

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 น้ำหนักของส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร

การสกัดพืชสมุนไพรทั้งหมด 21 ชนิด ด้วยน้ำร้อน และ 95% เอทานอล ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 60 ส่วนสกัด พบว่าส่วนสกัดน้ำของสมุนไพรทุกชนิดมีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดเอทานอล ยกเว้นลำต้นสะค้านใบพลู และเปลือกพังกาใหญ่ ดังแสดงในตารางที่ 3-1 โดยมีร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.45-37.58 % ส่วนสกัดน้ำที่มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงสุด ได้แก่ เหง้าหัวเดียว และร้อยละของน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดเอทานอลเท่ากับ 2.1-25.52 % ส่วนสกัดเอทานอลที่มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ ลำต้นสะค้านใบพลู

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำมีค่าเท่ากับ  $4.09 \pm 0.20$  ถึง  $325.74 + 13.62$  มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด และของส่วนสกัดเอทานอลมีค่าเท่ากับ  $1.55 \pm 0.20$  ถึง  $515.27 \pm 14.70$  มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด คือ เปลือกพังกาใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของสมุนไพรเกือบทุกชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ยกเว้น เหง้าเอื้องหมายนา ใบมะเดื่อหอม ใบระย่มน้อยดอกขาว ใบตังกวน ใบมะฮึก ใบฝนแสนห้า และใบราชดัด (ตารางที่ 3-1)

ตารางที่ 3-1 ร้อยละของน้ำหนักแห้ง และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพร

สมุนไพร	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง		ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด)	
	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล
ใบสบางร้างสาบกา	25.7	13.93	$46.99 \pm 1.79$	$65.19 \pm 4.16$
เหง้าเอื้องหมายนา	14.65	4.53	$7.98 \pm 0.19$	$1.55 \pm 0.20$
ใบเอื้องหมายนา	8.5	4.37	$15.81 \pm 0.81$	$24.26 \pm 0.74$
ต้นเอื้องหมายนา	11.65	2.50	$14.28 \pm 0.50$	$17.25 \pm 0.12$
ใบชงโคป่า	13.2	7.85	$74.20 \pm 1.62$	$95.69 \pm 1.41$
ใบมะเดื่อหอม	9.7	6.67	$44.60 \pm 0.64$	$28.32 \pm 1.74$
ใบลายกนก	10.1	3.93	$13.92 \pm 0.60$	$21.83 \pm 0.11$

ใบระย้อมน้อยดอกขาว	10.3	7.00	46.06 ± 0.72	24.27 ± 0.28
รากระย้อมน้อยดอกขาว	15.0	2.10	4.09 ± 0.20	21.36 ± 0.45
ไมยราบ	5.80	3.46	24.93 ± 0.85	24.58 ± 2.81
ใบโคลงเคลง	6.9	5.20	41.69 ± 1.15	52.69 ± 2.34
รากโคลงเคลง	12.68	2.91	72.92 ± 0.80	307.77 ± 2.97
ใบค้ำคาวดำ	18.95	10.48	19.02 ± 1.38	27.23 ± 8.80
เหง้าค้ำคาวดำ	23.50	14.85	33.96 ± 0.59	61.96 ± 0.48
ใบตึงตัน	10.08	5.33	103.26 ± 1.72	36.72 ± 1.57
รากตึงตัน	16.25	2.31	81.40 ± 1.87	106.04 ± 9.82
ใบมะฮีก	20.65	12.26	70.07 ± 1.01	51.55 ± 7.94
รากมะฮีก	10.92	2.55	7.12 ± 1.63	58.73 ± 1.60
ใบหัวเดียว	17.25	8.21	15.14 ± 1.33	22.38 ± 0.54
เหง้าหัวเดียว	37.58	10.90	17.79 ± 0.73	123.02 ± 2.11
ใบไม้ลาย	15.36	5.97	96.56 ± 1.22	221.98 ± 4.94
ใบเข็มไอดีย	18.80	12.06	197.89 ± 2.44	239.52 ± 7.57
รากเข็มไอดีย	14.16	4.95	133.86 ± 1.40	206.86 ± 1.75
รากพนมสุวรรณค์	6.28	2.94	18.74 ± 0.32	58.22 ± 0.79
ลำต้นสะค่านใบพลู	5.2	25.52	27.61 ± 1.04	57.23 ± 1.28
ใบฝนแสนห้า	16.35	10.53	112.04 ± 2.45	72.17 ± 3.81
เข็มป่า	9.65	7.76	132.85 ± 3.16	232.49 ± 3.95
ใบพินปลา	7.4	6.64	206.58 ± 5.69	213.52 ± 6.38
ใบราชดัด	29.95	18.23	77.62 ± 4.40	58.45 ± 3.72
เปลือกพังแหรใหญ่	3.45	11.13	325.74 ± 13.62	515.27 ± 14.70

