922, BYNA 932 และ BYNA 946 ซึ่งมีผลยับยั้ง IL-6 ให้ผล % control 59.88 ± 0.25 , 40.12 ± 0.55 และ 48.87 ± 0.22 ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านการผลิต IL-6 กับเซลล์ไลน์มาโครฟาจเลย ในขณะที่เดียวกันให้ผลยับยั้งการผลิต PGE_2 ให้ผล % control กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็น 8.9, 8.9 และ 9.6 ตามลำดับ และให้ผลยับยั้งการผลิต PGE_2 กับเซลล์ไลน์มาโครฟาจ

13.26%, 14.52% และ 35.56% ตามลำดับ และสารทั้ง 3 นี้ ให้ผลในการยับยั้ง COX activity ให้ % control ประมาณ 70

สรุป จากการทดสอบ ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบกับเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก ทั้งหมด จำนวน 5 สาร แต่สารสกัดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ BYNA 865 และ 869 และได้สารสังเคราะห์กลุ่ม เอไมด์ 3 สาร คือ BYNA 922, 932 และ BYNA 946 ที่มีฤทธิ์ต้านการผลิต IL-6 ในเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก และมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิต PGE₂ และ COX activity ในทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือก และเซลล์ไลน์มาโครฟาจ หลังกระตุ้นด้วย LPS

เอกสารอ้างอิง

1. Kennett CN, Cox SW, Eley BM: **Histochemical and immunocytochemical localization of dipeptidyl peptidases II and IV in human gingiva.** *J Periodontol* 1996, **67**(9):846-852.
2. Roland CR, Nakafusa Y, Flye MW: **Gadolinium chloride inhibits lipopolysaccharide-induced mortality and in vivo prostaglandin E2 release By splenic macrophages.** *J Gastrointest Surg* 1999, **3**(3):301-307.
3. Hussain SN: **Respiratory muscle dysfunction in sepsis.** *Mol Cell Biochem* 1998, **179**(1-2):125-134.
4. Smith W: **Prostanoid biosynthesis and mechanism of action.** *Am J Physiol* 1992, **263**:F181-F191.
5. John C, Budsberg S: **Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats.** *JAVMA* 2000, **217**:721-729.
6. Hempel S, Martha H, Monick M, Hunninghake G: **Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes.** *J Clin Invest* 1994, **93**:391-396.
7. Yucel-Lindberg T, Ahola H, Nilsson S, Carlstedt-Duke J, Modeer T: **Interleukin-1 beta induces expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human gingival fibroblasts.** *Inflammation* 1995, **19**(5):549-560.
8. Noguchi K, Shitashige M, Yanai M, Morita I, Nishihara T, Murota S, Ishikawa I: **Prostaglandin production via induction of cyclooxygenase-2 by human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides.** *Inflammation* 1996, **20**(5):555-568.
9. Griswold D, Adam J: **Constitutively cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date.** *Med Res Rev* 1996, **16**:181-206.
10. Jouzeau J, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P: **Cyclooxygenase isoenzymes; how recent findings affect thinking about non steroidal anti-inflammatory drugs.** *Drugs* 1997, **53**:563-582.
11. Irwin C, Myrillas T: **The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease.** *Oral Dis* 1998, **4**:43-47.
12. Ishimi Y, Miyaura C, Jin C: **IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.** *J Immunol* 1990, **145**:3297-3303.
13. Geivelis M, Tuner D, Pederson E, Lamberts B: **Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adult with destructive periodontal disease.** *J periodontol* 1993, **63**:980-983.

14. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N: **Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 1.** *Proc Nalt Acad Sci (USA)* 1993, **90**:11924-11928.
15. Guillot J, Pollock S, Johnson R: **Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy.** *J Periodontol* 1995, **66**:667-672.
16. Kent L, Rehemtulla F, Michalek S: **Interleukin (IL)-1 and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy or periodontally diseased human gingival tissue.** *J Periodontol* 1999, **70**:274-282.
17. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A: **Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease.** *J Periodontol* 1994, **65**:147-153.
18. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL: **Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis.** *J Periodontol* 1998, **69**(8):899-910.
19. Chen CC, Chang KL, Huang JF, Huang JS, Tsai CC: **Correlation of interleukin-1 beta, interleukin-6, and periodontitis.** *Kaohsiung J Med Sci* 1997, **13**(10):609-617.
20. Agarwal S, Baran C, Piesco N: **Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta.** *J Periodontal Res* 1995, **30**:382-389.
21. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour G, Hara K: **Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease.** *Oral Microbiol Immunol* 1997, **12**:281-287.
22. Murakami S, Hino E, Shimabukuro Y, Nozaki T, Kusumoto Y, Saho T: **Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts.** *J Dent Res* 1997, **32**:110-114.
23. Roberts F, Hockett RJ, Bucy R, Michalek S: **Quantitative assessment of inflammatory cytokine gene expression in chronic adult periodontitis.** *Oral Microbiol Immunol* 1997, **12**:336-344.
24. Somboonwong J, Thanamitramanee S, Jariyapongskul A, Patumraj S: **Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats.** *J Med Assoc Thai* 2000, **83**(4):417-425.
25. Davis RH, DiDonato JJ, Johnson RW, Stewart CB: **Aloe vera, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and anti-inflammation.** *J Am Podiatr Med Assoc* 1994, **84**(12):614-621.
26. Murakami A, Takahashi D, Kinoshita T, Koshimizu K, Kim HW, Yoshihiro A, Nakamura Y, Jiawajinda S, Terao J, Ohigashi H: **Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the alpha, beta-unsaturated carbonyl group is a prerequisite.** *Carcinogenesis* 2002, **23**(5):795-802.
27. Blikslager AT, Roberts MC, Young KM, Rhoads JM, Argenzio RA: **Genistein augments prostaglandin-induced recovery of barrier function in ischemia-injured porcine ileum.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, **278**(2):G207-216.
28. Nalini N, Sabitha K, Viswanathan P, Menon VP: **Influence of spices on the bacterial (enzyme) activity in experimental colon cancer.** *J Ethnopharmacol* 1998, **62**(1):15-24.
29. Xiao XX, Pan SL: **[Pharmacological studies on extracts from *Piper boehmeriaefolium* var. *tonkinense*].** *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2004, **29**(6):578-580.
30. Ganguly S, Mula S, Chattopadhyay S, Chatterjee M: **An ethanol extract of *Piper betle* Linn. mediates its anti-inflammatory activity via down-regulation of nitric oxide.** *J Pharm Pharmacol* 2007, **59**(5):711-718.

31. Taufiq-Ur-Rahman M, Shilpi JA, Ahmed M, Faiz Hossain C: **Preliminary pharmacological studies on Piper chaba stem bark.** *J Ethnopharmacol* 2005, **99**(2):203-209.
32. Tipton DA, Flynn JC, Stein SH, Dabbous M: **Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1 β -stimulated prostaglandin E2 and IL-6 production by human gingival fibroblasts.** *J Periodontol* 2003, **74**(12):1754-1763.
33. Denizot F, Lang R: **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** *J Immunol Methods* 1986, **89**(2):271-277.
34. Shirai A, Holmes K, Klinman D: **Detection and quantitation of cells secreting IL-6 under physiologic conditions in BALB/c mice.** *J Immunol* 1993, **150**(3):793-799.
35. Bae GS, Kim MS, Jung WS, Seo SW, Yun SW, Kim SG, Park RK, Kim EC, Song HJ, Park SJ: **Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine.** *Eur J Pharmacol* 2010, **642**(1-3):154-162.
36. Mujumdar AM, Dhuley JN, Deshmukh VK, Raman PH, Naik SR: **Anti-inflammatory activity of piperine.** *Jpn J Med Sci Biol* 1990, **43**(3):95-100.

งานที่จะทำในปีถัดไป เป็นไปตามแผนเดิม

3. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ...ยังไม่มี

คาดว่า น่าจะตีพิมพ์ได้ในวารสาร Journal Periodontal Research เรื่อง Anti-inflammatory mediators from Piperine