



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง

โดย

นางสาวนุตติยา วีระวัธนชัยและคณะ

ธันวาคม 2557



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง

(The Study of Analgesic Activity of the Extract from *Allium ascalonicum*)

คณะผู้วิจัย

นางสาวนุตติยา วีระวัณชัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

นางสาวระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554 และ 2555

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ระดับปวดของสารสกัดหอมแดงนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคล และหน่วยงานต่อไปนี้ที่มีส่วนร่วมให้ความช่วยเหลือ จนโครงการวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. บังอร ศรีพานิชกุลชัย ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรและคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งและกรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา คณบดี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่อนุญาตให้คณะผู้วิจัยได้ใช้เครื่องมือ สถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีและห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่มีส่วนช่วยเหลือให้ข้อคิดที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ National Research Council of Thailand-Japan Society for the Promotion of Science (NRCT-JSPS) joint research program ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยระยะสั้น ณ ประเทศญี่ปุ่น Effect of Shallot Extract on the Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2554-2555 ในการทำวิจัย

รายงานการวิจัยเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง
หัวหน้าโครงการวิจัย	นางสาวนุติยา วีระวัชรชัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสาวระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์
ปีงบประมาณ	2555
คำสำคัญ	หอมแดง กระเทียม ฤทธิ์ระงับปวด ฤทธิ์ต้านอักเสบ iNOS COX-2 COX-1 TNF- α IL-1 β IL-6 ปริมาณสารฟีนอลรวม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

บทคัดย่อ

หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) และกระเทียม (*Allium sativum* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันดีและถูกใช้อย่างแพร่หลาย การศึกษาครั้งนี้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนหัวของหอมแดงและส่วนหัวของกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและกระเทียม ในหนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR ด้วยวิธี Hot-plate และ tail-flick จับเวลาที่หนูสามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนหรือเวลาที่หนูทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหาง ก่อนให้สารทดสอบในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ น้ำเกลือ (10 มล./กก. ทางช่องท้อง) มอร์ฟีน (10 มก./กก. ทางช่องท้อง) สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขนาด 100-1200 มก./กก. ทางช่องท้อง หลังให้สารทดสอบ ทำการจับเวลาที่หนูสามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนหรือเวลาที่หนูทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหางที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 นาที คำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สูงสุดที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ (% maximum possible effect, %MPE) แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง %MPE และเวลา พบว่า สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมทุกขนาดที่ใช้ในการทดสอบไม่มีฤทธิ์ระงับปวด การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ด้วยสาร *E. coli* Lipopolysaccharide ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่มีความเข้มข้น 0.0625-0.250 มก./มล. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทำการวัดปริมาณยีนที่แสดงออกด้วย reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมมีฤทธิ์

ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น สารสกัดกระเทียมยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และ COX-1 ในขณะที่สารสกัดหอมแดงยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 และไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน COX-2 ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมน่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS เอนไซม์ cyclooxygenase และสาร pro-inflammatory cytokines การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและกระเทียมโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสาร Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟีนอลรวม เป็น 15.964 ± 0.122 และ 4.020 ± 0.009 มก.สมมูลกับกรดแกลลิก/ก. ของสารสกัด ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอลูมิเนียมคลอไรด์ พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเป็น 11.742 ± 0.012 และ 7.669 ± 0.038 มก.สมมูลกับสารเคอร์ซีทิน/ก. ของสารสกัด ตามลำดับ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในการรักษาภาวะข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอื่นและควรทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป

Research Title	The Study of Analgesic Activity of the Extract from <i>Allium ascalonicum</i>
Head of Project	Nuttiya Werawattanachai
Co-researcher	Rawiwun Kaewamatawong
Fiscal Year	2012
Keywords	shallot, garlic, analgesic action, anti-inflammatory action, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, total phenolic compounds, total flavonoid compounds

ABSTRACT

Shallot (*Allium ascalonicum* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) are well known and widely used medicinal herb. This study was aimed to investigate the biological activities of the ethanolic extracts obtained from the bulbs of shallot and garlic. The antinociceptive activity of the extracts of shallot and garlic were determined using hot-plate and tail-flick models in mice. Hot-plate and tail-flick latencies were determined in male ICR mice prior to the administration of normal saline solution (10 ml/kg, i.p.), morphine (10 mg/kg, i.p.), and various doses of shallot and garlic (100-1200 mg/kg, i.p.) and were subsequently determined at 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 min. The mean percent maximum possible effect (%MPE) were calculated and used in the determination of the area of analgesia (%MPE-min). All doses of shallot and garlic extracts did not produce analgesic response in the hot-plate and tail-flick tests. The anti-inflammatory effects of shallot and garlic extracts on *E. coli* lipopolysaccharide (*E. coli* LPS) induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in the murine macrophage cell line RAW 264.7 were examined. In MTT assays, shallot and garlic extracts at the concentration 0.0625-0.250 mg/ml did not show any significant cytotoxic

effect on RAW 264.7. The gene expressions were investigated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that shallot and garlic extracts significantly attenuated the expression of iNOS, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in a concentration-dependent manner. The garlic extract caused reduction in *E. coli* LPS -induced COX-2 and COX-1 mRNA expression. The shallot extract suppressed production of mRNA for COX-1, while did not significantly affect COX-2. These results suggest that the anti-inflammatory properties of shallot and garlic extracts may be due to the inhibitory effects on iNOS, cyclooxygenase enzymes and pro-inflammatory cytokines. Total phenolic content analysis were performed by Folin-Ciocalteu reaction. The total phenolic compounds of shallot and garlic extracts were 15.964 ± 0.122 , 4.020 ± 0.009 mg gallic acid equivalent. g⁻¹ plant extract, respectively. Total flavonoid contents were determined by aluminium chloride colorimetric method. Total flavonoid contents of shallot and garlic extracts in term of quercetin equivalent were 11.742 ± 0.012 , 7.669 ± 0.038 mg quercetin equivalent. g⁻¹ plant extract, respectively. This study supports the traditional use of shallot and garlic for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory disorder and further investigations are required to determine the active compounds responsible for the potent anti-inflammatory activity of the ethanolic extracts of shallot and garlic.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ง
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ฅ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 หอมแดง	5
2.2 กระเทียม	6
2.3 ความเจ็บปวด	8
2.4 การอักเสบ	10
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	14
3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และสัตว์ทดลอง	14
3.1.1 สารเคมี	14
3.1.2 วัสดุอุปกรณ์	14
3.1.3 สัตว์ทดลอง	15

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากหอมแดง (<i>Allium ascalonicum</i> L.) และสารสกัดจากกระเทียม (<i>Allium sativum</i> L.) ในเอทานอล	15
3.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการระงับความปวดในสัตว์ทดลอง	18
3.2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Hot-Plate Method	18
3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Tail-Flick Method	20
3.2.3 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7	22
3.2.3.1 การเลี้ยงเซลล์	22
3.2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT reduction assay	22
3.2.3.3 การศึกษาผลสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	23
3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compound) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin- Ciocalteus	26
3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compound) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม	28
3.3. การรายงานผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	30
3.4 สถานที่ทำการวิจัย	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	32

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอล	32
4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมในเอทานอลในสัตว์ทดลอง	33
4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Hot plate test	33
4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Tail-Flick test	36
4.3 ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7	39
4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมด้วย MTT Test	39
4.3.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค RT-PCR	40
4.3.2.1 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS	41
4.3.2.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-2	44
4.3.2.3 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-1	47
4.3.2.4 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน TNF- α	50
4.3.2.5 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β	53
4.3.2.6 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-6	56
4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin-Ciocalteus	59
4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม	61
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	63
5.1 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	63

5.2 ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	78
การขอรับใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	79
การดำเนินการขออนุญาตซื้อขายเสพติดให้โทษประเภทที่ 2 จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา	82
NRCT-JSPS RESEARCH REPORT PRELIMINARY STUDY“Effect of Shallot Extract on the Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2”	93
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)	106
6.1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Cancer cell growth inhibition) ได้แก่	107
- เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB: human oral cavity carcinoma ATCC CCL-17)	
- เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7: human breast adenocarcinoma ATCC HTB22)	
- เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187: human small cell lung carcinoma ATCC CRL-5804)	
6.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cells)	108
6.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ <i>Candida albicans</i>	108
6.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H ₃₇ Ra)	109
6.5 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคใบไหม้ในข้าว <i>Magnaporthe grisea</i>	110
6.6 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคเมล็ดต่างในข้าว <i>Curvularia lunata</i>	111
6.7 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก <i>Bacillus cereus</i>	111
6.8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuramidase ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1	112
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	114
POSTER PRESENTATION In 18th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN)	117

“Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness”

December 1-3, 2014: Ubon Ratchathani, THAILAND

Manuscript สำหรับการตีพิมพ์ในวารสารงานวิจัยระดับนานาชาติ

121

ประวัตินักวิจัย

134

สารบัญตาราง

	ตาราง	หน้า
ตารางที่ 3-1	Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR	24
ตารางที่ 3-2	ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA	25
ตารางที่ 3-3	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม	27
ตารางที่ 3-4	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม	29
ตารางที่ 4-1	แสดงน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบ ค่า % yield และลักษณะของสารสกัดหยาบจากส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียม	33
ตารางที่ 4-2	Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว	35
ตารางที่ 4-3	Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงในเอทานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว	38
ตารางที่ 4-4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอล	62
ตารางที่ 6-1	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยศูนย์ BIOTEC	116

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 3-1 ตัวอย่างหัวหอมแดงและหัวกระเทียม	16
รูปที่ 3-2 การหมักหัวหอมแดงและหัวกระเทียม	16
รูปที่ 3-3 การระเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator	17
รูปที่ 3-4 การทำให้สารสกัดแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer	17
รูปที่ 3-5 เครื่องมือ Hot-plate analgesia meter	18
รูปที่ 3-6 Mouse restrainer และเครื่องมือ Tail-flick analgesia meter	20
รูปที่ 4-1 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบของหอมแดงและกระเทียมที่ผ่านการทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer	32
รูปที่ 4-2 Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว	34
รูปที่ 4-3 Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว	37
รูปที่ 4-4 ลักษณะเซลล์ Murine macrophage RAW 264.7 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	39
รูปที่ 4-5 ผลของสารสกัดสารสกัดหอมแดง (Shallot) และสารสกัดกระเทียม (Garlic) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรื้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อทดสอบด้วย MTT Assay	40
รูปที่ 4-6 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	42
รูปที่ 4-7 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสาร	43

	สกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)	
รูปที่ 4-8	ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	45
รูปที่ 4-9	ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)	46
รูปที่ 4-10	ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	48
รูปที่ 4-11	ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)	49
รูปที่ 4-12	ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	51
รูปที่ 4-13	ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)	52
รูปที่ 4-14	ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	54
รูปที่ 4-15	ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสาร	55

- สกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)
- รูปที่ 4-16 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 57
- รูปที่ 4-17 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3) 58
- รูปที่ 4-18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Phenolic Compounds ด้วยวิธี Folin-Ciocalteus 60
- รูปที่ 4-19 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Quercetin (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Flavonoid Compounds 62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ก.	=	กรัม
กก.	=	กิโลกรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มคก.	=	ไมโครกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
AUC	=	Area under the curve
COX-1	=	Cyclooxygenase-1
COX-2	=	Cyclooxygenase-2
DMEM	=	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
<i>E. coli</i> LPS	=	<i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide
iNOS	=	inducible nitric oxide synthase
LPS	=	lipopolysaccharide
%MPE	=	percent of maximum possible effect
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	=	Nitric oxide
TNF- α	=	Tumor necrosis factor-alpha
%	=	ร้อยละ
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
Kg	=	กิโลกรัม
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
nm	=	นาโนเมตร

