บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม ซึ่งเป็นพืชที่ถูกใช้ในการแพทย์พื้นบ้านของไทยภาคตะวันออก (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, มปป) ในการรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งโรคจากการอักเสบ การศึกษาทำในเซลล์ไลน์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นการจำลองการติดเชื้อจุลชีพในเซลล์แมคโครฟาจ ทำให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ออกมาในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ และสามารถลดการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับโปรตีนและ mRNA ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้าในเรื่องของฤทธิ์ต้านการอักเสบของใบสำมะง่าโดย Gopal and Sengottuvelu, 2007 รายงานว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบสำมะง่าฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีฤทธิ์การป้องกันตับอักเสบในหนู ที่เหนี่ยวนำด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ นอกจากนี้ Sharma et al., 1989 ได้รายงานว่า ส่วนสกัดแอลกอฮอล์จากต้นทานตะวันซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกันกับต้นเบญจมาศน้ำเค็มมีฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบในหนูทดลองที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ อย่างไรก็ตามรายงานนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษากลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม

การวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม (ส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ) ที่ความเข้มข้นของส่วนสกัดเท่ากับ 50 μg/mL พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนสกัดอื่น โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 4-1 ถึง 4-4) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณไนไตรท์เป็นผลมาจากการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ ไม่ได้มาจากการตายของเซลล์ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบฟีนอล หลายชนิดแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (Shin et al., 2010 และ Ci et al., 2010) และจากการศึกษาของสุภารัตน์ คุรีพันธ์ และอัจฉราพรรณ ละมุล (2553) พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเค็ม ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้งสองชนิดนั้นอาจเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอล อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการแยกสาร

บริสุทธิ์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ผลที่ได้จากการศึกษาในส่วนสกัดของใบเบญจมาศน้ำเค็มนี้ คล้ายกับการศึกษาในใบขลู่ ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับเบญจมาศน้ำเค็ม ที่พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของส่วนสกัดเอทานอลใบขลู่ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่สัมผัสกับ LPS (ดวงนภา บัวพูล และคณะ, 2553) จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบสำมะง่าที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่าสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ -3-5 และรูปที่ 3-6 โดยใบสำมะง่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าใบเบญจมาศน้ำเค็ม โดยมีค่า IC_{50} ของส่วนสกัดจากใบสำมะง่าเท่ากับ 32.93 ± 3.95 μg/mL ในขณะที่ส่วนสกัดจากใบเบญจมาศน้ำเค็มมีค่าเท่ากับ 54.47 ± 11.01 μg/mL

ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจอยู่ที่ระดับการถอดรหัสพันธุกรรม (Aktan, 2004) และระดับของไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นจากการผลิตโดย iNOS ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของ iNOS ในแมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นโดยตัวเหนี่ยวนำที่จำเพาะและมีส่วนร่วมในพยาธิวิทยาของโรคอักเสบต่างๆ (Buttery et al., 1994) ดังนั้นจึงศึกษาผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่า ต่อการปริมาณ mRNA ของ iNOS โดยเทคนิค real time RT-PCR พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่าสามารถยับยั้งการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน iNOS ได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ขั้นต่อมาทำการศึกษาผลของส่วนสกัดต่อปริมาณโปรตีน iNOS พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าสามารถลดปริมาณโปรตีน iNOS ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด ในเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใดพบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน iNOS ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน (รูปที่ 3-9 และ3-10) แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จึงมีการแสดงออกของ iNOS และเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวไม่มีการแสดงออกของยีน iNOS ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ได้เป็นผลมาจากการลดปริมาณของ iNOS ซึ่งแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ไม่ใช่การลดปริมาณของ eNOS และ nNOS ซึ่งจะมีการแสดงออกอยู่ตลอดเวลาในไซโตซอล จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้โดยยับยั้งที่การแสดงออกของ iNOS ทั้งในระดับ mRNA และนำไปสู่การลดลงของโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

โพรสตาแกลนดิน E2 เป็นสารสื่อกลางในการอักเสบที่สำคัญอีกชนิดนอกเหนือจากไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจในขณะที่เกิดกระบวนการอักเสบ โดยเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในขณะที่มีการอักเสบ ในการศึกษานี้พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าสามารถลดการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นดัง

แสดงผลในตารางที่ 3.12 ดังนั้นฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าส่วนหนึ่งเกิดจากความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และโพรสตาแกลนดิน E2

NF-KB เป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน NF-KB อยู่ในกลุ่มโปรตีน Rel มีลักษณะเป็น homodimer หรือ heterodimer ที่เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF-KB1) และ p52 (NF-KB2) โดยที่การจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูปที่พบบ่อย (Luqman and Pezzuto, 2010) NF-KB ที่พบในแมคโครฟาจในสภาวะปกติเซลล์จะจับกับโปรตีน inhibitory-kappaB (IKB) ทำให้ NF-KB คงอยู่ในไซโทซอล (Bauerle and Baltimore, 1996) แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน IKB จะถูกฟอสโฟรีเลชันโดยเอนไซม์ IKB kinase (IKK) เป็นผลให้ IKB สลายตัว (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้น NF-KB จึงเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและจับกับโปรโมเตอร์ของยีน iNOS และ COX-2 และเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมของ iNOS และ COX-2 นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้นเราจึงทดสอบผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าต่อปริมาณ p65 NF-KB ในนิเคลียสเนื่องจากการจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูป NF-KB ที่พบบ่อย จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าสามารถลดปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียสได้ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลไกหนึ่งที่สาร ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสำมะง่าลดการผลิตไนตริกออกไซด์และโพรสตาแกลนดิน E2 ได้คือสามารถลดปริมาณ p65 NF-KB และนำไปสู่การลดลงของระดับ mRNA ของ iNOS รวมทั้งระดับโปรตีนของ iNOS ตามลำดับ และสุดท้ายเกิดการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดของใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเด็มมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 ข้อมูลที่ได้จะนำมาซึ่งหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะสนับสนุนการนำสมุนไพรใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเด็มไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เช่น โรคไขข้ออักเสบ และโรคตับอักเสบ รวมทั้งรักษาอาการอักเสบที่เกิดจากการบาดเจ็บต่างๆ เป็นต้น และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการค้นหายาต้านอักเสบชนิดใหม่จากสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้

4.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดที่ได้จากใบสำมะง่าและใบเบญจมาศน้ำเด็ม สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ

2. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยยับยั้งที่การแสดงออกของ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด

3. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่ามีฤทธิ์ในการลดปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียสได้ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด

4. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสำมะง่ามีฤทธิ์ในยับยั้งการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด