

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

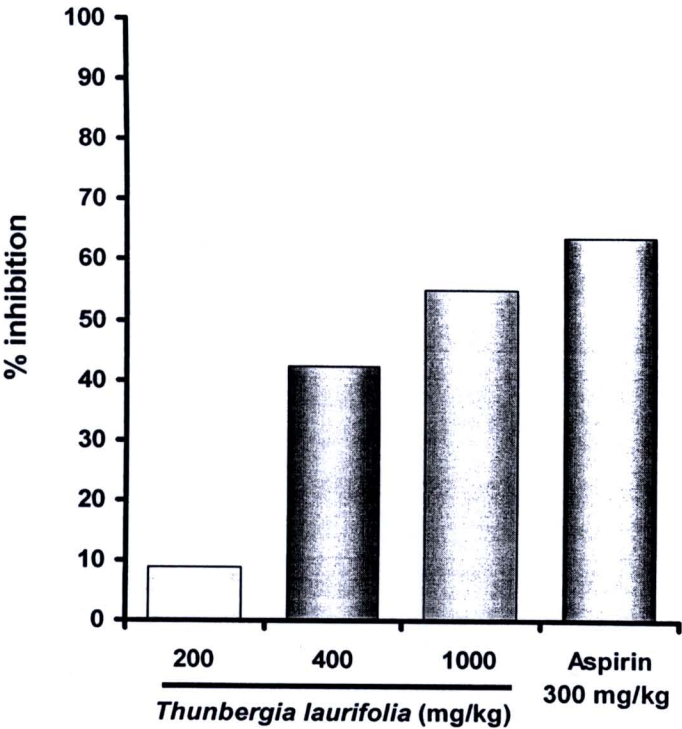
Writhing เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการปวดของหนู โดยแสดงพฤติกรรมเอาท้องสัมผัสกับพื้นพร้อมกับมีการยืดตัวออก สารที่นิยมนำมาฉีดเข้าทางช่องท้องหนูเพื่อให้เกิดการปวด ได้แก่ phenylquinone และ acetic acid เป็นต้น การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดใบรางจืดโดยใช้ writhing test เป็นการตรวจคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ 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 ± SE)
Control (1% MC)	7	21.53 ± 1.86
Aspirin 300 mg/kg	7	7.86 ± 1.75 *
รางจืด 200 mg/kg	7	19.60 ± 1.89
รางจืด 400 mg/kg	7	11.57 ± 2.17 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	9.71 ± 0.71 *

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)



รูปที่ 4-1 เปรี่เซนต์การยับยั้ง 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 ± SE)
Control (1% MC)	7	20.43 ± 1.18
Aspirin 300 mg/kg	7	10.89 ± 1.64 *
รางจืด 200 mg/kg	7	14.43 ± 1.29 *
รางจืด 400 mg/kg	7	13.83 ± 0.91 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	10.71 ± 0.99 *

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

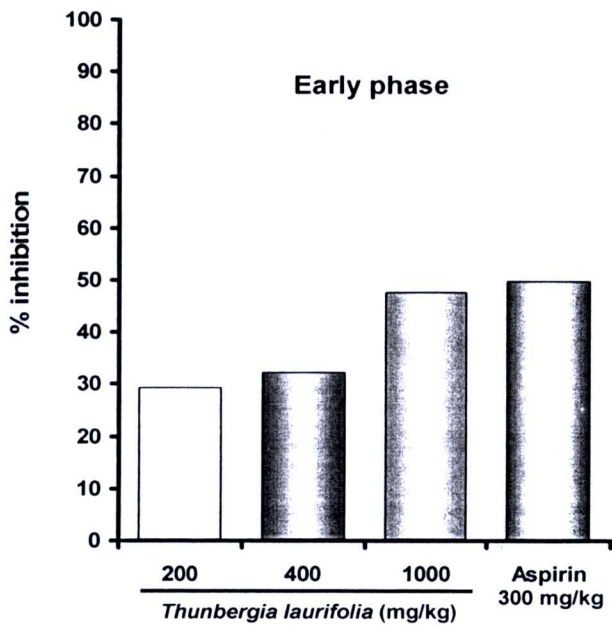
ตารางที่ 4-3 ผลของ aspirin และสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยกเท้าขึ้นเลียของหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าทางอุ้งเท้าหลัง ในช่วงเวลา 20-30 นาที (late phase)