μg = ไมโครกรัม

μl = ไมโครลิตร

M = โมลาร์

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ความเจ็บปวด (pain) เป็นประสบการณ์ที่ไม่พึงพอใจทั้งทางด้านความรู้สึกและอารมณ์ โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายหรือศักยภาพในการทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อของร่างกาย กลไกการเกิดความเจ็บปวดประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ประการคือ สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด ตัวรับความรู้สึกเจ็บปวด (Nociceptors) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วร่างกาย เช่น ผิวหนัง อวัยวะภายใน หลอดเลือด หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ และวิถีประสาทนำความรู้สึกเจ็บปวด (Pain impulse pathways) ที่รับสัญญาณขึ้นไปสู่สมองเพื่อแปลเป็นความรู้สึก และมีการแสดงออกทางพฤติกรรมต่าง ๆ เพื่อตอบสนองสิ่งที่กระตุ้น ความเจ็บปวดเป็นอาการที่พบได้บ่อย ๆ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบ หรืออาจเกิดจากการที่มีสิ่งกระตุ้น เช่น ความร้อน แสงกล สารเคมี มาทำให้เจ็บปวดโดยตรง (อานวย ธิฐาพันธ์, 2009)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ภายในร่างกายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง หรือสิ่งกระตุ้นที่ก่ออันตรายเช่น จุลชีพ เพื่อพยายามขจัดสิ่งที่ก่อให้เกิดอันตรายนั้นออกไป รวมทั้งเพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย การอักเสบก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดเล็ก ๆ ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือดรั่วสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์และมีการเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น Prostaglandins (PGs) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) Leukotrienes (LTs) Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL), platelet activating factor (PAF), bradykinin, histamine, interferons (IFN) และ complement system โดยสารเคมีต่างๆ เหล่านี้จะกระตุ้นเซลล์ประสาทส่วนปลายในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ และในระบบประสาทส่วนกลางทำให้ร่างกายมีความรู้สึกเจ็บปวดเกิดขึ้น (ปราโมทย์ มหคุณากร, 2553)

สาร NO และ prostaglandins PGE_2 ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage โดยเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS)

ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จัดเป็น inducible enzyme โดยจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นจำนวนมากด้วยสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อนอย่างต่อเนื่องหากสารสื่อกลางการอักเสบนี้มีมากขึ้นและพบเป็นระยะเวลานานในร่างกายอาจทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังและเกิดโรคเสื่อมต่างๆ ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ภาวะช็อกที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้ออย่างรุนแรงทั่วร่างกาย (Calixto et al., 2004) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS, COX-2 และการยับยั้งการหลั่งของ สาร TNF- α , IL-1 β และ IL-6 จึงเป็นแนวทางหลักสำคัญทางหนึ่งในการควบคุมการอักเสบได้

การรักษาอาการเจ็บปวดและการอักเสบในปัจจุบันมักใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) แม้จะให้ผลการรักษาดีแต่อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น เกิดแผลในกระเพาะอาหารและมีความเป็นพิษต่อไต ปัจจุบันมียารุ่นใหม่ที่มีฤทธิ์ข้างเคียงเหล่านี้ลดลงแต่มีราคาค่อนข้างแพง เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดเป็นแหล่งของยาที่สำคัญ เนื่องจากพืชเหล่านี้มักจะมีสารสำคัญหลายชนิด และแต่ละชนิดก็ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวางและถูกนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ รวมถึงใช้เป็นยารักษาโรคได้อีกด้วย การพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์นับเป็นทางหนึ่งที่จะช่วยลดการเสียดุลทางเศรษฐกิจและเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผู้ที่มีความเจ็บปวดหรือมีอาการอักเสบมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

หอมแดงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มีการปลูกมากทั้งในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หอมแดง มีชื่อภาษาอังกฤษ คือ shallot และชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Allium ascalonicum* L. จัดเป็นพืชในสปีชีส์ *Allium* โดยตัวอย่างพืชในสปีชีส์นี้ได้แก่ กระเทียม (*Allium sativum* L.) หอมใหญ่ (*Allium cepa* L.) ปัจจุบันพบผลิตภัณฑ์กระเทียมออกวางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งได้รับความนิยมและการยอมรับจากผู้บริโภคว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด และใช้ในผู้ป่วยหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) ไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) ลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และเบาหวาน (diabetes) (Banerjee and Maulik, 2002)

รายงานการวิจัยที่แสดงฤทธิ์ระงับปวดของหอมแดง ได้แก่ Owoyele และคณะ (2006) ทำการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดของ *Allium ascalonicum* ในเมธานอลและในชั้นน้ำ พบว่า สารสกัดในชั้นเมธานอลสามารถระงับปวดได้ดีใน formalin test ในหนูขาว และสามารถระงับปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิด

ความเจ็บปวดด้วยความร้อน ในขณะที่สารสกัด *Allium ascalonicum* ในชั้นน้ำมันฤทธิ์ระงับปวดที่อ่อน Oloyede และคณะ (2008) รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องดื่มสมุนไพร (herbal cocktail) JOLOO ที่มีส่วนสกัดของหอมแดงในสูตรเครื่องดื่มสมุนไพร เมื่อเมื่อให้เครื่องดื่มสมุนไพรดังกล่าวในหนูทดลองในขนาด 400-1600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แสดงฤทธิ์ระงับปวดใน formalin pain model , acetic acid induced abdominal constriction และใน mouse hot-plate test โดยมีค่า reaction time นานกว่ากลุ่มควบคุม

จากการที่หอมแดงเป็นพืชทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นพืชในวงศ์เดียวกับกระเทียม และมีศักยภาพในการระงับปวด ด้านอักเสบ ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ระงับปวด กลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS ให้มีการแสดงออกของยีนที่เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบและเป็นสารสื่อกลางในการอักเสบ ได้แก่ inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ตลอดจนทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมเพื่อจะให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนให้นำไปสู่การพัฒนาสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมเป็นยา ระงับปวด ด้านอักเสบเพื่อใช้ประโยชน์ในทางคลินิกต่อไป นับเป็นการเพิ่มคุณค่าของพืชสมุนไพรพื้นบ้านและส่งเสริมและสนับสนุนการใช้สมุนไพรไทยประจำท้องถิ่นอย่างมีเหตุผล

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเอธานอล ในหนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR ด้วยวิธี Hot-plate และ Tail-flick
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ด้วยสาร *E. coli* LPS
3. วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลโดยใช้

ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสาร Folin-Ciocalteu

4. วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอลูมิเนียมคลอไรด์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมโดยเลือกทดสอบในสารสกัดที่ใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดในสัตว์ทดลอง และศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัด เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินความเป็นไปได้ในการพัฒนาหอมแดงเป็นยาต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์แก้ปวด ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่ายในประเทศ
2. ได้รับข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม ที่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS
3. เป็นข้อมูลวิทยาศาสตร์สนับสนุนสรรพคุณของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน โดยเผยแพร่ความรู้ให้แก่ประชาชนทั่วไป เป็นการส่งเสริมและสนับสนุนการใช้สมุนไพรไทยประจำท้องถิ่นอย่างเหมาะสม
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยในมนุษย์ ต่อไป เช่น การวิจัยทางเภสัชจลนศาสตร์ หรือการวิจัยทางคลินิก
5. เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่หาได้ง่ายในประเทศ นำไปสู่การพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

(Literature Review)

2.1 หอมแดง

หอมแดง (shallot) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Allium ascalonicum* Linn. ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ หอมแดง หอมเล็ก หอมหัว หอมไทย (ภาคกลาง) หอมบัว หอมบัว (ภาคเหนือ) หัวหอมแดง (ภาคใต้) ปะเข้ซ่า (ปะเหลียง-แม่ฮ่องสอน) ปะเขอก่อ (กระเหรี่ยง-ตาก) ส่วนที่ใช้คือส่วนต้นหรือส่วนหัว หัวหอมแดงเป็นทั้งเครื่องเทศและสมุนไพร จัดเป็นพืชในสปีชีส์ *Allium*สรรพคุณของหอมแดง ได้แก่ ส่วนหัวใช้ขับลมในลำไส้ แก้ไข้ ขับเสมหะ เจริญไฟธาตุ แก้อาการเมาค้างจากเหล้า บำรุงหัวใจ ฆ่าพยาธิ แก้อาการชักในเด็ก แก้อาการอักเสบต่าง ๆ แก้อักเสบเพราะตะปูและหนามตำ แก้พิษปวดแสบปวดร้อนจากไฟลวก น้ำร้อนลวก แก้พิษสัตว์กัดต่อย องค์ประกอบทางเคมีที่พบ ได้แก่ สาร allicin, *Allium ascalonicum* lectin, *allium ascalonicum* lectin AAA, arbutin และ calcium oxalate (นันทวัน บุญยะประภัศร์และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2543) และพบสาร flavonoids ได้แก่ quercetin aglycone และ quercetin glucosides (Wiczowski, et al., 2008)ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Amin and Kapadnis, 2005) ต้านเชื้อรา (Yin. and Tsao, 1999; Wang and Ng, 2002) ต้านการชัก ลดความดันโลหิต แก้ปวด ทำให้หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ กระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก มีผลต่อระบบเลือด ละลายไฟบริน ทำให้ลิ่มเลือดสลายตัวเร็วขึ้น ลดคลอเรสเตอรอล ยับยั้งการเกิดเนื้องอก ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้ คลายกล้ามเนื้อเรียบ สารสกัดหอมแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Leelarungrayub, et al., 2004; Leelarungrayub, et al., 2006) สามารถช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์ต่อไตของยา cyclosporine ในหนูขาว (Wongmekiat, et al., 2008) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวที่ได้รับการกระตุ้นให้มีภาวะดื้อต่ออินซูลินด้วยฟรุคโตส (Jalal et al., 2007) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Seyfi et al., 2010) ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Mohammadi-Motlagh et al., 2011).

Oloyede AM และคณะ (2008) รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องดื่มสมุนไพร (herbal cocktail) JOLOO ที่มีส่วนสกัดของหอมแดงในสูตรเครื่องดื่มสมุนไพร โดย JOLOO ประกอบด้วยพืชสมุนไพร

ของประเทศแอฟริกา จำนวน 7 ชนิด คือสารสกัดจากเมล็ดของพืช *Butyrospermum paradoxum* (PCGH 437), เปลือกลำต้นของ *Securidata longepunculata* (PCGH439), ลำต้นของ *Tetrapleura tetraptera* (PCGH 382), ส่วนใบของ *Hoslurdia opposita* (PCGH 322), เมล็ดของ *Xylopia aethiopica* seed (PCGH 441), ลำต้นของ *Olex subscorpioidea* (PCGH 438) และไม่ปรากฏส่วนที่ใช้ของ *Allium ascalonicum* (PCGH 440) ในอัตราส่วน 5:1:3:2:4:1:3 เมื่อให้สูตรเครื่องต้มสมุนไพรดังกล่าวในหนูทดลองในขนาด 400-1600 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แสดงฤทธิ์ระงับปวดใน formalin pain model , acetic acid induced abdominal constriction และใน mouse hot-plate test โดยมีค่า reaction time นานกว่ากลุ่มควบคุม