### 3.2 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์

การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชสมุนไพร ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT พบว่าทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลพืชส่วนใหญ่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80 % ยกเว้นส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเอื้องหมายนา รากตึงตัน ลำต้นสะค่านใบพลู และใบราชดัด ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ  $94.37 \pm 1.42$  % ส่วน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2 % ซึ่งใช้เป็นตัวทำลายส่วนสกัดเอทานอลของพืช มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดเท่ากับ  $99.20 \pm 5.49$  % ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพร

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์	
	ส่วนสกัดน้ำ (50 µg/mL)	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)
ใบสาบแร้งสาบกา	104.47±2.47	105.25±4.25
เหง้าเอื้องหมายนา	104.36±4.36	2.62±0.30
ใบเอื้องหมายนา	100.50±4.10	97.73±1.99
ต้นเอื้องหมายนา	88.61±5.54	95.46±7.96
ใบขงโคป่า	97.47±13.48	97.54±3.40
ใบมะเดื่อหอม	84.76±3.94	94.57±5.59
ใบลายกนก	102.12±1.06	98.21±2.36
ใบระย่อนน้อยดอกขาว	94.93±2.65	92.88±4.21
รากระย่อนน้อยดอกขาว	101.23±3.40	99.81±3.85
ไมยราบ	90.27±7.34	100.88±3.23
ใบโคลงเคลง	95.08±4.57	96.10±3.64
รากโคลงเคลง	96.43±6.32	93.01±4.70
ใบค่างควาดำ	104.60±1.97	105.81±6.32
เหง้าค่างควาดำ	103.15±3.03	104.75±5.42
ใบตุงตัน	102.31±2.59	102.26±4.67
รากตุงตัน	96.19±0.96	57.32±3.77
ใบมะฮึก	100.27±1.51	103.55±2.14
รากมะฮึก	97.78±1.92	83.57±14.30
ใบหัวเดียว	96.32±2.66	107.35±13.99
เหง้าหัวเดียว	101.69±2.17	110.35±12.60
ใบไม้ลาย	93.87±3.72	105.29±8.31
ใบเข็มไอดี	101.27±1.02	108.68±9.97
รากเข็มไอดี	96.14±4.04	108.47±11.51
รากพนมสวรรค์	96.16±2.91	105.94±12.80
ลำต้นสะค้านใบพลู	101.17±3.93	32.74±17.71
ใบฝนแสนห่า	91.09±2.20	100.31±3.38
เข็มป่า	101.99±23.18	108.46±5.50
ใบพินปลา	99.15±7.07	106.07±4.02
ใบราชดัด	95.33±7.37	4.07±0.98
เปลือกพังแหรใหญ่	99.69±24.90	99.68±12.40
Aminoguanidine (50 µM)	91.7±7.8	
Indomethacin (10 µM)	94.2±9.4	

### 3.3 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ของพืชสมุนไพร

จากการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดของพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีการผลิตไนตริกออกไซด์มากขึ้นอย่างชัดเจน ( $47.53 \pm 8.93$  ไมโครโมลาร์) เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ( $3.01 \pm 2.66$  ไมโครโมลาร์) ส่วนสกัดน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ ใบมะฮิก และ ใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ  $54.21 \pm 8.70$  และ  $52.04 \pm 5.61$  ตามลำดับ และส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ รากตึงตัน ใบราชดัด ใบสาบแร้งสาบกา รากมะฮิก เหง้าเอื้องหมายนา และลำต้นสะค้านใบพลู ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ  $99.87 \pm 2.92$ ,  $97.59 \pm 6.75$ ,  $85.31 \pm 2.91$ ,  $85.31 \pm 9.95$ ,  $82.18 \pm 5.79$  และ  $80.90 \pm 7.50$  ตามลำดับ (ตารางที่ 3-3) ในขณะที่ aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ iNOS ถูกใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า AG ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้  $64.70 \pm 9.29$  %

การทดสอบการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ของส่วนสกัดของพืชสมุนไพร พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีปริมาณพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> เท่ากับ  $4967.89 \pm 1787.17$  pg/mL ในขณะที่เซลล์ควบคุมมีปริมาณพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> เท่ากับ  $146.48 \pm 95.31$  pg/mL ส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> สูงคือ ใบสาบแร้งสาบกา รากมะฮิก รากตึงตัน ใบราชดัด ใบผนแสนห้า เหง้าเอื้องหมายนา ใบเอื้องหมายนา เปลือกพังกาใหญ่ ใบมะเดื่อหอม และเข็มป่า ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> มากกว่า 80% (ตารางที่ 3-4) ในขณะที่ indomethacin (IMC) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ถูกใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า IMC ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้  $97.2 \pm 0.2$  %

นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดสมุนไพรเพียงอย่างเดียว โดยไม่ได้สัมผัสกับ LPS คือ ส่วนสกัดน้ำและเอทานอลของเหง้าเอื้องหมายนาและต้นเอื้องหมายนา ส่วนสกัดน้ำของไมยราบ ใบคางคาวดำ เหง้าคางคาวดำ รากตึงตัน รากมะฮิก รากพนมสวรรค์ และเปลือกพังกาใหญ่ ดังแสดงในตารางที่ 3-5

ตารางที่ 3-3 เปอร์เซ็นต์การกักเก็บการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซกคาไรด์

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การกักเก็บการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์			
	ส่วนสกัดน้ำ		ส่วนสกัดเอทานอล	
	10 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL
ใบสาบแร้งสาบกา	20.06±2.25	52.04±5.61	27.83±1.83	85.31±2.91
เหง้าเอื้องหมายนา	-12.79±13.53	-44.41±8.65	80.41±5.87	82.18±5.79
ใบเอื้องหมายนา	6.59±2.93	9.23±2.38]	12.02±6.27	41.32±11.14
ต้นเอื้องหมายนา	-10.95±7.16	-27.29±7.37	-7.42 ± 2.48	-29.55±9.31
ใบขงโคป่า	0.19±1.49	-1.34±5.00	4.80±1.26	16.07±4.02
ใบมะเดื่อหอม	19.27±5.81	26.31±7.56	17.14±5.25	42.62±7.93
ใบลายกนก	2.64±6.76	0.15±4.24	4.36±8.18	14.09±5.41
ใบระย้อมน้อยดอกขาว	8.15±2.13	14.09±3.24	4.62±3.89	18.86±3.13
รากระย้อมน้อยดอกขาว	10.51±4.74	8.53±6.43	19.03±5.41	29.82±3.32
ไมยราบ	10.06±7.26	6.97±2.06	22.11±3.65	46.15±10.92
ใบโคลงเคลง	10.92±3.93	10.27±4.08	14.34±8.17	45.73±12.40
รากโคลงเคลง	8.82±3.00	15.35±2.96	19.91±4.73	30.19±10.70
ใบค้ำคาวดำ	-4.02±8.20	-1.13±4.13	4.86±0.96	21.59±11.84
เหง้าค้ำคาวดำ	15.10±6.13	17.09±5.64	5.80±6.22	23.45±12.97
ใบตุงตัน	14.45±8.82	16.34±10.42	12.96±8.17	39.42±13.73
รากตุงตัน	10.95±8.77	19.87±5.90	99.20±4.34	99.87±2.92
ใบมะฮึก	25.96±6.35	54.21±8.70	-0.16±1.83	38.75±14.51
รากมะฮึก	12.95±8.96	12.07±4.51	20.84±6.65	85.31±9.95
ใบหัวเดียว	8.22±7.69	13.24±5.34	12.40±1.64	30.77±2.93
เหง้าหัวเดียว	12.17±1.00	21.83±4.58	5.90±2.52	17.50±3.74
ใบไม้ลาย	21.68±5.01	21.01±5.21	13.12±0.37	18.61±3.66
ใบเข็มไอดี	8.76±7.35	13.82±6.24	9.57±2.38	33.16±1.66
รากเข็มไอดี	7.16±5.72	-1.02±6.43	5.35±2.89	13.12±5.08
รากพนมสวรรค์	11.70±2.27	10.88±3.33	3.61±0.24	26.56±1.17
ลำต้นสะค้านใบพลู	-1.54±12.71	-8.56±17.18	22.21±2.63	80.90±7.50
ใบฝนแสนห่า	4.41±11.56	12.77±5.90	14.54±21.11	69.68±3.67
เข็มป่า	1.45±8.78	7.39±9.36	9.26±11.77	29.60±14.77
ใบพินปลา	13.39±6.83	17.88±7.16	8.45±12.89	21.10±7.93
ใบราชดัด	-2.80±4.49	14.83±6.07	98.37±4.06	97.59±6.75
เปลือกพังแหรใหญ่	3.55±7.78	-13.43±35.57	10.54±6.03	19.03±11.62

ตารางที่ 3-4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซกคาไรด์

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E <sub>2</sub>
	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)
ใบสาบแร้งสาบกา	98.03±1.47
เหง้าเอื้องหมายนา	88.42±11.24
ใบเอื้องหมายนา	86.02±15.24
ต้นเอื้องหมายนา	55.42±27.15
ใบขงโคป่า	69.94±32.10
ใบมะเดื่อหอม	84.50±24.32
ใบลายกนก	22.46±12.50
ใบระย่อมน้อยดอกขาว	21.55±5.36
รากระย่อมน้อยดอกขาว	40.27±25.24
ไมยราบ	36.31±5.16
ใบโคลงเคลง	72.37±14.32
รากโคลงเคลง	57.26±17.76
ใบค้ำคาวดำ	44.97±8.37
เหง้าค้ำคาวดำ	67.72±10.86
ใบตึงตัน	57.81±9.94
รากตึงตัน	97.18±1.85
ใบมะฮึก	-12.17±4.39
รากมะฮึก	97.35±3.26
ใบหัวเดียว	-23.62±13.09
เหง้าหัวเดียว	53.34±27.75
ใบไม้ลาย	23.42±1.66
ใบเข็มไฉเดียว	66.07±28.64
รากเข็มไฉเดียว	63.54±6.32
รากพนมสวรรค์	47.70±11.41
ลำต้นสะค้านใบพลู	46.06±7.76
ใบฝนแสนห่า	92.86±7.45
เข็มป่า	80.01±9.89
ใบพินปลา	58.28±22.51
ใบราชดัด	94.89±0.98
เปลือกพังกแหใหญ่	86.38±8.75