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

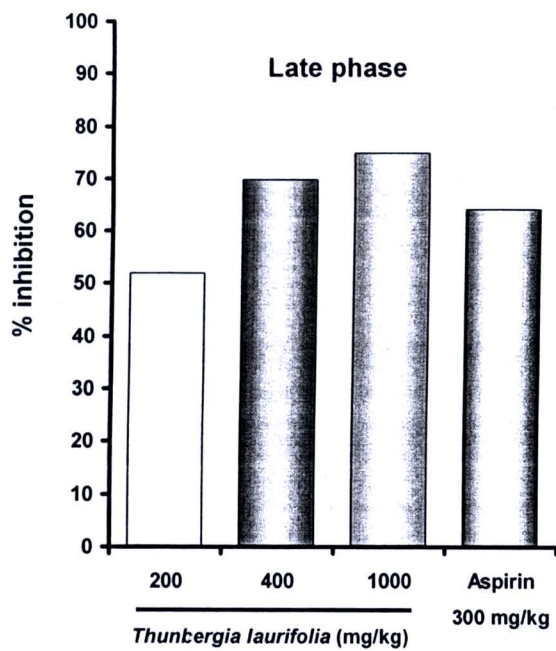
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

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



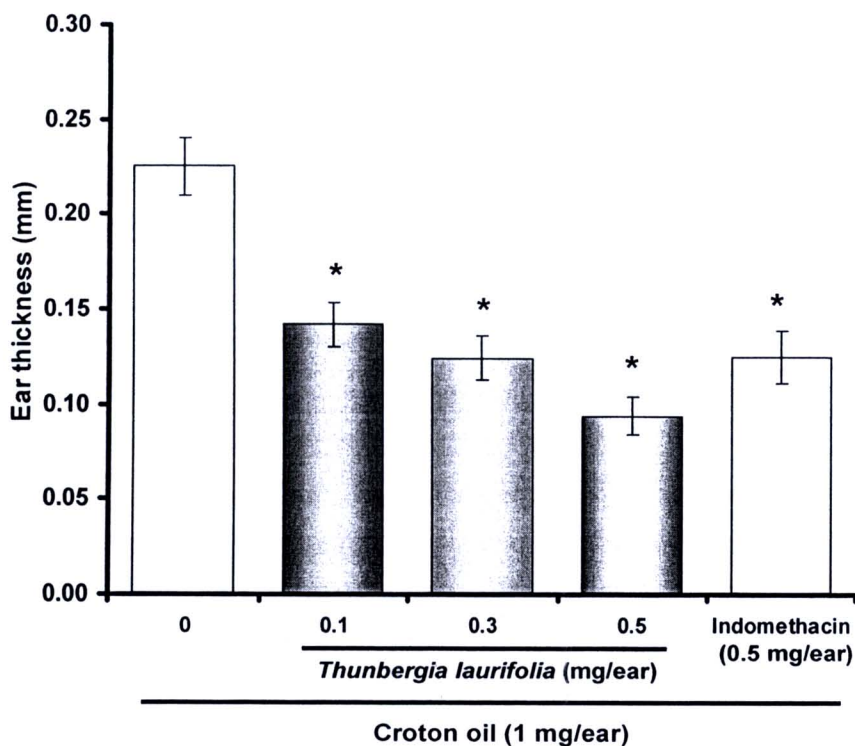
รูปที่ 4-2 เปรูเซนต์การยับยั้งความเจ็บปวดของสารสกัดใบรางจืดและ aspirin ในหนู mice ที่ได้รับการฉีด formalin เข้าที่เท้าในระยะ early phase ระหว่างช่วงเวลาที่ 0-5 นาที (n = 7)



รูปที่ 4-3 เปรูเซนต์การยับยั้งความเจ็บปวดของสารสกัดใบรางจืดและ 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) โดยการทำ croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู ในกลุ่มควบคุมจะทำ vehicle คือ DMSO ที่บริเวณใบหูด้านนอก สำหรับกลุ่มทดสอบจะทำการสกัดจากใบรางจืดในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 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)
* $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2.4 Cotton pellet-induced granuloma in mice