Owoyele และคณะ (2006) ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในหนูขาวของสารสกัด *Allium ascalonicum* ในเมธานอลและในชั้นน้ำ ในขนาด 50-200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ด้วยวิธี albumin-induced paw edema พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้โดยสามารถลดการอักเสบแบบเฉียบพลันของเท้าหนูที่ได้รับการชักนำให้เกิดการบวมด้วยสาร albumin ได้คิดเป็นร้อยละ 40.5-85.5 และสารสกัดในชั้นเมธานอลสามารถลดการบวมของเท้าหนูได้ดีกว่าสารสกัดในชั้นน้ำ Mohammadi-Motlagh และคณะ (2011) รายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบเมื่อทดสอบด้วยวิธี acetic acid induced vascular permeability พบว่าสารสกัด *Allium ascalonicum* ในชั้นน้ำ ในขนาด 50-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้โดยการป้อนทางปากในหนูถีบจักร พบว่าสามารถลดสภาวะการซึมผ่านของสาร Evans blues ผ่านผนังหลอดเลือด เข้ามาอยู่ในช่องท้องของหนูถีบจักรได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้รับ คิดเป็นร้อยละ 10-80

2.2 กระเทียม

กระเทียมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* Linn. อยู่ในวงศ์ Alliaceae ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ กระเทียมขาว กระเทียมจีน เทียม ปะเข้ว่า หอมขาว หอมเทียม หัวเทียม ลักษณะทั่วไปเป็นพืชล้มลุกที่มีหัวอยู่ใต้ดิน แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบเรียงซ้อนกันประมาณ 4-15 กลีบ บางพันธุ์จะมีเพียงกลีบเดียวเรียกว่ากระเทียมโทน แต่ละกลีบมีกาบเป็นเยื่อบางๆ สีขาวอมชมพูหุ้มอยู่โดยรอบ มีรากไม่ยาวนัก ใบมีลักษณะยาวแบนปลายใบแหลมแคบ โคนมีใบหุ้มซ้อนกัน เป็นใบประกอบชนิดมีใบย่อยใบเดียว เรียงสลับ รูปวงรีหรือรูปไข่ขอบขนานกว้าง 3-5 ซม. ยาว 4-8 ซม. เนื้อใบมีจุดน้ำมันกระจาย ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อ มีสีขาวติดเป็นกระจุกที่ปลายก้านช่อดอก ที่ปลายกิ่งและที่ซอกใบกลีบดอกสีขาว กลิ่นหอม ร่วงง่าย กิ่งอ่อนมีหนาม ผลเป็นผลสด กลมเกลี้ยงฉ่ำน้ำ มีกลิ่นหอมฉุน รสชาติเผ็ดร้อน

สารสำคัญที่พบในกระเทียม คือ Allicin (Diallyldisulphide oxide) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกกำมะถัน มีลักษณะเป็นน้ำมันใส ละลายน้ำและสลายตัวเมื่อถูกความร้อน นอกจากนี้ในกระเทียมยังประกอบด้วย โปรตีน น้ำตาล กรดไขมัน กรดอะมิโน แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิดเช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ Allinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยน Alliin ให้เป็น Allicin และมีสาร Quercetin ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์และCytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระเทียมได้แก่ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ฤทธิ์ขับน้ำดี ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการแน่นจุกเสียด ฤทธิ์ลดการอักเสบ ฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2009) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการลดระดับไขมันในเลือด ลดความดันโลหิต ยับยั้งการจับกลุ่มกันของเกร็ดเลือด สลายลิ่มเลือด (Kendler,1987; Kunnumakkara et al., 2009), ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Lee et al.,2003) ต้านอนุมูลอิสระ (Shobana and Naidu, 2000; Leelarungrayub et al., 2006) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Eidi, 2006) มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Thomson and Ali, 2003; Tsubura et al., 2011) และด้านการอักเสบ (Dirsch and Vollmar, 2001; Leelarungrayub,et al., 2004; Park et al.,2012) Kumar และ Reddy (1999) ศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์ระงับปวดในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วยสาร alloxan โดยให้สารสกัดกระเทียมชั้นเอธานอล ในขนาด 45 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 28 วัน พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ เมื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี tail-flick, hot plate และ formalin test พบว่าสามารถบรรเทาอาการปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Gorji (2003) รายงานว่ากระเทียมเป็นพืชสมุนไพรที่ปรากฏในตำรายาของชาวเปอร์เซีย สามารถบรรเทาอาการปวดศีรษะ แบบ cold humour headache และ Sarrell และคณะ (2003) รายงานว่ามีการใช้สมุนไพรกระเทียมเป็นส่วนประกอบของยาสมุนไพรทางเลือกที่ใช้รักษาอาการเจ็บหูในเด็ก

ปัจจุบันพบผลิตภัณฑ์กระเทียมออกวางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งได้รับความนิยมและการยอมรับจากผู้บริโภคว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถ ป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด และใช้ในผู้ป่วยหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) ไขมันในเลือดสูง(hyperlipidemia) ลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และเบาหวาน(diabetes) (Banerjee and Maulik, 2002)

2.3 ความเจ็บปวด

International Association for the Study of Pain (IASP) ได้ให้คำนิยามของ Pain (ความปวด) ไว้ดังนี้ : “Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage or described in terms of such damage “ (IASP, 1979) ซึ่งแปลความได้ว่าความเจ็บปวดเป็นประสบการณ์ที่ไม่พึงพอใจทั้งทางด้านความรู้สึกและอารมณ์ โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายหรือศักยภาพในการทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อของร่างกาย แนวความคิดในปัจจุบันได้ยอมรับว่ามีองค์ประกอบทางมิติต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องได้แก่มิติด้านสรีรวิทยา ด้านการรับความรู้สึก ด้านอารมณ์ ด้านความเข้าใจและพฤติกรรม ตลอดจนด้านสังคมและวัฒนธรรม กลไกการเกิดความเจ็บปวดประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ประการคือ สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด (Pain stimuli or Noxious stimuli) ตัวรับความรู้สึกเจ็บปวด (Pain receptors or Nociceptors) และวิถีประสาทนำความรู้สึกเจ็บปวด (Pain impulse pathways)

1. สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด (Pain stimuli or noxious stimuli) แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

1.1 สิ่งกระตุ้นเชิงกล (Mechanical stimuli) ได้แก่ การทำลายเนื้อเยื่อจากการผ่าตัด

1.2 การบวมจากการอักเสบ การอุดตันของหลอดเลือด และการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ

1.3 สิ่งกระตุ้นอุณหภูมิ (Thermal stimuli) ได้แก่ ความร้อน ความเย็น และกระแสไฟฟ้า

สิ่งกระตุ้นที่เป็นสารเคมี (Chemical stimuli) ซึ่งมีทั้งสารเคมีภายใน และภายนอกในร่างกาย สารชีวเคมีภายในร่างกายได้แก่ ฮิสตามีน (Histamine) โพรสตาแกลนดิน(Prostaglandin) แบรดีไคนิน (Bradykinin) และสารภายนอกในร่างกาย ได้แก่ กรดต่าง สิ่งทีกระตุ้นความเจ็บปวดเหล่านี้จะไปกระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับความเจ็บปวด (Primary afferent nociceptor) หรือความเจ็บปวดนั้นอาจเกิดขึ้นได้จากสิ่งกระตุ้นนั้นไปทำลายเนื้อเยื่อ ทำให้มีการหลั่งสารเคมีบางอย่างออกไปกระตุ้นตัวรับความเจ็บปวด ได้แก่ โพตัสเซียมไอออน (K^+) Bradykinin Serotonin Histamine และ Neurokinin สารเหล่านี้จะกระตุ้นเซลล์ประสาทรับความรู้สึก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเซลล์ประสาท (Depolarization) ทำให้มีการนำกระแสประสาทเกิดขึ้น ถ่ายทอดเป็นสัญญาณประสาทส่งไปตามเส้นประสาท เข้าสู่ไขสันหลังและสมองเพื่อให้รับรู้และตอบสนองต่อความเจ็บปวดตามลำดับ ขณะเดียวกันเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายและมีการอักเสบจะหลั่งสารชีวเคมีบางอย่างทำให้เซลล์ประสาทรับความรู้สึกไวต่อการกระตุ้น คือ Prostaglandin Substance P เป็นผลให้เนื้อเยื่อไวต่อความเจ็บปวดง่ายขึ้น bradykinin และ cytokines (เช่น $TNF-\alpha$, interleukin 1, interleukin 8) มีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดความ

เจ็บปวดในภาวะที่มีการอักเสบ โดยกระตุ้นให้มีการหลั่ง prostaglandins และสารสื่อกลางอื่น ๆ ออกมาทำให้เกิดภาวะไวในการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวด

2. ตัวรับรู้ความรู้สึกปวด (Pain receptor or nociceptors) สามารถรับการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย เป็นปลายประสาทอิสระ (Free nerve ending) ตัวรับรู้ความเจ็บปวดที่สำคัญมีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มแรก คือ ตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับสูง (High threshold) รับความรู้สึกปวดคล้ายเข็มแทง (Pain prick) และตัวรับรู้ความเจ็บปวดจากความร้อน (Heat nociceptor) ซึ่งกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่บนผิวหนังทั้งหมด กลุ่มที่สอง คือ ตัวรับรู้ความเจ็บปวดที่มาจากหลายทาง (Polymodal nociceptor) รับสิ่งกระตุ้นที่เป็นแรงกด แรงทับ ความร้อน และสารเคมีทั้งหมด ตัวรับรู้ความเจ็บปวดชนิดนี้จะอยู่ทั่วไปทุกเนื้อเยื่อทั้งในระดับตื้น และลึกโดยเฉพาะที่อวัยวะภายใน เมื่อมีสิ่งกระตุ้นเชิงกล อุณหภูมิ และสารเคมี ปลายประสาทอิสระจะถูกกระตุ้นจนถึงระดับความทนต่อความเจ็บปวด (Pain threshold) เกิดเป็นกระแสประสาทความรู้สึกปวด (Pain impulse) ส่งไปตามเส้นประสาทสู่ไขสันหลังและสมอง สำหรับตัวรับรู้ความรู้สึกเฉพาะเรียกว่า ตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับต่ำ (Low threshold mechanoreceptor) จะรับรู้ความรู้สึกการสัมผัส การสั่นสะเทือน ถ้าถูกกระตุ้นด้วยการสั่นสะเทือนหรือการนวดจะสามารถยับยั้งสารสื่อกระตุ้นความเจ็บปวดได้ในระดับไขสันหลัง

3. วิธีประสาทนำความรู้สึกปวด (Pain impulse pathways) ประกอบด้วย

3.1 โยประสาท เอ – เบต้า หรือโยประสาทใหญ่ที่มีเปลือกหุ้ม (A – beta fiber or large myelinated fiber) จะนำความรู้สึกได้เร็ว รับสัญญาณประสาทจากตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับต่ำ ซึ่งเป็นตัวรับเฉพาะ เช่นความรู้สึกสัมผัสการสั่นสะเทือน เป็นต้น

3.2 โยประสาทเอ – เดลต้า หรือโยประสาทเล็กที่มีเปลือกหุ้ม (A – delta fiber or small myelinated fiber) ตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับสูง และตัวรับรู้ความเจ็บปวดจากความร้อน จะนำความเจ็บปวดชนิดแหลมคมหรือความรู้สึกร้อน จะนำความรู้สึกได้ช้ากว่าโยประสาทเอ – เบต้า สามารถบอกตำแหน่งที่ปวดได้ชัดเจน และความรู้สึกปวดจะหมดไปเร็ว

3.3 โยประสาทซีหรือโยประสาทเล็กที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (C – fiber or small unmyelinated fiber) ตัวรับรู้ความเจ็บปวดที่มาจากหลายทางจะนำความรู้สึกได้ช้ากว่าโยประสาท เอ – เดลต้า โดยจะนำความเจ็บปวดแบบตื้อๆ (Dull pain) ปวดแสบปวดร้อน (Burning) หรือปวดร้าว (Aching pain) บอกตำแหน่งไม่ได้ชัดเจน