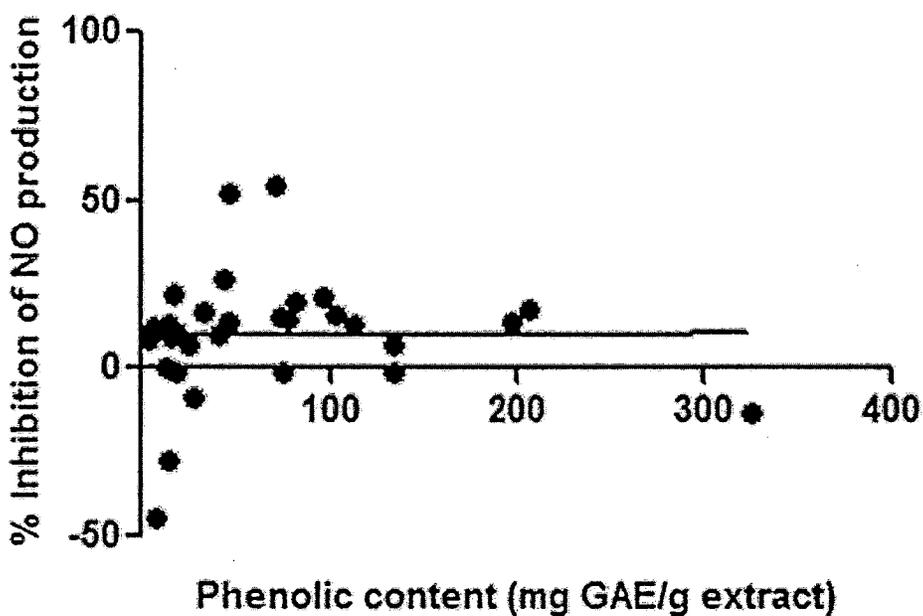
ตารางที่ 3-5 เปอร์เซ็นต์การการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดพืชสมุนไพร

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การการผลิตไนตริกออกไซด์		เปอร์เซ็นต์การการผลิตพรอสตาแกลนดิน E <sub>2</sub>
	ส่วนสกัดน้ำ (50 µg/mL)	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)
ใบสบางร้างสบากา	1.98±0.25	3.57±0.61	0.55±0.47
เหง้าเอื้องหมายนา	47.42±12.03	16.07±3.33	10.51±9.63
ใบเอื้องหมายนา	1.12±2.05	3.18±0.38	6.55±9.23
ต้นเอื้องหมายนา	75.21±7.31	76.42±6.86	8.41±8.01
ใบชงโคป่า	-0.76±3.40	2.41±0.27	1.23±1.71
ใบมะเดื่อหอม	1.29±4.42	3.70±0.67	0.64±0.56
ใบลายกนก	0.53±2.61	4.79±0.63	1.03±1.03
ใบระย่อนน้อยดอกขาว	10.37±6.36	4.79±0.57	1.57±1.66
รากระย่อนน้อยดอกขาว	0.35±2.71	2.30±1.13	7.53±2.65
ไมยราบ	75.80±7.08	3.89±0.61	4.82±0.89
ใบโคลงเคลง	-0.96±3.71	3.70±0.13	2.34±1.40
รากโคลงเคลง	-0.51±3.79	2.44±0.46	4.28±3.41
ใบค้ำควาดำ	27.36±2.91	4.38±2.55	1.24±1.24
เหง้าค้ำควาดำ	41.67±8.52	-0.29±1.54	3.70±2.64
ใบติงตัน	0.17±2.22	2.75±1.54	3.07±2.06
รากติงตัน	54.20±4.14	1.28±1.88	2.37±1.53
ใบมะฮึก	-0.46±1.83	0.00±1.55	2.53±2.17
รากมะฮึก	69.77±9.17	0.26±2.01	1.73±1.04
ใบหัวเดียว	-0.14±2.61	2.37±1.32	2.95±4.61
เหง้าหัวเดียว	9.79±13.25	0.67±1.43	3.89±3.52
ใบไม้ลาย	-0.61±1.88	2.89±0.43	2.65±1.10
ใบเข็มไอดี	0.63±1.76	2.04±1.63	4.05±2.73
รากเข็มไอดี	5.84±4.33	0.56±1.08	4.44±3.07
รากพนมสวรรค์	40.12±7.72	-1.05±3.96	2.29±1.98
ลำต้นสะค้านใบพลู	-0.49±2.42	5.32±4.78	1.89±1.69
ใบฝนแสนห่า	-3.66±4.67	4.43±7.33	4.64±2.01
เข็มป่า	-6.65±6.79	7.90±7.94	2.66±2.33
ใบฟันปลา	-4.99±4.65	-1.35±5.60	1.87±1.70
ใบราชดัด	0.61±4.78	4.11±2.76	5.05±1.19
เปลือกพังแหรใหญ่	26.99±38.64	-0.35±2.54	1.54±1.25