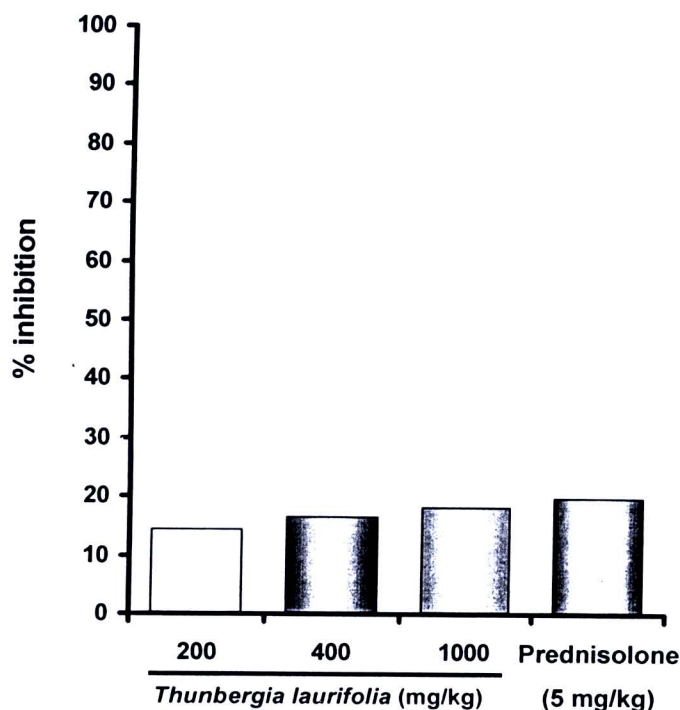
เป็นการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยแบบเรื้อรังโดยผ่าตัดเพื่อเอาก้อนสำลีใส่เข้าไปใต้ผิวหนังของหนู (subcutaneous) โดยใช้ sterile technique หลังจากนั้น 7 วัน ผ่าตัดเอาก้อนสำลีออกมาแล้วทำให้แห้ง การที่น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นจะเป็นตัววัดถึงการอักเสบแบบเรื้อรัง ผลการทดสอบพบว่ายา prednisolone ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสามารถลดน้ำหนักก้อนสำลีที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ 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 ± SEM)
Control (1% MC)	7	22.78 ± 0.82
Prednisolone 5 mg/kg	7	18.27 ± 0.52 *
รางจืด 200 mg/kg	7	19.51 ± 0.58 *
รางจืด 400 mg/kg	7	19.01 ± 0.95 *
รางจืด 1,000 mg/kg	7	18.66 ± 0.55 *

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

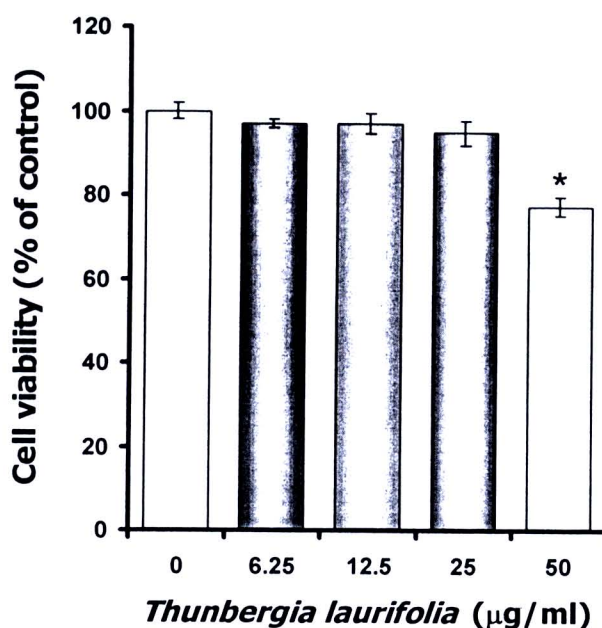
เมื่อนำน้ำหนักของสำลีมาคำนวณหา % inhibition พบว่ายา prednisolone สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสำลีได้ 19.80 % และสารสกัดใบรางจืดตั้งแต่ความเข้มข้น 200, 400 และ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสำลีได้ 14.35 %, 16.55 % และ 18.09 % ตามลำดับ (รูปที่ 4-5)