ในร่างกายมีกลไกการเกิดการปรับเปลี่ยน (modulation) ของ nociception ทำให้ปวดมากขึ้น (facilitation) หรือลดลง (inhibition) ได้ โดยในส่วนของไขสันหลัง มีการเกิด Spinal modulation หรือ central sensitization :ซึ่งทั้ง stimuli และ nerve injury ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงใน dorsal horn โดยพบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะ dynamic คือ neuroplasticity ทำให้ตอบสนองต่อ mechanical stimuli เพิ่มมากเป็นความรู้สึกปวดมากขึ้น (secondary hyperalgesia) เรียกว่าเกิด "wind up" จากการศึกษาเกี่ยวกับ neurotransmitter พบว่าบริเวณ dorsal horn ที่ส่วนปลายของ primary nociceptive afferents มี receptor ทั้ง presynapse และ postsynapse โดย receptor ชนิด N-methyl -D- aspartate (NMDA) จะถูก excitatory amino acid คือ glutamate และ aspartate มาจับทำให้มี "wind up" และปวดมากขึ้นตรงข้ามกับ opioid, alpha adrenergic, gamma aminobutyric acid (GABA) และ serotonin receptor ที่เมื่อถูกจับด้วย neurotransmitter เฉพาะจะลดความปวดได้ และในระดับเหนือไขสันหลัง จะเกิด Supraspinal modulation ร่างกายปรับเปลี่ยนให้ความปวดลดลงโดยผ่านทาง descending inhibitory tract จากระดับ brain stem (periaqueductal gray matter และ reticular formation) ส่งลงมา synapse ที่ dorsal horn โดยปล่อย inhibitory neurotransmitter (endorphins, norepinephrine) ออกมายับยั้งให้ความปวดลดลง

ความรู้สึกปวดจะเกิดขึ้นในส่วน of thalamus และมีการแปลความรู้สึกที่สมองส่วน cortex และเกิดพฤติกรรมแสดงอาการปวดออกมา (อานวย ธิฐะพันธ์, 2009) จากการที่กลไกความเจ็บปวดมีความซับซ้อนและมีความเกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทหลายประการ ในปัจจุบันมีกลุ่มยาที่ใช้ในทางคลินิกในการบรรเทาปวดหลายกลุ่ม ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ pain pathway

2.4 การอักเสบ (inflammation)

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อ ต่อสิ่งที่ก่ออันตราย (injurious agent) และต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง ปฏิกิริยาที่สำคัญในการอักเสบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ และ/หรือการเปลี่ยนแปลงในหลายระบบของร่างกาย ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดขึ้นในระบบหลอดเลือดฝอยภายในเนื้อเยื่อ (microcirculation) เป็นปฏิกิริยาที่ช่วยปกป้องเนื้อเยื่อและกำจัดสิ่งที่ก่ออันตราย (โดยใช้วิธี กำจัดหรือ ทำให้เจือจางหรือจำกัด

บริเวณ) รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลงด้วย ผลจากการอักเสบทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดอาการ 4 ประการ คือ ปวด (pain) บวม (swelling) แดง (redness) และร้อน (heat)

โดยทั่วไป อาจจำแนกชนิดของการอักเสบตามลักษณะการเกิดโรคทางคลินิก และระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ โดยแบ่งออกเป็น การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) มีอาการของการอักเสบในช่วงเวลาเป็นนาที ชั่วโมงหรือวัน และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) มีอาการของการอักเสบในช่วงเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้ ยังพบความแตกต่างของชนิดของสารสื่อกลาง (chemical mediator) ในการอักเสบที่พบเป็นหลักในการอักเสบเฉียบพลันและการอักเสบเรื้อรัง การอักเสบแบบเรื้อรังจะส่งผลทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะบริเวณนั้นเกิดความเสียหายหรือพิการได้

สารสื่อกลางการอักเสบ (Inflammatory mediators) ในการอักเสบมีแหล่งที่มาจาก plasma โดยอยู่ในรูปของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาโดยเซลล์บางชนิด mediator เหล่านี้จะไปจับกับ receptor ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันบนเซลล์ต่างๆที่มีบทบาทในการอักเสบ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แตกต่างกันไปตามชนิดของ mediator และชนิดของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย (target cell) mediator ส่วนใหญ่มีอายุสั้น มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ไม่นาน mediator บางชนิดกระตุ้นให้เซลล์สร้าง secondary mediator ต่อไปอีกเป็นการขยายผลปฏิกิริยาการอักเสบ Mediator กลุ่มที่สำคัญได้แก่ (สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์, 2555; ปราโมทย์ มหคุณากร, 2553)

1. Vasoactive amine ได้แก่ histamine และ serotonin

2. Nitric oxide (NO) เป็น free radical gas ที่ละลายในน้ำได้ จัดเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ สร้างขึ้นโดย activated macrophage และ endothelial cell ออกฤทธิ์สั้นและเฉพาะที่ มีฤทธิ์สำคัญในการส่งเสริมการอักเสบ ได้แก่ ทำให้หลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบและออกฤทธิ์เป็น cytotoxic free radical NO ถูกสร้างขึ้นโดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจัดเป็น inducible enzyme โดยจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นปริมาณมากจากสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin

3. Arachidonic acid (AA) metabolites ได้แก่ prostaglandins และ leukotrienes หรือเรียกรวมกันว่า eicosanoids สาร prostaglandins ถูกสร้างขึ้นจากเอนไซม์ cyclooxygenase มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการอักเสบเกือบทุกขั้นตอน ทั้ง PGI_2 และ PGE_2 มีบทบาทสำคัญในการขยายหลอดเลือด โดยการเพิ่ม cAMP

และลดปริมาณแคลเซียมในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบก่อให้เกิดการบวมและการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยการเพิ่มการไหลเวียนในบริเวณที่มีการอักเสบ สาร PGE_2 มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการสร้าง inflammatory mediator อื่นๆ อีกหลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง และมีไข้ ในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ ยับยั้งสาร prostaglandins ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ยากลุ่ม NSAIDs ให้ผลในการต้านการอักเสบที่ดีกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการอักเสบเรื้อรัง อาจต้องให้ในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้มีผลยับยั้งการสร้าง prostaglandins ซึ่งเป็น protective mediators ในกระเพาะอาหารถูกยับยั้งไปด้วย ดังนั้น เยื่อบุกระเพาะอาหารจึงถูกทำลายโดยกรดเพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้ยากลุ่มนี้เป็นเวลานานจะพบอาการไม่พึงประสงค์ได้บ่อย เช่น ปวดท้อง เป็นแผลในระบบทางเดินอาหาร ส่วนยาที่มีผลข้างเคียงต่ำยังมีราคาค่อนข้างสูง

4. Cytokines เป็น polypeptides ที่สังเคราะห์โดยเซลล์หลายชนิด เช่น mononuclear phagocytes, lymphocytes, endothelial และ epithelial cells, fibroblasts และ chondrocytes โดย cytokines มีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลันและการอักเสบแบบเรื้อรัง Tumor necrosis factor (TNF)- α จัดเป็นสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อและกระตุ้นการผลิตสารตัวกลางสำหรับกระบวนการอักเสบ (inflammatory mediator) หลายชนิด เช่น interleukin-1 (IL-1) interleukin 6 (IL-6) interleukin 8 (IL-8) และ granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) กระตุ้นให้มีการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มมากขึ้น และกระตุ้น gene expression และการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องและก่อให้เกิดการอักเสบ

5. Oxygen-derived free radicals

6. สารสื่อกลางที่สร้างขึ้นจากสารประกอบใน plasma ได้แก่ complement system, kinin system และ clotting system

7. Platelet-activating factor มีฤทธิ์กระตุ้น platelet aggregation และ degranulation

8. สารที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาว neutrophil และ monocyte

9. สารสื่อกลางชนิดอื่น neuropeptides (substance P) ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) ข้างต้นชี้ให้เห็นว่า การยับยั้งการทำงานของ mediators ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบจะเป็นแนวทางสำคัญในการบรรเทาอาการอักเสบ ดังนั้นยาหรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการสร้างหรือยับยั้งการทำงานของ iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ได้ก็จะสามารถยับยั้งหรือบรรเทาการอักเสบได้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

(Methodology)

3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

3.1.1 สารเคมี (Chemicals)

95% Ethanol, Morphine sulfate (1 mg/ml) (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข), Normal saline (0.9%NaCl)

Molecular biology agarose (Bio-Rad, Spain), 1kb DNA ladder (Promega, USA), Blue/Orange 6X loading dye (Promega, USA), Primer β -actin, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Eurofins MWG Operon, Germany), Tris base, glacial acetic acid, EDTA (Ajax/Australia), Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany), TopTaq MasterMix kit (QIAGEN, Germany), Novel Juice (GeneDirex), RNA extraction kit (GE Healthcare, UK), 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dyphenyl tetra-zolium bromide (Invitrogen, USA), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Invitrogen, UK), FBS (Fetal bovine serum, Invitrogen, UK), *Escherichia coli* lipopolysaccharide (*E. coli* LPS, QIAGEN, Germany), RNase free DNase Set (QIAGEN, Germany)

Folin-Ciocalteu reagent, Sodium carbonate, Gallic acid, Methanol A.R.Grade

Quercetin dihydrate, Aluminium chloride, Potassium acetate

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ (Instruments)

Percolator, เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator; Buchi Rotavapor, R-134, Switzerland), เครื่องระเหยแห้ง (Christ Laboratory Freeze dryer, UK)

เครื่องชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลอง Mettler-Toledo Model AT 200, Switzerland, Hot-plate apparatus (Socrel model-DS37), Syringe ขนาด 0.5 มิลลิลิตร & needle no.26, Tail-flick analgesia meter (Harvard Apparatus), Mouse restrainers, Mouse cages

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge), ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator), Autoclave, Laminar air flow cabinet, Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA), Gel casting platform, Horizontal gel electrophoresis apparatus, Thermal cycler PCR (AB Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2400), Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system), UV spectrophotometer

3.1.3 สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร (Mouse) เพศผู้ พันธุ์ ICR ที่ใช้จัดซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา มีน้ำหนักอยู่ ระหว่าง 18-20 กรัม นำหนูมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองล่วงหน้าอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ควบคุมความมืดและความสว่างโดยเปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปตามมาตรฐานของสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ กรงที่ใช้เลี้ยงหนูทดลองจะปูรองพื้นด้วยขี้เลื่อยที่ ผ่านการอบฆ่าเชื้อโรคเพื่อใช้ดูดซับอุจจาระและปัสสาวะ ที่กรงจะมีช่องสำหรับให้น้ำและอาหารแก่หนู โดยหนูสามารถกินและดื่มน้ำได้ตลอดเวลา ในวันที่ทำการทดลองชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวและขีดเครื่องหมายที่หางหนูแต่ละตัวเพื่อแสดงกลุ่มและหมายเลขของหนู

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)

3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) และสารสกัดจากกระเทียม (*Allium sativum* L.) ในเอธานอล

1. ดำเนินการซื้อหัวหอมและกระเทียมจากร้านค้าในจังหวัดศรีสะเกษ ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ให้ถูกต้องและเก็บตัวอย่างไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. นำส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียมมาปอกเปลือกและป็นย่อยให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำมาใส่ลงใน percolator ไม่ให้อัดแน่นจนเกินไป (เป็นการหมักหัวหอมแดงและหัวกระเทียมในเครื่อง percolator)
3. นำ 95% เอธานอล ใส่ลงใน percolator ที่ใส่พืชลงไปแล้วโดยเทให้ท่วมพืชขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว ปิดปาก percolator ด้วย aluminium foil ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วไขสารสกัดออกเก็บไว้ แล้วเติม 95% เอธานอล เข้าไปใหม่ให้ท่วมพืชขึ้นมา

- ประมาณ 1 นิ้ว ปิดปาก percolator ด้วย aluminium foil แล้วทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จึงไขออก
5. รวบรวมสารละลายที่สกัดได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบความดันต่ำ (rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด
 6. จากนั้น นำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dry เพื่อระเหยน้ำออกไป เก็บสารสกัดหอม และกระเทียมในเอธานอลบรรจุในภาชนะปิดสนิทเพื่อทดสอบฤทธิ์
 7. คำนวณหา % yield จากสมการ $\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักพืชที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักพืชแห้ง}} \times 100$



หอมแดง - shallot

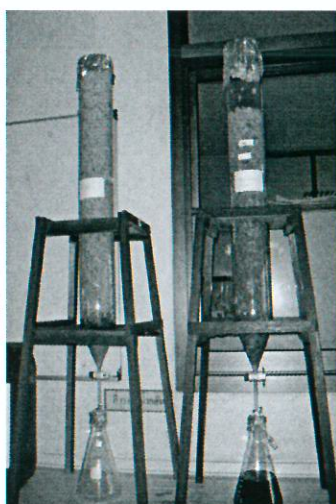
(*Allium ascalonicum* L.)