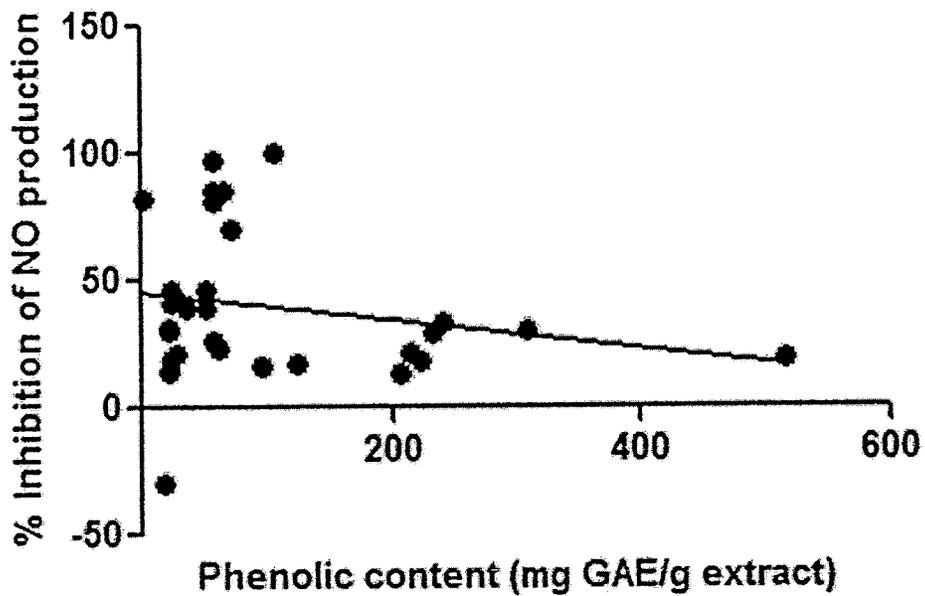
### 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสาร

#### ฟีนอลรวม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอล พบว่ามีความสัมพันธ์กันต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.000084 และ 0.0451 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3-1 และรูปที่ 3-2.



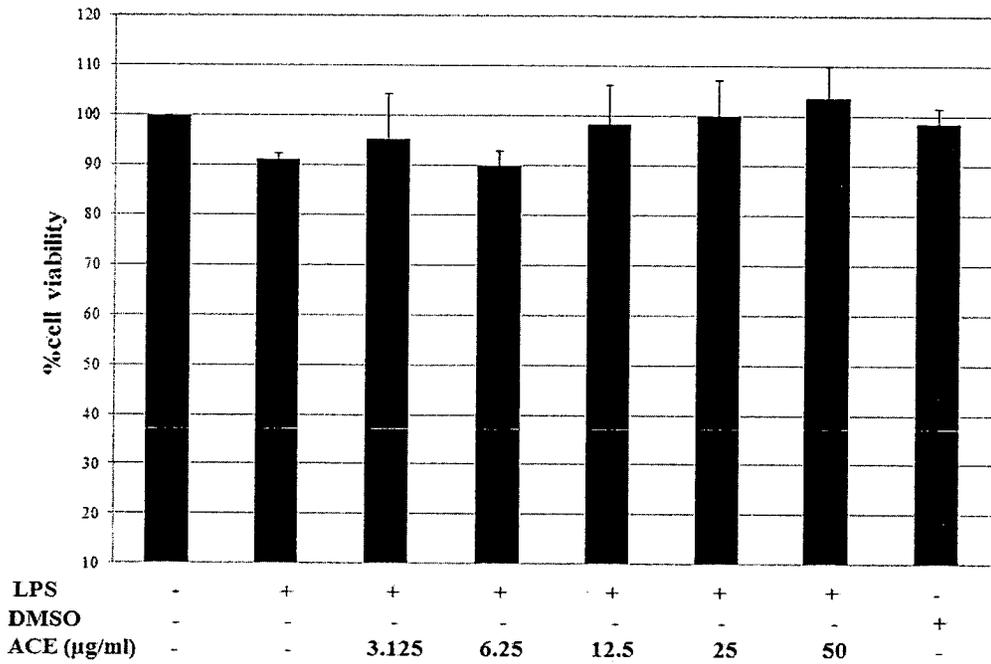
รูปที่ 3-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำ