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

4.3 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบรางจืด โดยการ incubate เซลล์กับสารสกัดจากใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (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 จากข้อมูลที่ได้ทำให้นักวิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดที่ 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 ศึกษาผลของสารสารสกัดจากรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง 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 จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของไนไตรท์ที่เกิดขึ้นใน culture medium โดยใช้ Griess reagent และตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์โดย MTT assay จากการศึกษาพบว่า สาร LPS ทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจให้ทำการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ผลของ LPS ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ

Treatment	ปริมาณของไนไตรท์ที่เกิดขึ้นใน 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 *

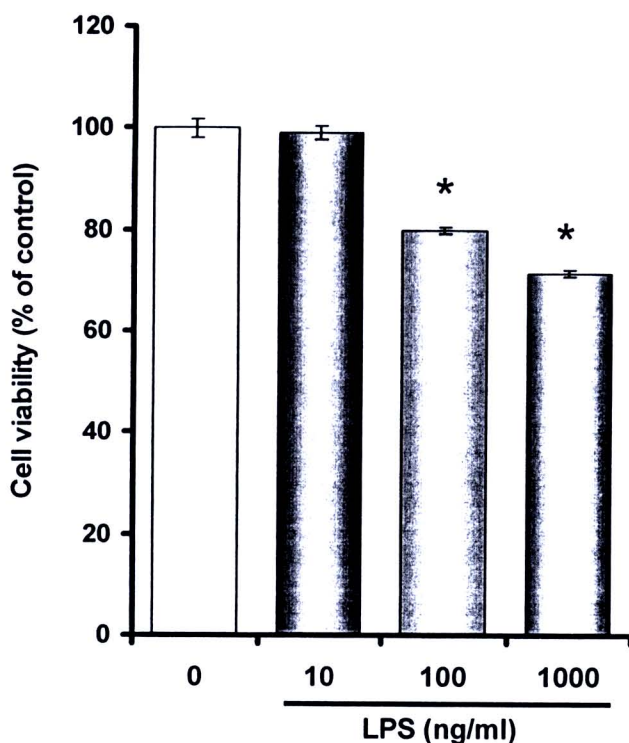
ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± SE (n=8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร LPS (vehicle treated)

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

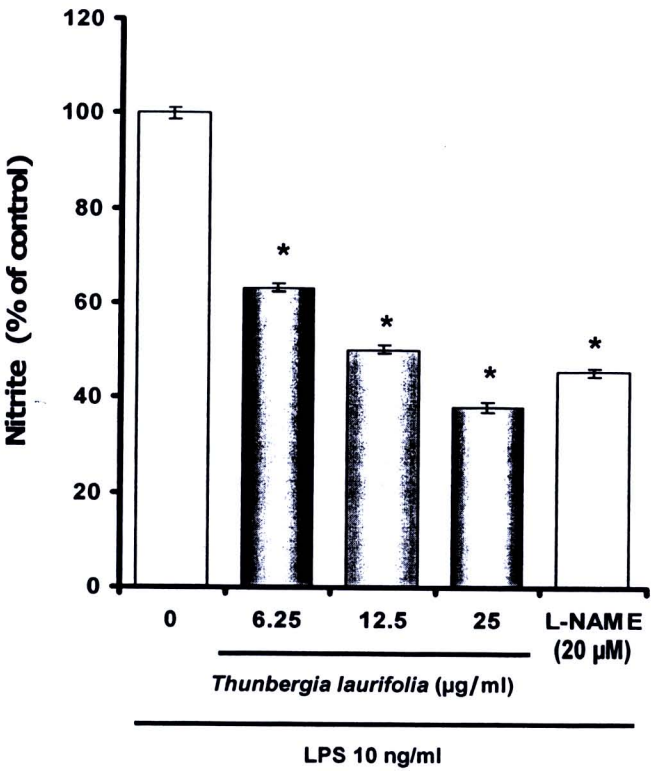


รูปที่ 4-7 ผลของ LPS ที่มีต่อความมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร LPS ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ข้อมูลแสดงในรูป Mean $\pm$ SE (n=8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร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