กระเทียม - Garlic

(*Allium sativum* L.)

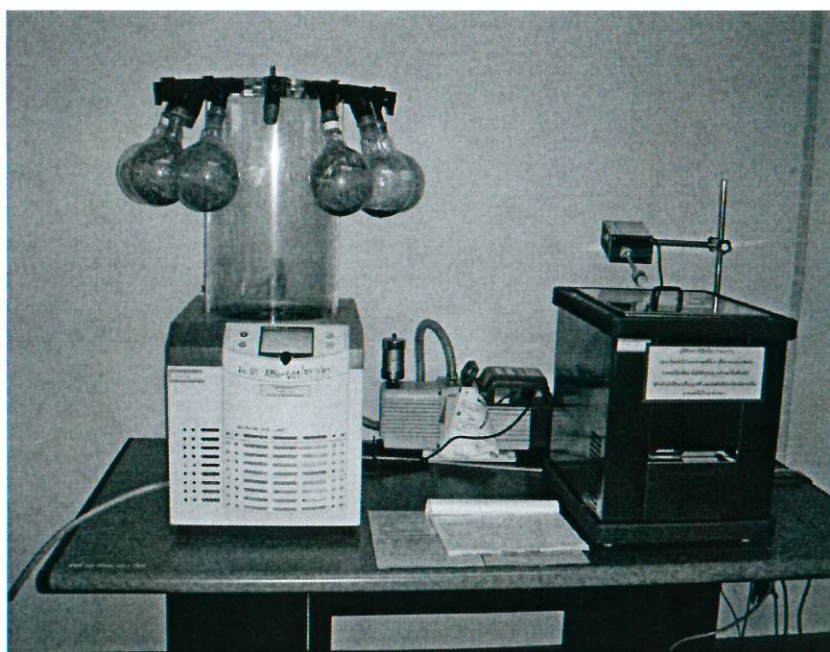
รูปที่ 3-1 ตัวอย่างหัวหอมแดงและหัวกระเทียม



รูปที่ 3-2 การหมักหัวหอมแดงและหัวกระเทียมในเครื่อง Percolator



รูปที่ 3-3 การระเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator



รูปที่ 3-4 การทำให้สารสกัดแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer

3.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการระงับความปวดในสัตว์ทดลอง (Animal models)

3.2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Hot-Plate Method (Woolfe and Macdonald, 1944)



รูปที่ 3-5 เครื่องมือ Hot-plate analgesia meter

หลักการ เหนียวนาให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อน โดยวางหนูลงบนแผ่นความร้อน และวัดระยะเวลาที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้โดยไม่ยกอุ้งเท้าหลังขึ้นมาเลียหรือกระโดดอย่างแรง หนูที่ได้รับยาจะระงับปวดซึ่งออกฤทธิ์ระงับปวดในระดับไขสันหลังและระดับเหนือสันหลังจะสามารถทนต่อความร้อนได้นานขึ้น

วิธีทดลอง ใช้หนูเม้าส์ เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยหนูแต่ละตัวจะถูกวางลงบน hot-plate surface ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 55 ± 0.5 องศาเซลเซียส ครอบด้วยแก้วใส แบ่งหนูเป็นกลุ่มด้วยวิธีสุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที โดยมี cut-off time ที่ 45 วินาทีเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง สังเกตพฤติกรรมการเลียอุ้งเท้าหลัง หรือการกระโดดอย่างรุนแรง บันทึกเวลาที่สัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรมนั้น หนูที่มี pre-drug baseline มากกว่า 45 วินาที จะถูกตัดออกจากการทดลอง (หนูตัวที่มี pre-drug baseline มากกว่า 45 วินาทีจะถูกตัดออกจากการทดลอง เนื่องจากการที่หนูทดลองที่สามารถทนความร้อนเมื่อถูกวางบน hot-plate โดยไม่เลียอุ้งเท้าหลังหรือกระโดดอย่างรุนแรง

มี pre-drug baseline มากกว่าค่า cut-off time ที่ 45 วินาที อาจเกิดจากพฤติกรรมของหนูทดลองนั้นที่สามารถทนต่อความปวดได้มาก ตัวกระตุ้นด้วยแผ่นความร้อนไม่สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดและเกิดการตอบสนองต่อความเจ็บปวดได้ เมื่อให้สารทดสอบหนูทดลองอาจยังคงสามารถอยู่บน hot-plate โดยไม่เลียอุ้งเท้าหลังหรือกระโดดอย่างรุนแรงโดยใช้เวลานานใกล้เคียงกับค่า cut-off time ที่ 45 วินาทีด้วย ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดได้ว่าเกิดจากสารทดสอบหรือไม่ โดยการแปลผลการทดสอบจะหาค่า %MPE ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลา) นำ pre-drug baseline ครั้งที่ 2 และ 3 มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้เป็น baseline ของหนูตัวนั้น จากนั้นให้สารทดสอบในขนาดต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) หรือ vehicle ทางช่องท้อง แล้วทำการทดสอบ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90 , 120 และ 240 นาทีหลังให้ยา

วิธีคำนวณ หาค่า Test latency (TL) ของหนูแต่ละตัว โดยค่า

$$\text{Mean of Baseline TL} = (\text{TL ครั้งที่ 2} + \text{TL ครั้งที่ 3}) / 2$$

แปลผลเป็น % MPE (percent maximum possible effect) ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาโดย

$$\% \text{ MPE} = [(\text{TL หลังได้รับสารทดสอบ} - \text{baseline TL}) / (\text{cut-off time} - \text{baseline TL})] \times 100$$

ค่า Cut-off time = 45 วินาที

คำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม พื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ Area of analgesia

สำหรับ Mean of Baseline Test Latency สามารถคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคยกับสภาวะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย)

การศึกษาใน Mouse hot-plate method ประกอบด้วย การศึกษา dose-response curve ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมชันเอธานอล ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

ในแต่ละการทดลอง แบ่งหนูออกเป็น 12 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ใช้หนูจำนวน 120 ตัวต่อ 1 การทดลองย่อย โดยทำการแบ่งกลุ่ม ดังนี้

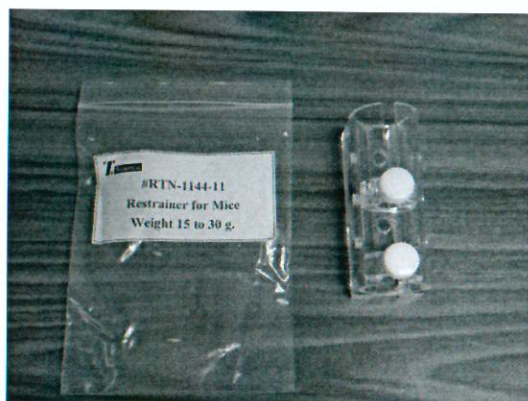
กลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มควบคุม ให้ตัวทำละลาย

กลุ่มที่ 2 ให้ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)

กลุ่มที่ 3-7 ให้สารสกัดหอมแดงเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 8-12 ให้สารสกัดกระเทียมเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Tail-Flick Method (D'Amour and Smith, 1941)



รูปที่ 3-6 Mouse restrainer และเครื่องมือ Tail-flick analgesia meter

หลักการ เหนี่ยวนำให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยรังสีความร้อน โดยใช้แสงส่องลงบนหางหนู และวัดระยะเวลาที่หนูสามารถทนต่อรังสีความร้อนได้โดยไม่สับัดหางหนีแสง หนูที่ได้รับยาระงับปวดซึ่งออกฤทธิ์ระงับปวดในระดับไขสันหลังจะสามารถทนต่อรังสีความร้อนได้นานขึ้น

วิธีทดลอง ใช้หนูเมาส์ เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม แบ่งหนูเป็นกลุ่มด้วยวิธีสุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว หนูแต่ละตัวจะถูกใส่ไว้ใน Plexiglass restrainer ที่สามารถให้หางหนูลอดออกมาได้ ระบายหางหนูด้วยสีดำให้มีขนาด 1 เซนติเมตรที่ตำแหน่ง 4 เซนติเมตรจากปลายหาง นำหางหนูมาวางลงบน Tail-flick analgesic meter ซึ่งตั้งความเข้มของแสงคงที่ที่ 3.7 °A ให้ตำแหน่งที่แสงส่องผ่านอยู่ตรงกลางของส่วนที่ทำเครื่องหมายไว้ สังเกต

และบันทึกเวลาที่หนูสะดุ้งหนีออกจากแสง โดยมี cut-off time ที่ 4 วินาที ทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที (หนูตัวที่มี pre-drug baseline มากกว่า 4 วินาทีจะถูกตัดออกจากการทดลอง เนื่องจาก การที่หนูทดลองที่สามารถสะดุ้งหนีออกจากแสงมี pre-drug baseline มากกว่าค่า cut-off time ที่ 4 วินาที อาจเกิดจากพฤติกรรมของหนูทดลองนั้นที่สามารถทนต่อความปวดได้มาก ตัวกระตุ้นด้วยความร้อนที่ทางไม่สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดและเกิดการตอบสนองต่อความเจ็บปวดได้ เมื่อให้สารทดสอบหนูทดลองอาจยังคงสามารถสะดุ้งหนีออกจากแสงโดยใช้เวลานานใกล้เคียงกับค่า cut-off time ที่ 4 วินาทีด้วย ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดได้ว่าเกิดจากสารทดสอบหรือไม่ โดยการแปลผลการทดสอบจะหาค่า %MPE ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลา) จากนั้นให้สารทดสอบ ในขนาดต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) หรือ vehicle ทางช่องท้อง แล้วทำการทดสอบ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาทีหลังให้ยา

วิธีคำนวณ หาค่า Test latency (TL) ของหนูแต่ละตัว โดยค่า

$$\text{Mean of Baseline TL} = (\text{TL ครั้งที่ 2} + \text{TL ครั้งที่ 3}) / 2$$

แปลผลเป็น % MPE (percent maximum possible effect) ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาโดย

$$\% \text{ MPE} = [(\text{TL หลังได้รับสารทดสอบ} - \text{baseline TL}) / (\text{cut-off time} - \text{baseline TL})] \times 100$$

ค่า Cut-off time = 4 วินาที

คำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม พื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ Area of analgesia

สำหรับ Mean of Baseline Test Latency สามารถคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคยกับสภาวะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย)

การศึกษาใน Mouse tail-flick method ประกอบด้วย การศึกษา dose-response curve ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขึ้นเอธานอล ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ในแต่ละการทดลอง แบ่งหนูออกเป็น 12 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ใช้หนูจำนวน 120 ตัวต่อ 1 การทดลองย่อย โดยทำการแบ่งกลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มควบคุม ให้ตัวทำละลาย

กลุ่มที่ 2 ให้ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)

กลุ่มที่ 3-7 ให้สารสกัดหอมแดงเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 8-12 ให้สารสกัดกระเทียมเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

3.2.3 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7

3.2.3.1 การเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ Murine macrophage (RAW 264.7) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 5%, 37 °C

3.2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT reduction assay (Mossmann, 1983)

หลักการ เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตสามารถเปลี่ยน MTT ซึ่งเป็นสาร tetrazolium salt (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นผลึกสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ (violet formazan crystal) เมื่อละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นของการดูดกลืนแสงจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยสามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงของ formazan ที่ 570 นาโนเมตร

ทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ให้มีจำนวน 10⁴ cells/well ใน 96 well plate แล้ว incubate ใน CO₂ incubator, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้ว incubate ใน CO₂ incubator, 5% CO₂, 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

และเติมสาร MTT วัดสี formazan ที่เกิดจากการทำงานของ mitochondrial dehydrogenases ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ 570 นาโนเมตรทำซ้ำ 3 ครั้ง

(หมายเหตุ สำหรับการทดสอบ MTT จาก preliminary study ในโครงการ NRCT-JSPS joint research program เป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยศึกษาผลของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการทดลองโดยคัดกรองเบื้องต้น จึงมีจำนวนการทดลองไม่เพียงพอ จึงต้องทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมที่เหมาะสม ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ใหม่เพื่อใช้ในการทดสอบต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่อไป)

3.2.3.3 การศึกษาผลสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

วิธีการและขั้นตอนการสกัด RNA และ reverse transcription-polymerase chain reaction

1. Split cell ความเข้มข้น 10^6 cells/ml ปริมาตร 1 ml ลงใน 12 well plate จากนั้น incubated เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เติมสารทดสอบ ความเข้มข้นที่กำหนด incubated เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

3. กระตุ้นด้วย *E. coli* LPS แล้ว incubated ต่ออีก 2 ชั่วโมง

4. เก็บ และสกัด RNA โดยใช้ RNA extraction kit (GE Healthcare, UK) และใช้วิธีการสกัดตามที่ระบุมาในชุดสกัด ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก และตามด้วยการทำให้ชิ้นส่วนของเซลล์ที่แตกนั้นมีขนาดลดลง และเมื่อใช้ Column ที่สามารถจับกับ RNA ได้ total RNA จะจับอยู่บริเวณ Column นี้ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ และกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase enzyme สุดท้ายล้าง RNA ที่ได้ออกจาก Column โดยใช้น้ำที่ไม่มี RNase วัดปริมาณ total RNA ที่ได้ด้วย UV spectrophotometer ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณ total RNA ที่ได้ โดยใช้สูตร

$$\text{Concentration of RNA sample} = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

ใช้ Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany) เปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งใช้ปริมาณ RNA เริ่มต้น 40 ng แล้วตรวจหาปริมาณของ β -actin, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้ cDNA เริ่มต้น 3 μ l โดยใช้ primer สำหรับ β -actin, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ดังแสดงในตารางที่ 1 เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเครื่อง thermal cycler PCR แต่ละยีนใช้ 27 รอบในการเพิ่มปริมาณซึ่งระบบที่ใช้ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR

Genes	Primer	Sequence : (5'-3')	Expected sizes (bp)	References
β -actin	Forward	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	285	Won et al. (2006)
	Reverse	CCTAGAAGCATTTCGCGGTGCACGATG		
iNOS	Forward	AATGGCAACATCAGGTCGCCATCACT	454	Won et al. (2006)
	Reverse	GCTGTGTGTACAGAAGTCTCGAACTC		
IL-1 β	Forward	CAGGATGAGGACATGAGCACC	447	Sugawara et al. (2003)
	Reverse	CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC		
IL-6	Forward	CATCCAGTTGCCTTCTTGGA	463	Sugawara et al. (2003)
	Reverse	GCATTGGAAATTGGGGTAGGAAG		
TNF- α	Forward	ATGAGCACAGAAAGCATGATC	276	Won et al. (2006)
	Reverse	TACAGGCTTGTCACCTCGAATT		
COX-2	Forward	GGAGAGACTATCAAGATAGT	861	Won et al. (2006)
	Reverse	ATGGTCAGTAGACTTTTACA		
COX-1	Forward	AGTGCGGTCCAACCTTATCC	382	Won et al. (2006)
	Reverse	CCGCAGGTGATACTGTCGTT		

ตารางที่ 3-2 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA

Genes	Denaturation / RT Inactivation	For Cycles			Final Extension	Hold
		Denaturation	Annealing	Extension		
β -actin	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 10 min	4 °C
iNOS	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	60 °C, 1 min	72 °C, 1.5 min		
COX-2	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min		
COX-1	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	55 °C, 1 min	72 °C, 1 min		
TNF- α	94 °C, 2 min	94 °C, 15 Sec	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min		
IL-1 β	94 °C, 2 min	94 °C, 45 Sec	60 °C, 45 Sec	72 °C, 1 min		
IL-6	94 °C, 2 min	94 °C, 15 Sec	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min		

ทำตรวจสอบ RT-PCR products ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1.5% Agarose gel ใช้ TAE buffer 1X เป็นตัวทำละลาย วัดความเข้มของแถบ products โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ Novel Juice (GeneDirex) กับ DNA และสามารถเรืองแสงได้เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system) เพื่อแสดงถึงระดับการแสดงออกของ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β IL-6 และ β -actin จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณการแสดงออกของยีนโดยคิดเป็น สัดส่วน (relative ratio) กับ mRNA ของ β -actin ที่ใช้เป็น internal standard ทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965)

หลักการ สารในกลุ่มฟีนอลสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสาร Folin-ciocalteu reagent เกิดสารสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถดูดกลืนแสง UV-Visible ที่ ความยาว คลื่น 765 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณของสารฟีนอลรวม (total phenolic compounds) เทียบเท่าเป็นปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid monohydrate) ซึ่งใช้เป็นสารฟีนอลมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย 20% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

ใช้ Sodium carbonate anhydrous 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร.

การเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid stock solution

เตรียม Gallic acid stock solution ด้วยการละลาย Gallic acid 125 มิลลิกรัมใน 95% เอทานอล, ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร ได้สารละลาย Gallic acid stock solution ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.

การเตรียมสารละลายฟีนอลมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ทำได้โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลาย Gallic acid stock solution ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร. ในปริมาตรต่างๆ ดังตารางที่ 3-3 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตรจะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3-3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารละลาย Gallic acid (mg/ml)	ปริมาตรที่เตรียมมาจาก Gallic acid stock solution (μl)
1	0.05	100
2	0.10	200
3	0.15	300
4	0.20	400
5	0.25	500
6	0.30	600

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลาย Gallic acid ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทั้งหมด 6 หลอด
2. เติม Folin-Ciocalteu reagent 700 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
3. เติม 20% Sodium carbonate ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตรโดยทิ้งให้ตกตะกอนแล้วเติมเฉพาะส่วนใสลงไปในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายฟีนอลมาตรฐานความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นสารเปรียบเทียบกับ (blank)
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและกระเทียม

เตรียมตัวอย่างสารละลายหอมแดงและกระเทียม โดยละลายสารสกัดหยาบหอมแดง 40 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายหอมแดงเท่ากับ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และละลายสารสกัดหยาบกระเทียม 400 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายกระเทียมเท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างหอมแดงและกระเทียมปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้น เติมสารต่างๆ เหมือนกับการสร้างกราฟมาตรฐาน คือ เติม Folin-Ciocalteu reagent 700 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 20% Sodium carbonate 3.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

การคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลรวม

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid จะได้สมการเส้นตรง. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง นำมาคำนวณในสมการ เส้นตรงที่ได้ จะได้ปริมาณของสารฟีนอลรวมที่มีในสารตัวอย่างแต่ละชนิดในรูปมิลลิกรัมของ Gallic Acid Equivalent (GAE) โดยคิดเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดจำนวน 1 กรัม

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม (Pourmorad et al., 2006)

หลักการ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร Aluminium chloride และ Potassium acetate เกิดสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV-Visible ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์รวม เทียบเท่าเป็นปริมาณของ Quercetin ซึ่งใช้เป็นสารฟลาโวนอยด์มาตรฐาน

การเตรียม 10% Aluminium chloride

เตรียมโดยละลาย Aluminium chloride 1 กรัมใน methanol 10 มิลลิลิตร

การเตรียม 1 M Potassium acetate

เตรียมโดยละลาย Potassium acetate 0.9814 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin

เตรียม Quercetin stock solution ด้วยการละลาย Quercetin dihydrate 7.8125 มิลลิกรัม

(เท่ากับ Quercetin 5 มิลลิกรัม) ใน methanol แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้ Quercetin stock solution ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมจาก Quercetin stock solution ในปริมาตรต่างๆ ดังตารางที่ 3-4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3-4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารละลาย Quercetin($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตรที่เตรียมมาจาก Quercetin stock solution (ml)
1	20	1
2	40	2
3	60	3
4	80	4
5	100	5

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลาย Quercetin ปริมาตร 600 ไมโครลิตรในแต่ละความเข้มข้น ลงในหลอดทดลองทั้งหมด 5 หลอด
2. เติมน้ำ 3.4 มิลลิลิตรเข้าให้เข้ากัน
3. เติมน้ำ 10% Aluminium chloride และ 1 M Potassium acetate อย่างละ 200 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 5.6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นสารเปรียบเทียบ (blank)
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหอมแดงและกระเทียม

เตรียมตัวอย่างสารละลายหอมและกระเทียม โดยละลายสารสกัดหยาบหอมแดง 200 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายหอมแดงเท่ากับ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และละลายสารสกัดหยาบกระเทียม 400 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายกระเทียมเท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากนั้น ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หอมแดงและกระเทียมปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้น เติมสารต่างๆ เหมือนกับการสร้างกราฟมาตรฐาน คือเติม methanol 3.4 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน เติม 10% Aluminium และ 1 M Potassium อย่างละ 200 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่น 5.6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นสารเปรียบเทียบ

การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Quercetin จากสมการเส้นตรง. จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้ ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Quercetin คำนวณในสมการเส้นตรงที่ได้ จะได้ปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมหรือ Total flavonoid compounds ที่มีในสารตัวอย่างที่มีในสารตัวอย่างแต่ละชนิดในรูปมิลลิกรัมของ Quercetin Equivalent โดยคิดเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดจำนวน 1 กรัม

3.3. การรายงานผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดใน hot-plate และ tail-flick test การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ การแสดงออกของยีน β -actin, COX-1, IL-1 β ,

COX-2, TNF- α , IL-6, iNOS รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error of the means) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และกลุ่มควบคุม โดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบผลด้วย multiple comparisons ด้วย LSD (Least Significant Difference) statistics พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compound) รายงานผลปริมาณสารฟีนอลรวมที่มีในสารสกัดในรูปค่าเฉลี่ยมิลลิกรัมของ Gallic acid equivalent (GAE) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ต่อสารสกัด 1 กรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid compound) รายงานผลปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมที่มีในสารสกัดในรูปมิลลิกรัมของ Quercetin equivalent $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ต่อสารสกัด 1 กรัม

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

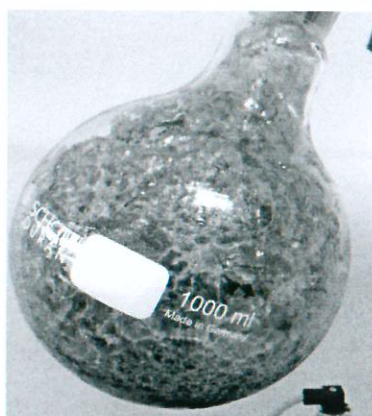
บทที่ 4

ผลการวิจัย

(Results)

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอล

เมื่อนำส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียมที่ปอกกาบใบออกแล้ว มาป็น้อยให้มีขนาดเล็กลงและนำมาหมักโดยใช้วิธี Maceration ด้วย 95% เอทานอล แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี Freeze dry เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) สารสกัดหอมแดงจะมีสีน้ำตาลอมแดง มีลักษณะแข็งและเหนียวเล็กน้อย สารสกัดกระเทียมมีสีเหลืองอ่อน มีลักษณะแข็ง เมื่อใช้ช้อนชูด สามารถตักออกจากขวดได้ง่าย ลักษณะของสารสกัดหอมแดงกระเทียม ดังแสดงในรูปที่ 4-1 โดยมี % yield ดังแสดงในตารางที่ 4-1 ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ได้มีปริมาณเพียงพอต่อการใช้งานสิ้นสุดการศึกษาค้นคว้าผลการวิจัย



หอมแดง - shallot

(*Allium ascalonicum* L.)