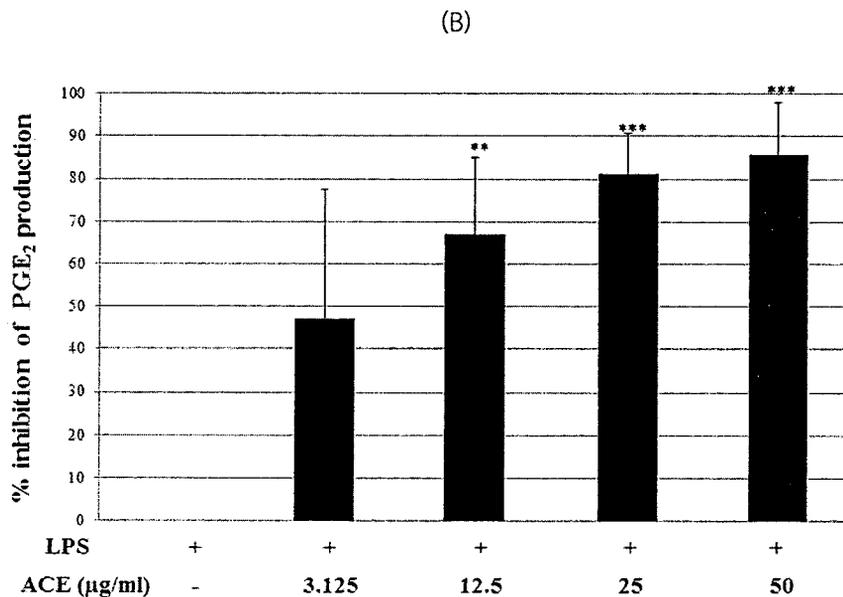
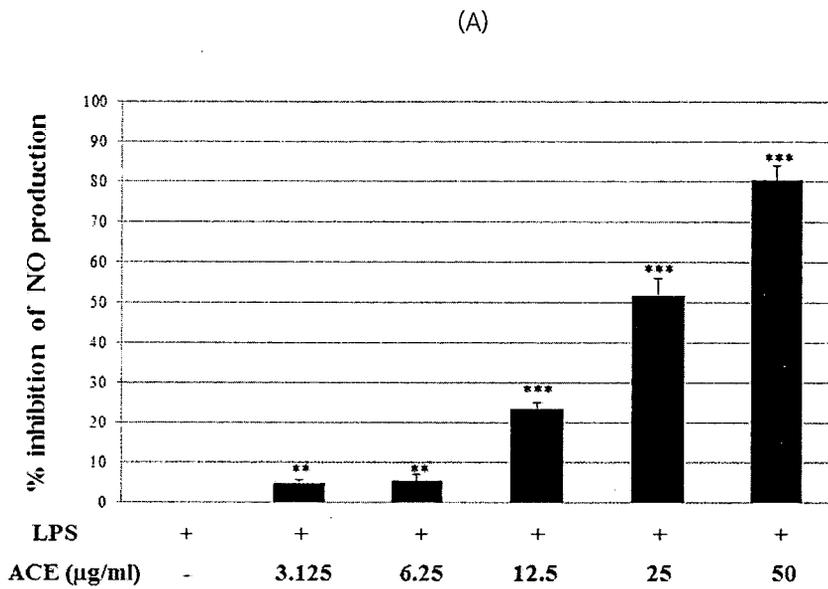
รูปที่ 3-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอล

### 3.5 กลไกการออกฤทธิ์ด้านอักเสบของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา

เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 3.125-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีค่าการมีชีวิตรอดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO (0.2%, v/v) ดังแสดงในรูปที่ 3-3 ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน  $E_2$  ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา สามารถยับยั้งได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $22.69 \pm 0.14$  และ  $25.92 \pm 5.72$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ (รูปที่ 3-4)

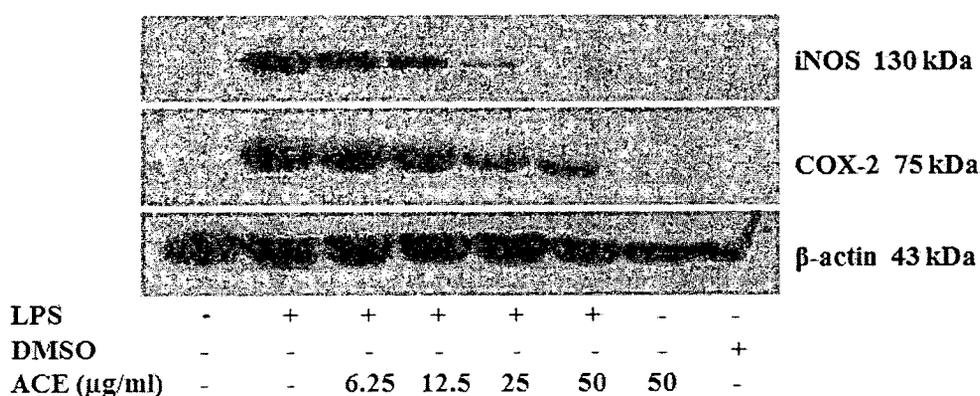


รูปที่ 3-3 ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 3.125-50 µg/mL เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3-4 ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (A) และพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> (B) ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 3.125-50 µg/ml และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนโตรท์ และพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ค่าที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ผลิตในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