จากนั้นทำการทดสอบผลของสารสกัดใบรางจืดและ L-NAME ที่ให้ร่วมกับ LPS ต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยใช้สารสกัดใบรางจืดหรือสาร L-NAME ให้ร่วมกับ สาร LPS ความเข้มข้น 10 ng/ml เพื่อทดสอบว่าสาร LPS เมื่อให้ร่วมกับสารสกัดใบรางจืดหรือสาร L-NAME จะ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ (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) ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ทดลองกับเซลล์ได้โดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

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

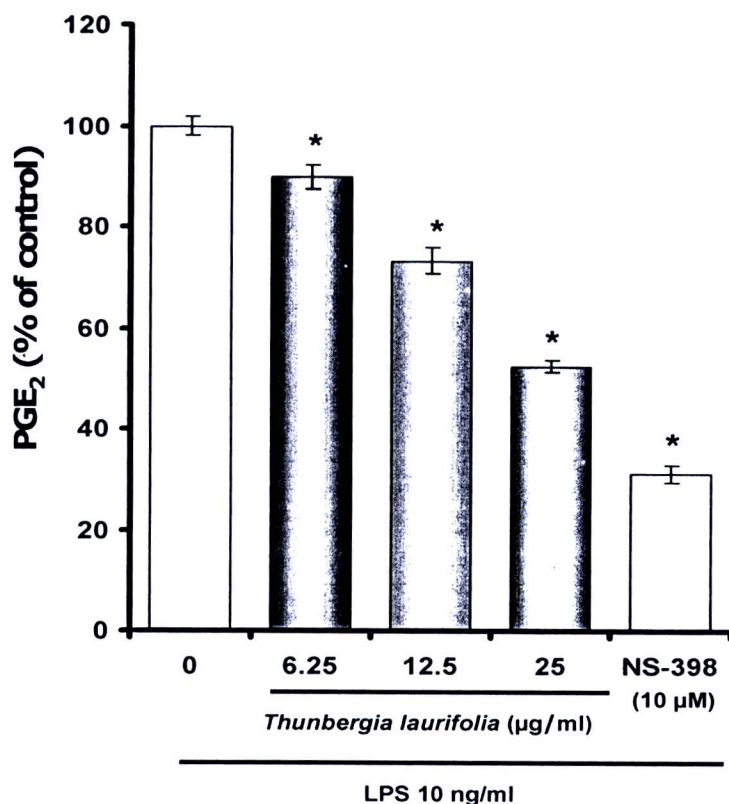
4.5 ผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง prostaglandin E₂ (PGE₂) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)

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) ดังนั้นจึงเลือกใช้ 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) ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ในการทดลองได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

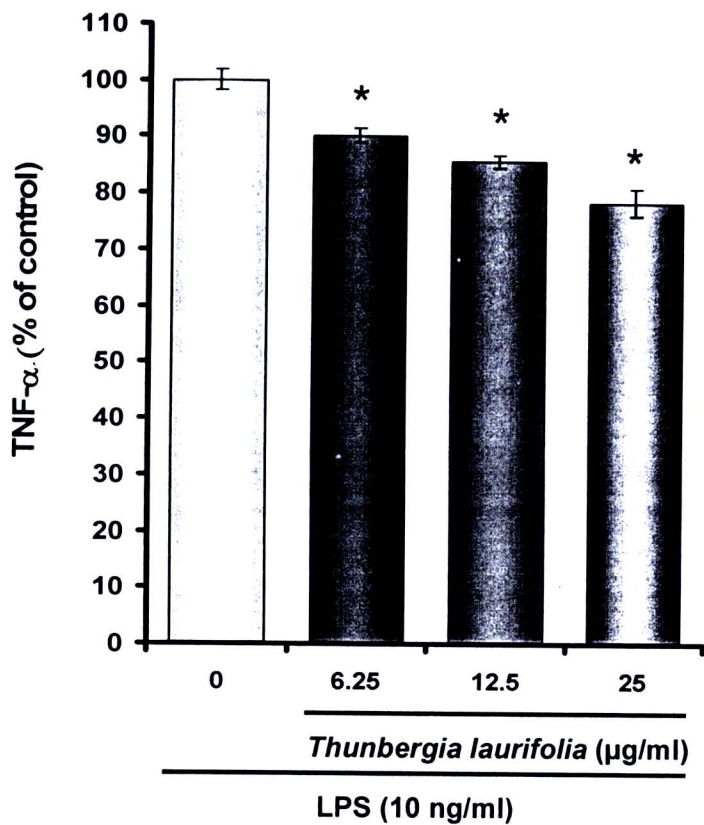
เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง PGE₂ ของสารสกัดใบรางจืด หลังจากกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจให้สร้างสาร PGE₂ โดยการ incubate กับ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาร NS298 (10 ไมโครโมลาร์) สามารถลดการสร้าง PGE₂ ได้ 79 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง 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 พบว่าสารสกัดจากรางจืดสามารถจับกับไนตริกออกไซด์ได้ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 206.91 µg/ml

