บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด ที่ถูกใช้แก้อาการอักเสบ แก้ไข้ แก้บวม และแก้ฝี เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพร ทั้งในส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอล และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม จากคำบอกเล่าของหมอยาพื้นบ้านถึงวิธีการนำพืชสมุนไพรไปใช้ในการรักษาตามตำรายาพื้นบ้านคือ การต้มด้วยน้ำและดองกับสุรา ในการศึกษานี้จึงเลือกวิธีการสกัดพืชสมุนไพรโดย การสกัดด้วยน้ำร้อน และเอทานอล

ร้อยละของน้าหนักแห้ง (% yield) ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด แสดงในตารางที่ 3-1 พบว่าส่วนสกัดน้าของสมุนไพรทุกชนิด (3.45-37.58 %) มีน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดเอทานอล (2.1-25.52 %) ยกเว้นส่วนสกัดลำต้นสะค้านใบพลู และเปลือกพังแหรใหญ่ ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Diaz et al. (2012) ที่รายงานว่าการสกัดพืชสมุนไพรจีนบางชนิดด้วยน้ำร้อนให้น้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลาย 95 % เอทานอล ในการศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 60 ส่วนสกัด เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลหลายชนิดแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบได้ (Huang et al., 2006; Himaya et al., 2010) จากผลการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 3-1 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดเอทานอลมีค่าระหว่าง 1.55 $\pm$ 0.20 ถึง 515.27 $\pm$ 14.70 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด และปริมาณที่พบในส่วนสกัดน้ำคือ 4.09 $\pm$ 0.20 ถึง 325.74 + 13.62 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ส่วนสกัดของสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด พบว่าส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำของเปลือกพังแหรใหญ่มีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลในพืชสมุนไพรชนิดเดียวกัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากส่วนสกัดเอทานอล มีปริมาณสูงกว่าในส่วนสกัดน้า ยกเว้น เหง้าเอื้องหมายน้ำ ใบมะเดื่อหอม ใบระย่อมน้อยดอกขาว ใบดีงูต้น ใบมะฮึก ใบฝนแสนห่า และใบราชดัด ในขณะที่การศึกษาของ Zhang et al. (2011) Diaz et al. (2012) และ Ravipati et al. (2012) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลรวมในพืชสมุนไพรจีนชนิดต่างๆ ด้วยน้ำและเอทานอลให้ปริมาณที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ศึกษา การสกัดพืชด้วยเอทานอล หรือเมทานอลจะได้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล และพอลิแซคคาไรด์ ส่วนการสกัดด้วยน้ำนั้นจะได้สารกลุ่มที่เป็นไกลโคไซด์ และสารกลุ่มที่มีขั้วสูงกว่า (Misan et al., 2011: Jayaprakasha et al., 2008)

แมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในขณะที่มีการอักเสบ จากการศึกษาในเซลล์ไลน์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้มีการ

หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 (Huang et al., 2009) ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ซึ่งเป็นดัชนีที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารทดสอบ โมเดลจำลองการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Srisook et al., 2011: Zhang et al., 2011 และ Ravipati et al., 2012) รวมทั้งในการศึกษานี้ ผลการทดลองพบว่าพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้แตกต่างกัน โดยส่วนสกัดเอทานอลของพืชทุกชนิด ยกเว้นใบมะฮึก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูง และไม่มีพิษต่อเซลล์ นั่นคือ มีความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80% ได้แก่ ใบมะฮึก (54.21±8.70 %) และใบสาบแร้งสาบกา (52.04±5.61 %) ส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูงและไม่มีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ ได้แก่ ใบสาบแร้งสาบกา (85.31±2.91 %) และรากมะฮึก (85.31±9.95 %) แสดงถึงการลดลงของปริมาณไนตริกออกไซด์ไม่ได้เป็นผลมาจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดพืชเหล่านี้ ในขณะที่ส่วนสกัดเอทานอลของรากดีงูต้น ใบราชดัด เหง้าเอื้องหมายนา และลำต้นสะค้านใบพลู ที่ความเข้มข้น 50 μg/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูง (99.87±2.92, 97.59±6.75, 82.18±5.79 และ 80.90±7.50 % ตามลำดับ) แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเหลือเพียง 57.32±3.77, 4.07±0.98, 2.62±0.30 และ 32.74±17.71 % ตามลำดับ ดังนั้นการที่มีปริมาณไนตริกออกไซด์น้องลง อาจเนื่องมาจากการตายของเซลล์เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัด ไม่ใช่เกิดจากฤทธิ์ของส่วนสกัดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