กระเทียม - Garlic

(*Allium sativum* L.)

รูปที่ 4-1 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบของหอมแดงและกระเทียมที่ผ่านการทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer

ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบ ค่า % yield และลักษณะของสารสกัดหยาบจากส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียม

ข้อมูล	สารสกัดหยาบ จากส่วนหัวของหอมแดง	สารสกัดหยาบ จากส่วนหัวของกระเทียม
น้ำหนักสมุนไพร (g)	2237.91	1810.62
น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	160.36	128.01
ค่า % yield	7.17	7.07
ลักษณะของสารสกัดหยาบ	สีน้ำตาลอมแดง ข้นหนืดเล็กน้อย	สีเหลืองอ่อน ผงแห้ง

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลในสัตว์ทดลอง

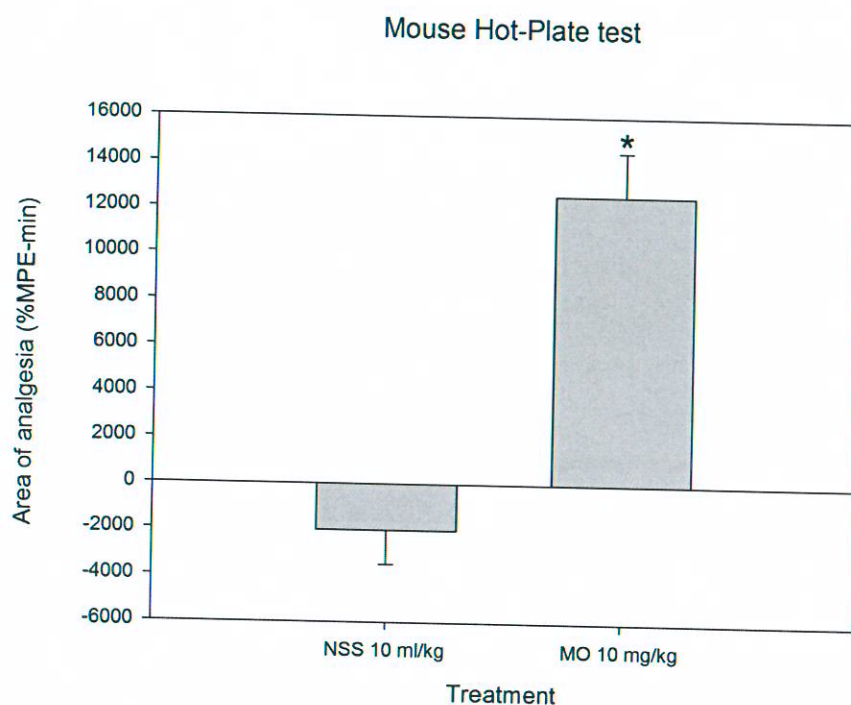
ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวด (analgesic activity) ของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลในสัตว์ทดลองหนูถีบจักรเพศผู้ ด้วยวิธี hot plate test และ tail-flick test

4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Hot plate test

การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดเปรียบเทียบกับยาระงับปวดมอร์ฟีน (Morphine sulfate) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยทำการทดสอบในหนูถีบจักรเพศผู้ที่ได้รับยามอร์ฟีนและสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ในขนาด 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี hot plate test ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 55 ± 0.5 องศาเซลเซียส ครอบด้วยแก้วใส โดยมี cut-off time ที่ 45 วินาทีเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง สังเกตพฤติกรรมการเลียอุ้งเท้าหลัง หรือการกระโดดอย่างรุนแรง บันทึกเวลาที่สัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรมนั้น โดยทำการทดสอบหา pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที (การคำนวณ Mean of Baseline Test Latency คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคย

กับสถานะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย) และ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90 , 120 และ 240 นาทีหลังให้ยาเพื่อคำนวณหาค่า percent maximum possible effect และพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองพบว่า หนูถีบจักรกลุ่มควบคุมที่ได้ตัวทำละลาย Normal saline (NSS ; solvent control) มีค่า Area of analgesia เท่ากับ -2033.28 ± 1464.86 % Maximum possible effect-minute (% MPE-min) และหนูถีบจักรได้รับยาระงับปวด Morphine ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia เท่ากับ 12555.32 ± 1933.79 %MPE-min แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-2



รูปที่ 4-2 Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

* $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ NSS

ในการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในการระงับปวดใน mouse hot-plate test พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ขนาด 100, 300, 600, 900 และ 1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia (%MPE-min) ดังแสดงในตารางที่ 4-2 ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ Normal Saline ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4-2 Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

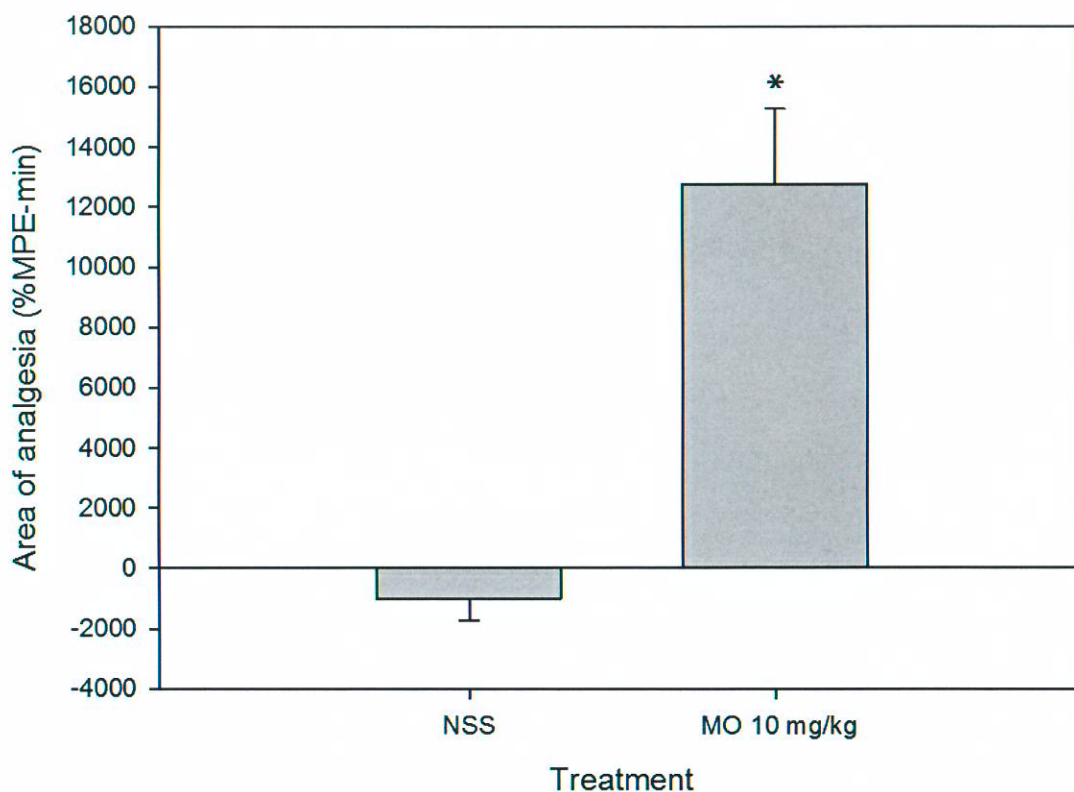
สารทดสอบ	Area of analgesia $\pm$ Standard error of mean (% MPE-min $\pm$ SE)
Normal Saline	-3145.38 $\pm$ 1960.80
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-5419.93 $\pm$ 2506.58
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-289.60 $\pm$ 1476.19
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	148.35 $\pm$ 2279.37
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2369.63 $\pm$ 3738.60
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-2372.66 $\pm$ 1082.34
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-5306.35 $\pm$ 1426.90
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-1306.09 $\pm$ 3171.28
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-4073.63 $\pm$ 2662.24
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-4301.13 $\pm$ 1998.34
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-2320.96 $\pm$ 1017.41

4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Tail-Flick test

การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดเปรียบเทียบกับยาระงับปวดมอร์ฟีน (Morphine sulfate) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยทำการทดสอบในหนูถีบจักรเพศผู้ที่ได้รับยามอร์ฟีนและสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ในขนาด 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี Tail-flick test โดยนำหนูที่เตรียมไว้สำหรับการทดลองที่ใส่ไว้ใน Plexiglass restrainer มาทดสอบ นำหางหนูมาวางลงบน Tail-flick analgesic meter ซึ่งตั้งความเข้มของแสงคงที่ที่ 3.7 °A ให้ตำแหน่งที่แสงส่องผ่านอยู่ตรงกลางของส่วนที่ทำเครื่องหมายไว้ สังเกตและบันทึกเวลาที่หนูสะบัดหางออกจากแสง โดยมี cut-off time ที่ 4 วินาที เพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง ทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที (การคำนวณ Mean of Baseline Test Latency คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคยกับสถานะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย) และ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90 , 120 และ 240 นาทีหลังให้ยาเพื่อคำนวณหาค่า percent maximum possible effect และพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองพบว่า หนูถีบจักรกลุ่มควบคุมที่ได้ตัวทำละลาย Normal saline (NSS ; solvent control) มีค่า Area of analgesia เท่ากับ -1000.39 ± 721.66 % MPE-min และหนูถีบจักรได้รับยาระงับปวด Morphine ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia เท่ากับ 12751.35 ± 2523.79 %MPE-min แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-3

Mouse Tail - Flick test



รูปที่ 4-3 Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

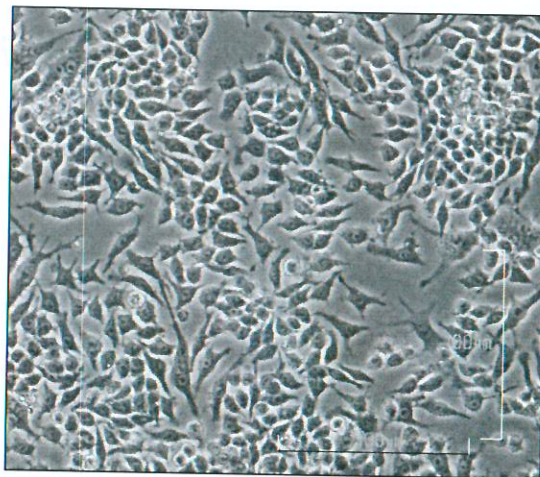
* $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ NSS

ในการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมและฤทธิ์ในการระงับปวดใน mouse tail-flick test พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ขนาด 100, 300, 600, 900 และ 1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia (%MPE-min) ดังแสดงในตารางที่ 4-3 ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ Normal Saline ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4-3 Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงในเอธานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