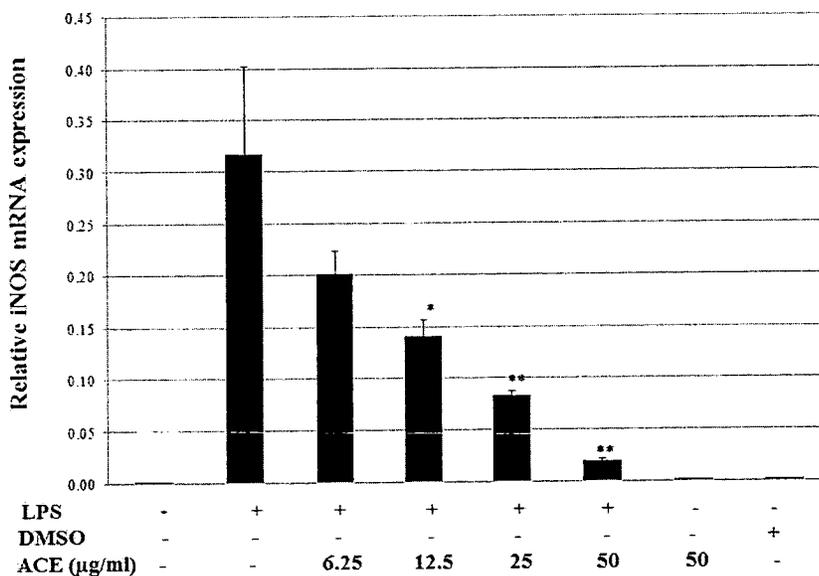
จากผลการศึกษาปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 ของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ บ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 และ 50 µg/mL ใน สภาวะที่มีและไม่มี LPS พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้มีปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เพิ่มมากขึ้น อย่างชัดเจน แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา พบว่าปริมาณ โปรตีน iNOS และ COX-2 ลดลง เมื่อความเข้มข้นของส่วนสกัดเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 3-5) ส่วนสกัดเพียง อย่างเดียวที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ไม่ทำให้ปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ เซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด หรือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2 % (ปริมาตร/ ปริมาตร) เพียงอย่างเดียว



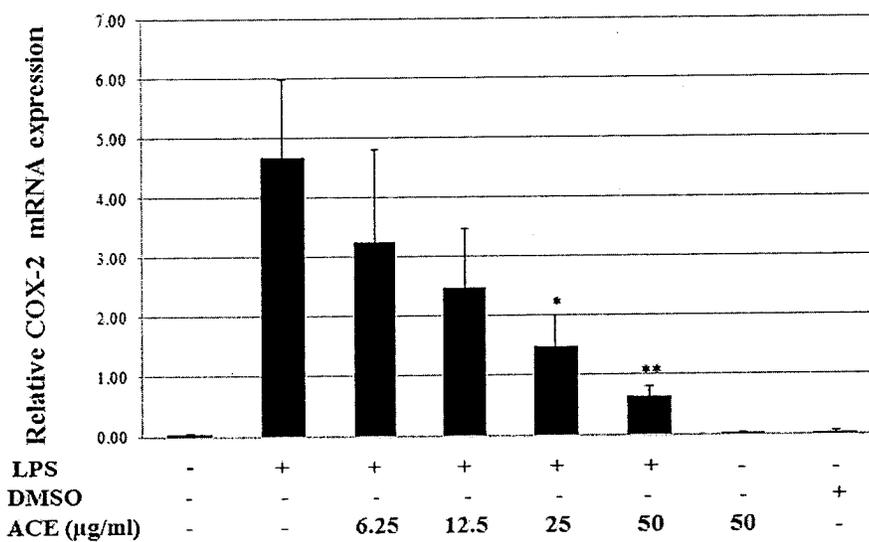
รูปที่ 3-5 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เซลล์ แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 µg/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับโปรตีน iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค Western blot analysis และภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่อยู่สละต่อกัน

จากผลการศึกษาการข้างต้นพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถลดโปรตีน iNOS และ COX-2 ได้ ดังนั้นจึงศึกษาผลของเลือกส่วนสกัดต่อปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้มีปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ควบคุม แต่การแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในระดับ mRNA ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูก บ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ในสภาวะที่มี LPS พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบ สาบแร้งสาบกาสามารถลดปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 ได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ของส่วนสกัด นอกจากนี้ส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ไม่สามารถทำให้ปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด หรือเซลล์ที่ สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 3-6

