

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

5.1 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) เป็นพืชในตระกูล Acanthaceae ซึ่งในวงการแพทย์แผนไทย รายงานว่ามีสรรพคุณในการรักษาอาการอักเสบ และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาแก้ปวดและต้านอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูงและมีผลข้างเคียงต่ำ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์ที่รับรองเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืดทั้งในระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุล ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืดในสัตว์ทดลอง และ ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) โดยศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการสร้างสาร inflammatory mediators ที่สำคัญเช่น nitric oxide (NO), สาร prostaglandin E₂ (PGE₂) และ สาร tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) รวมทั้ง ศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารดังกล่าว

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืดในสัตว์ทดลอง เมื่อทดสอบฤทธิ์ลดปวดและต้านอักเสบโดยวิธี writhing test พบว่ายามาตรฐานที่ใช้คือ aspirin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบในระยะเฉียบพลันได้ดี (Sanchez-Mateo et al., 2006) สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 63.49 % ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัดโดยสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ที่ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้ถึง 54.90 % ซึ่งน้อยกว่ายามาตรฐาน aspirin (300 mg/kg) เล็กน้อย

การเกิด writhing response โดยการเหนี่ยวนำด้วยการฉีด acetic acid เข้าช่องท้องจะทำให้เกิดการสร้างสาร 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 ยังไปเพิ่มการหลั่งสาร arachidonic acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cyclooxygenase ส่งผลให้เกิดการสร้าง PGE₂ เพิ่มมากขึ้น (Yin et al., 2003; Daud et al., 2006) ทำให้เกิดการกระตุ้นปลายประสาททำให้รู้สึกเจ็บปวดและส่งผลให้เกิดอาการ writhing

จากผลการวิจัยข้างต้นทำให้แสดงให้เห็นว่าการที่สารสกัดใบรางจืดฤทธิ์ลดปวดหรือลด writhing response ส่วนหนึ่งน่าจะมีผลจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin E₂ ของสารสกัดใบรางจืด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการสร้าง 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 ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสามารถลดการบวมของหนูหูที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถยับยั้งการบวมได้ 44.44 % ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการบวมที่ใบหูได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัดโดยสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (0.5 mg/ear) สามารถยับยั้งการบวมที่ใบหูได้ถึง 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 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดผ่านการกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C (PKC) ส่งผลต่อเนื่องไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A₂ เป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ arachidonic acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cyclooxygenase ทำให้การสร้างสาร leukotriene และ prostaglandin โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PGE₂ มีเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่าอาการบวมที่ไอบูโพรเฟนจาก croton oil มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร NO เนื่องจากพบว่าสาร L-N^G-nitroarginine (L-NN) ที่มีฤทธิ์เป็น NOS inhibitor สามารถลดอาการบวมลดการบวมที่ไอบูโพรเฟนที่เหนียวนาโดย croton oil ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Zuoqi et al., 2008)



ทดลองใช้ยามาตรฐานคือ prednisolone เนื่องจากมีรายงานว่า aspirin ไม่สามารถลดการอักเสบในระยะเรื้อรังได้ดีเนื่องจากเป็นยาในกลุ่ม NSAID (ณัฐธิดา 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)

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

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในสัตว์ทดลองทั้งสี่วิธีการทดลองทำให้ทราบว่า การออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืดน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับสารสื่อ (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 กระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ ทำให้มีการหลั่งสาร NO, PGE₂ และ TNF- α ออกมาในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลชีพ

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดด้วยวิธี MTT assay โดยวัดความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถทำปฏิกิริยากับสาร MTT และเปลี่ยนให้อยู่ในรูป formazan salt โดยไมโตคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ 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 เปสี และคณะ (2544) และ วิวรรณ วิสิฐพงศ์พันธ์ (2545)

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจพบว่า สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการสร้าง NO และ PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณ NO และ PGE₂ เป็นผลมาจากการลดปริมาณการผลิต ไม่ได้มาจากการที่เซลล์ตายเนื่องจากสารสกัด