จากการทดสอบข้างต้นพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรเกือบทั้งหมดมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ดังนั้นจึงนำเฉพาะส่วนสกัดเอทานอลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 สูง และไม่มีพิษต่อเซลล์ คือ ใบสาบแร้งสาบกา รากมะฮึก ใบฝนแสนห่า ใบเอื้องหมายนา เปลือกพังแหรใหญ่ ใบมะเดื่อหอม และเข็มป่า ที่ความเข้มข้น 50 μg/mL มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 มากกว่า 80% แสดงถึงการลดลงของปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 ไม่ได้เป็นผลมาจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัด แต่เป็นผลจากส่วนสกัดของพืชที่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลของส่วนสกัดน้ำ และส่วนสกัดเอทานอลของพืชทั้ง 21 ชนิด เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลเป็นสารหลักของพืชที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Zhang et al., 2011: Ravipati et al., 2012) ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของพืชทั้ง 21 ชนิด ทั้งในส่วนของสารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทานอล พบว่ามีความสัมพันธ์ต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.000084 และ 0.0451 ตามลำดับ แสดงว่าสารที่

ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในส่วนสกัดน้ำ และส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด อาจเป็นสารประกอบฟีนอลบางชนิดเป็นตัวออกฤทธิ์ หรือเป็นสารกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล ที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานว่าความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ไม่ได้แปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดของ *Sophora flavescens*, *Eucommia ulmoides*, *Baccharis genistelloides*, *Tinospora capilipes*, *Actinidia arguta* และ *Paris polyphylla* (Zhang et al., 2011; Diaz et al., 2012 และ Ravipati et al., 2012)

ต่อมาได้เลือกส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกามาทดสอบหากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ เนื่องจากส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้สูง โดยไม่มีพิษต่อเซลล์ มีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่าใบสาบแร้งสาบกามีฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองหลายโมเดล Moura et al. (2005) รายงานว่าใบสาบแร้งสาบกาสามารถลดการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบก้อนเฉียบพลัน (cotton pellet-induced granuloma) และแบบเรื้อรัง (formaldehyde-induced arthritis) ในปี ค.ศ. 2011 Biradar และคณะ พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถยับยั้งการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดอาการของโรคลำไส้อักเสบอักเสบเรื้อรัง (Inflammatory bowel disease) ในโมเดล acetic acid-induced colitis และ indomethacin-induced enterocolitis นอกจากนี้ยังมีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาในหนูโมเดล carrageenan-induced paw edema แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของใบสาบแร้งสาบกา ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E_2 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกายังลดการเคลื่อนที่ของ NF-ΚB p65 subunit เข้าสู่นิวเคลียส และลดการฟอสโฟริเลชันของ p-ERK และ p-p38 MAPK ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบโดยลดการกระตุ้น NF-ΚB และ MAPKs ทำให้มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนสำหรับเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ในที่สุด การที่ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในหนูทดลอง ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ เพราะในขณะที่มีการอักเสบในสัตว์ทดลองจะมีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ออกมา (Buapool et al., 2013) ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะสนับสนุนการนำใบสาบแร้งสาบกาไปใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในใบสาบแร้งสาบกา ที่อาจนาไปใช้พัฒนาเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่ในอนาคต

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. ส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพร

2. ส่วนสกัดของพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีได้แก่ ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา และรากมะฮึก

3. กลไกระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของใบสาบแร้งสาบกาในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS วิถีทางหนึ่งเกิดผ่านการลดการกระตุ้น NF-κB และ p-ERK และ p-p38 MAPK ทำให้มีการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 และลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ในที่สุด