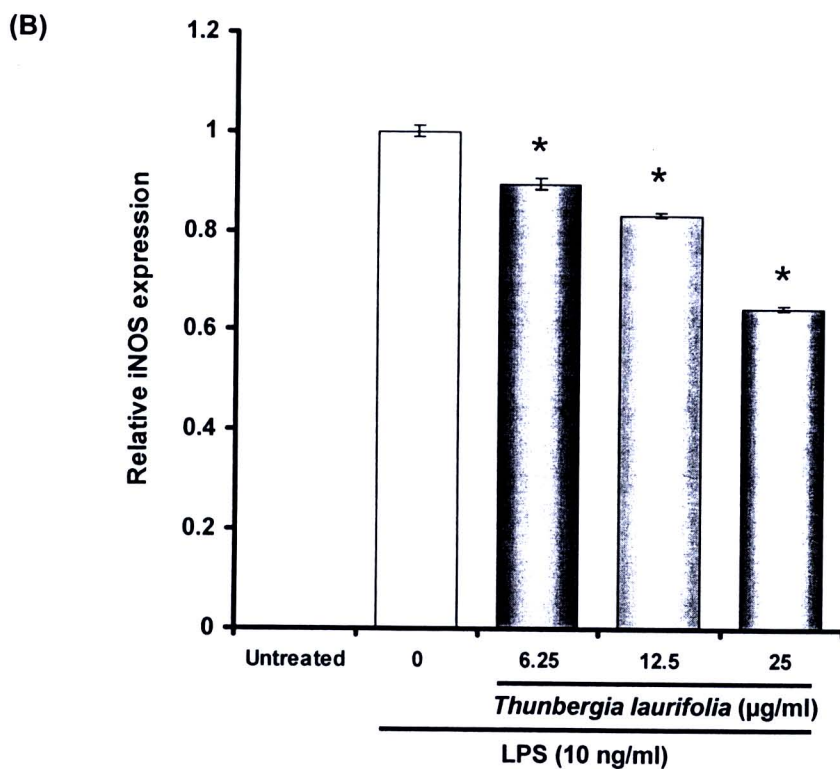
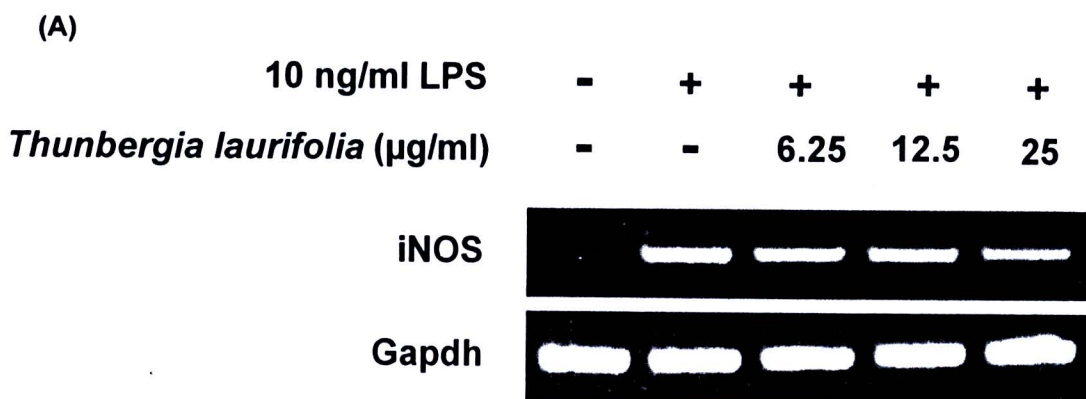
ตารางที่ 4-6 ความสามารถจับสาร nitric oxide ของสารสกัดจากรางจืด