การศึกษาความสามารถของสารสกัดใบรางจืดในการจับ NO ที่ถูกปลดปล่อยจากสาร sodium nitroprusside ใน physiological pH วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อตอบคำถามว่า ในกรณีที่สารสกัดรางจืดลดปริมาณของ NO ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide นั้นเกิดจากการที่สารสกัดรางจืดมีผลยับยั้งการสร้าง NO หรือมาจากความสามารถในการจับ NO (nitric oxide scavenging activity) โดยตรงของสารสกัด ซึ่งพบว่า สารสกัดจากใบรางจืดสามารถจับกับสาร NO ได้ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้น โดยมีค่า IC₅₀ 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 PGE₂ จัดเป็น inflammatory mediators ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ สารทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage สาร NO และ PGE₂ 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 PGE₂ มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการสร้าง inflammatory mediator หลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดงและมีไข้ ดังนั้นการยับยั้งการหลั่งของสาร NO และ PGE₂ จึงเป็นแนวทางหลักสำคัญทางหนึ่งในการควบคุมกระบวนการอักเสบ โดยเฉพาะการอักเสบแบบเฉียบพลัน จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าการที่สารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบส่วนหนึ่งน่าจะมีผลจากการลดลงของ NO และ PGE₂ 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

การศึกษามูลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 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 จัดเป็นสารซัยโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตซัยโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิดอื่นๆ 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 TNF- α สามารถเหนี่ยวนำการสร้างสาร NO และ PGE₂ ได้ โดย TNF- α ที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นให้ NF-KB ทำงาน ซึ่งโดยปกติแล้ว NF-KB จะอยู่ในcytoplasm ในรูปที่ยังไม่พร้อมที่จะทำงาน (inactive form) เนื่องจากจับอยู่กับโปรตีนยับยั้ง (inhibitory protein) ชื่อ IKB แต่ในสภาวะที่มี TNF- α 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 จะ สามารถผ่านเข้าไปในนิวเคลียส ไปควบคุมการสร้างโปรตีน โดยไปจับกับโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีนส์ที่ควบคุมการสร้าง iNOS และ COX-2 เป็นผลให้มีการสร้าง NO และ PGE₂ ออกมามากขึ้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบ (Chanani et al., 2002)

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบส่วนหนึ่งน่าจะมีผลมาจากยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ส่งผลให้มีการหลั่งของสาร TNF- α น้อยลง ส่งผลต่อเนื่องให้มีสาร NO และ PGE₂ ลดลงด้วย

การศึกษานี้เน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบรางจืดมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ลดความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองและยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO, PGE₂ และ TNF- α รวมไปถึงยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α ได้ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการศึกษาดังกล่าวถึงองค์ประกอบหลักทางเคมีของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าใบรางจืดมีสารเคมีกลุ่ม flavonoid เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งตัวที่พบมากคือ apigenin

รายงานการวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า สาร apigenin ซึ่งเป็น flavonoids ที่พบได้ในพืชหลายชนิดรวมถึงใบรางจืด มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO, PGE₂ และ TNF- α จากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจได้ (Liang et al., 1999; Nicolas et al., 2007) และยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α ได้ ซึ่งได้โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของ NF-KB ในขบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีนดังกล่าว (Raso et al., 2000; Hougee et al., 2005; Nicolas et al., 2007) ผลการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยข้างต้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า สาร apigenin ที่พบในรางจืดอาจเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ ซึ่งคณะผู้วิจัยคิดว่าควรจะทำการศึกษาเพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ต้านอักเสบจากสาร apigenin ในใบรางจืดต่อไป

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ารางจืดเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการยับยั้งการอักเสบ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO และ PGE₂ ในเซลล์มาโครฟาจ และยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α ในเซลล์มาโครฟาจและยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองได้ดี อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกยับยั้งการอักเสบอื่นๆ ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง เช่น การยับยั้งการทำงานของ NF-KB, TNF- α , 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 ทำให้ทราบว่า การเกิด 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 และโรคมะเร็งบางชนิด 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)

อริบ ลัมตระกูล, ปราโมทย์ มหุณการ, อัจฉรวรรณ โตภาคงาม

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ในตำรายาสมุนไพร รายงานว่ารางจืดมีสรรพคุณในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของรางจืด ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดใบรางจืด โดยทำการศึกษาผลการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ซึ่งจัดเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญตัวหนึ่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นโดยสาร lipopolysaccharide (LPS) ผลการศึกษาพบว่าสาร สกัดใบรางจืดความเข้มข้น 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 ซึ่งผลดังกล่าวคาดว่าจะเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (i-NOS) มากกว่าผลจากการจับกับสาร NO โดยตรง

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

2. บทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

บทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติอยู่ในระหว่างการดำเนินการจัดทำต้นฉบับ (manuscript) ทั้งนี้คณะผู้วิจัยคาดว่าจะส่งเพื่อรับการพิจารณาตีพิมพ์จำนวน 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