(A)

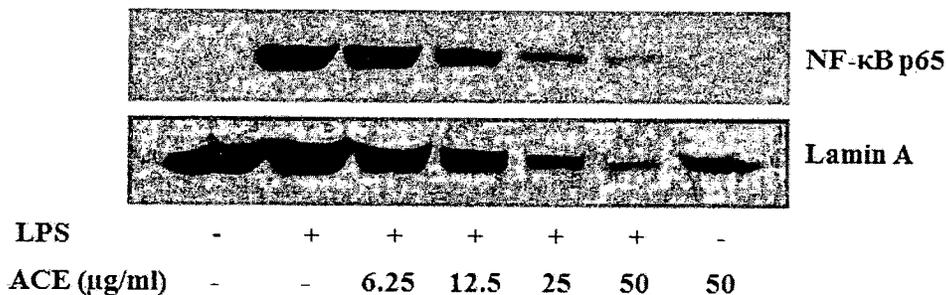


(B)



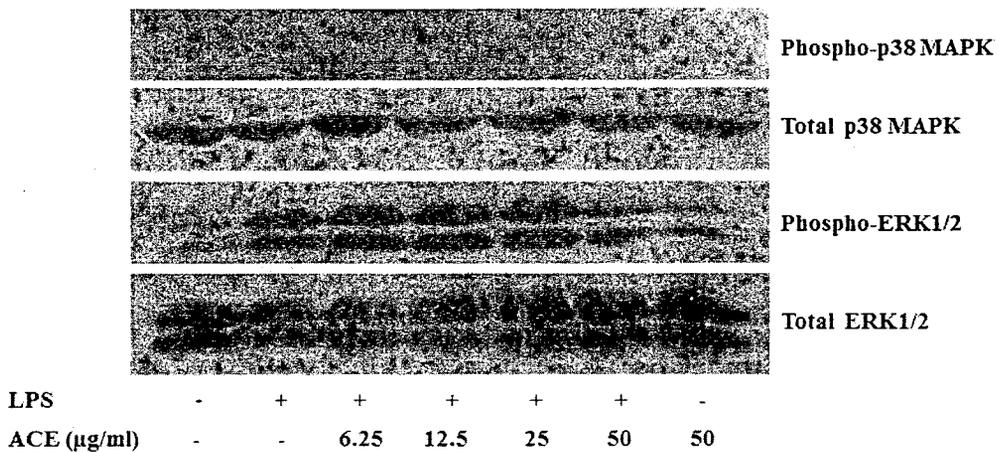
รูปที่ 3-6 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ระดับ mRNA เซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 µg/ml) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับ mRNA ของ iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค real time-RT-PCR ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อ transcription factor NF- $\kappa$ B ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ซึ่งในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- $\kappa$ B จะจับอยู่กับโปรตีน I- $\kappa$ B ทำให้อยู่ในไซโทซอล แต่เมื่อมีการกระตุ้นโดย LPS จะทำให้ I- $\kappa$ B ถูกสลายตัว และ NF- $\kappa$ B เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีน NF- $\kappa$ B p65 subunit จากนิวเคลียส โดยเทคนิค Western blotting ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน p65 ที่เป็นหน่วยย่อยของ NF- $\kappa$ B เนื่องจาก NF- $\kappa$ B มักจะปรากฏอยู่ในรูป heterodimer ระหว่าง p65 และ p50 จากการทดลองพบว่า LPS ทำให้มีการเคลื่อนที่ของ NF- $\kappa$ B p65 subunit เข้าสู่นิวเคลียส และส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา สามารถลดปริมาณโปรตีน p65 NF- $\kappa$ B ในนิวเคลียสในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (รูปที่ 3-7)



รูปที่ 3-7 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อการเคลื่อนที่สู่นิวเคลียสของโปรตีน p65 NF- $\kappa$ B เซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา เป็นเวลา 30 นาที ก่อนสัมผัสกับ LPS (1  $\mu$ g/mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากนิวเคลียสมาวิเคราะห์โปรตีน p65 NF- $\kappa$ B โดยเทคนิค Western blot analysis และภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่อยู่สละต่อกัน

เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS ปริมาณโปรตีน ERK และ p38 MAPK ที่ถูกฟอสโฟรีเลชัน (p-ERK และ p-p38 MAPK ตามลำดับ) เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาที่ความเข้มข้น 6.25–50  $\mu$ g/mL ในสภาวะที่มี LPS พบว่า ปริมาณโปรตีน p-ERK และ p-p38 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ g/mL เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน p-ERK และ p-p38 ไม่แตกต่างกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (รูปที่ 3-8)



รูปที่ 3-8 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อ MAPKs เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml เป็นเวลา 30 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ERK, p38 และ JNK โดยวิธี Western blot ภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่อยู่สละต่อกัน