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

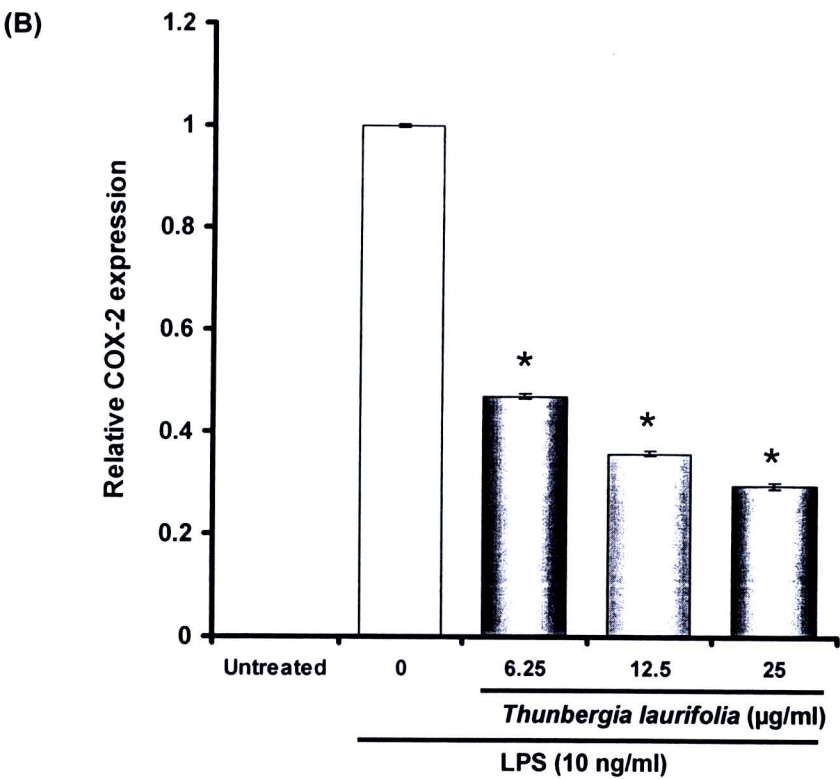
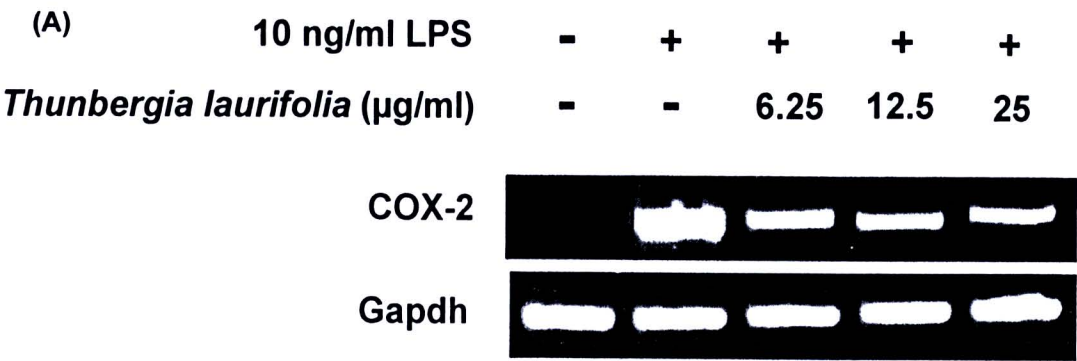
การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ด้วยวิธี RT-PCR นั้น โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) อย่างเดียว หรือ ได้รับ LPS (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) พร้อมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ (6.25, 12.5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (unstimulated RAW 264.7 cells) ไม่พบการแสดงออกของ iNOS mRNA ในทางตรงกันข้าม กลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่ามีการสังเคราะห์ 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

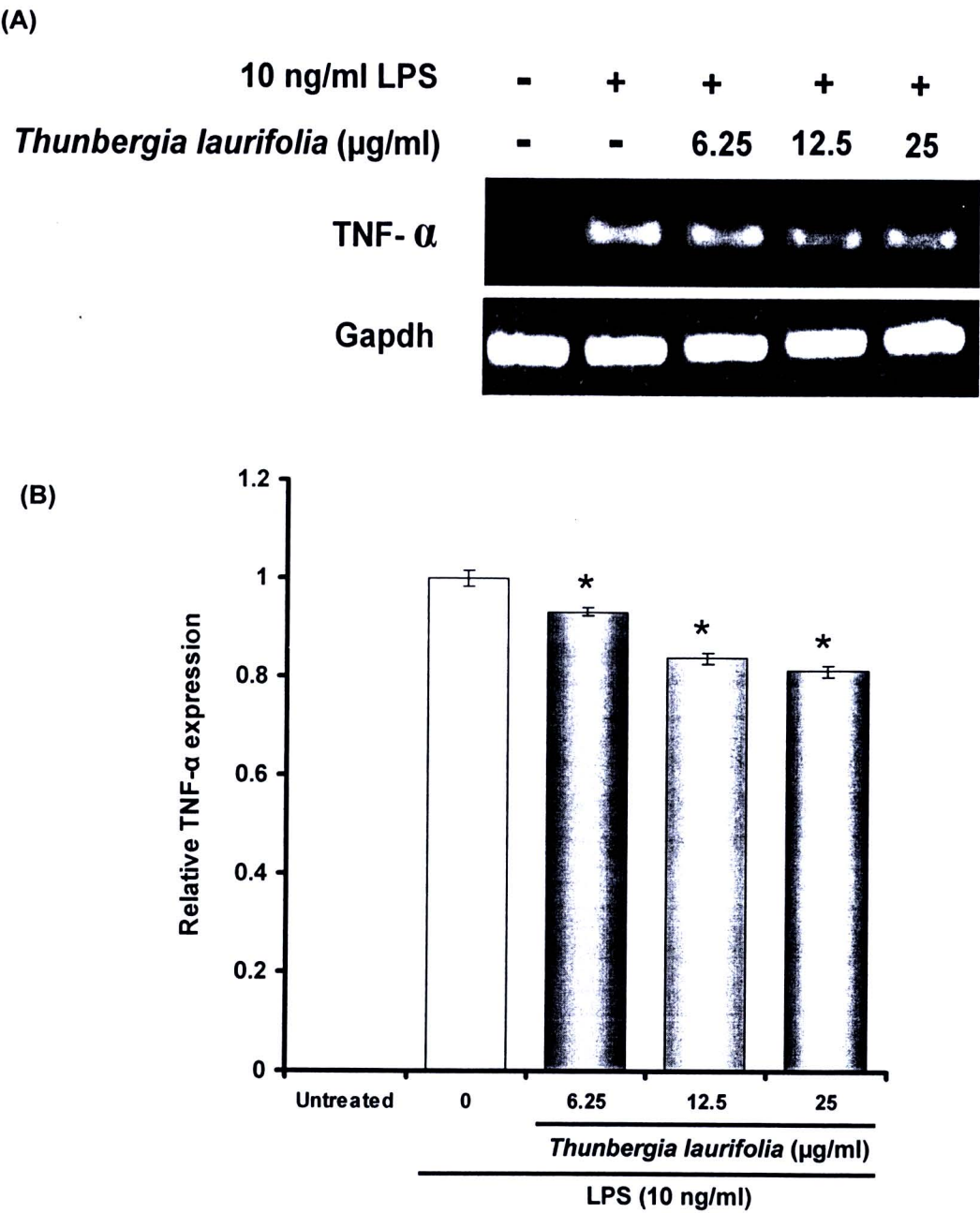
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน COX-2 โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่เซลล์สร้างขึ้นภายใน ด้วยวิธี RT-PCR นั้น เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร อย่างเดียว หรือ ได้รับ LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พร้อมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5 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 PGE_2 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)) ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการยับยั้งการสร้าง TNF- α ของสารสกัดใบรางจืด (รูปที่ 4-10)



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