สารทดสอบ	Area of analgesia $\pm$ Standard error of mean (% MPE-min $\pm$ SE)
Normal Saline	-1000.39 $\pm$ 721.66
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	509.10 $\pm$ 897.00
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-4546.03 $\pm$ 2693.52
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-2244.52 $\pm$ 1798.39
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-5612.02 $\pm$ 3173.41
สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-7988.20 $\pm$ 5928.62
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	59.44 $\pm$ 837.24
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	850.00 $\pm$ 1166.80
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	1720.67 $\pm$ 669.03
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	1547.03 $\pm$ 735.67
สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2256.36 $\pm$ 1397.03

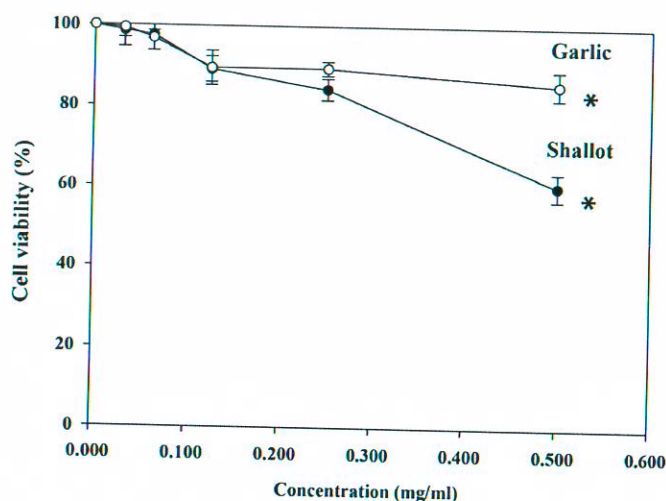
4.3 ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7



รูปที่ 4-4 ลักษณะเซลล์ Murine macrophage RAW 264.7 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมด้วย MTT Test

ลักษณะของเซลล์ RAW 264.7 ที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4-4 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยการ incubate เซลล์กับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่า cell viability โดยใช้ MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดที่สามารถใช้ในการทดสอบในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์นี้มีการรอดชีวิตลดลง (cell viability) เท่ากับ 60.31% และ 85.74% ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ได้รับและร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ รูปที่ 4-5 ทั้งนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ($P < 0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิดที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไปคือ 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 4-5 ผลของสารสกัดสารสกัดหอมแดง (Shallot) และสารสกัดกระเทียม (Garlic) ที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อการรื้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อทดสอบด้วย MTT Assay (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลอง, $n = 3$) * แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.3.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค RT-PCR

การศึกษากการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS (unstimulated RAW 264.7 cells) และกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารสกัดหอมแดงหรือสารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 น้อย ในขณะที่เซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าปริมาณการแสดงออก

ของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ที่ใช้เป็น internal control ในกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และในกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับสารสกัด มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

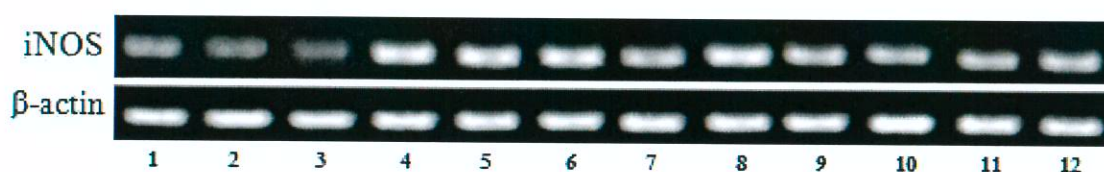
ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำได้โดยการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ที่ใช้เป็น internal control ระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวและกลุ่มทดสอบ ได้แก่ กลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ หรือสาร positive control โดยจากการทดลองพบว่า กลุ่มควบคุม เซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS สามารถชักนำให้เซลล์มีการแสดงออกของ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 mRNA อย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 4-6, 4-8, 4-10, 4-12, 4-14 และ 4-16 ตามลำดับ

สาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Indomethacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็น Positive control groups ในการทดลองสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS ดังแสดงในรูปที่ 4-6, 4-8, 4-10, 4-12, 4-14 และ 4-16 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ระหว่างกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Indomethacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-7, 4-9, 4-13, 4-15 และ 4-17 ตามลำดับ

4.3.2.1 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS

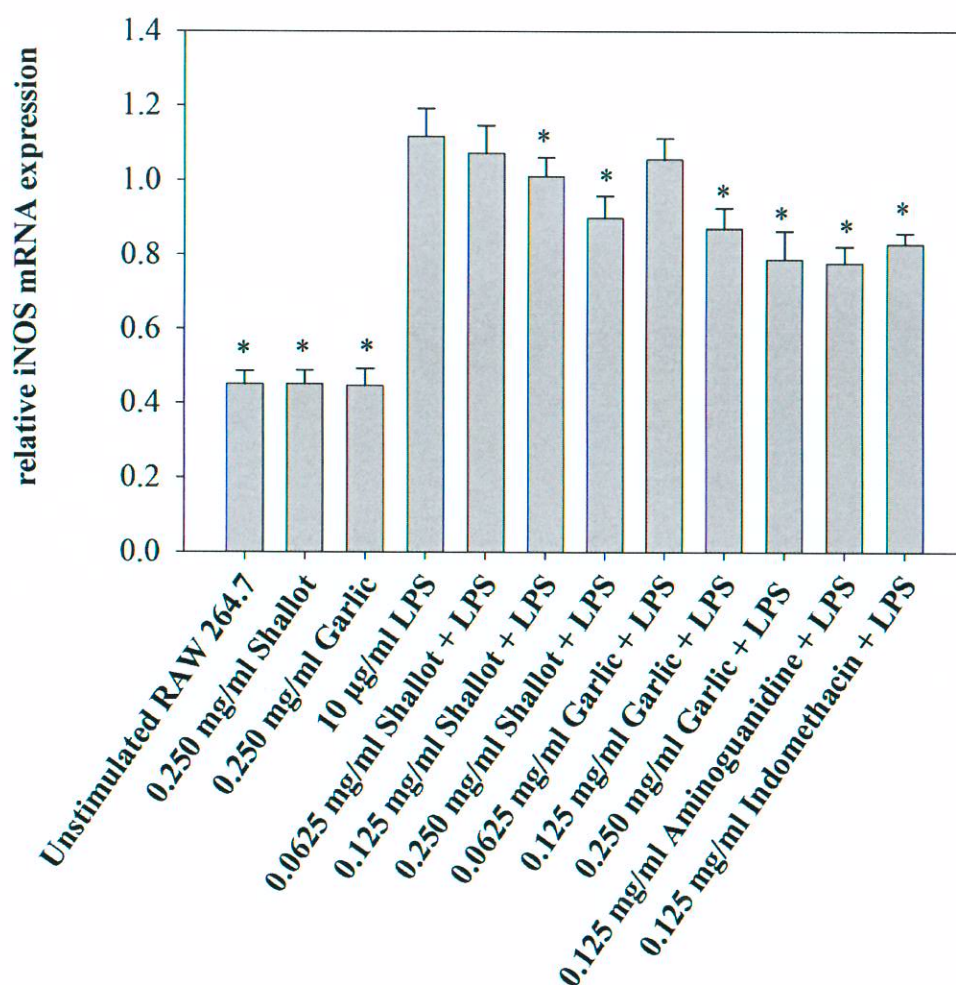
สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS mRNA ได้ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ iNOS mRNA โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin mRNA กับกลุ่มควบคุม (กลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS) พบว่า

มีฤทธิ์ในการยับยั้ง iNOS mRNA ในลักษณะที่เป็น dose dependent manner ในลักษณะเดียวกัน โดยปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS ที่คิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-6 และ รูปที่ 4-7



รูปที่ 4-6 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

- 1 = Unstimulated RAW 264.7 cells
- 2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)
- 3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)
- 4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS
- 5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml
- 6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml
- 7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml
- 8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml
- 9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml
- 10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml
- 11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml
- 12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



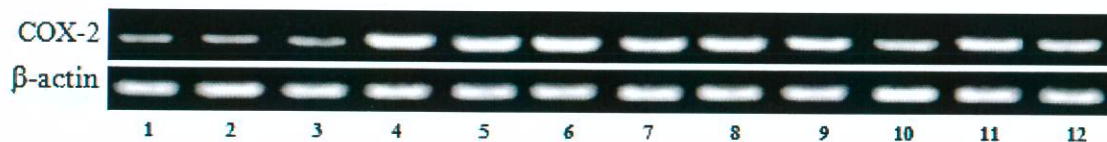
รูปที่ 4-7 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-2

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สารสกัดกระเทียมในช่วงความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 นี้มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มที่ได้รับยา Indometacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4-8 และ 4-9



รูปที่ 4-8 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

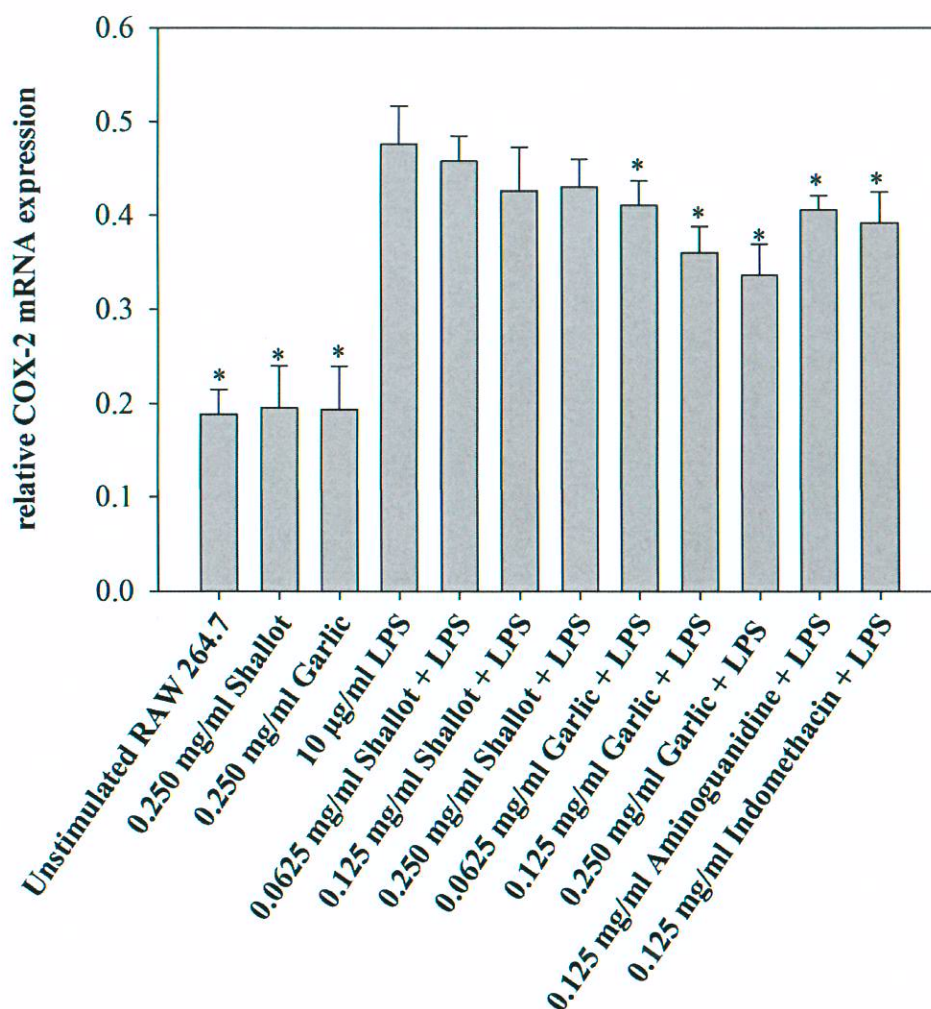
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



รูปที่ 4-9 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

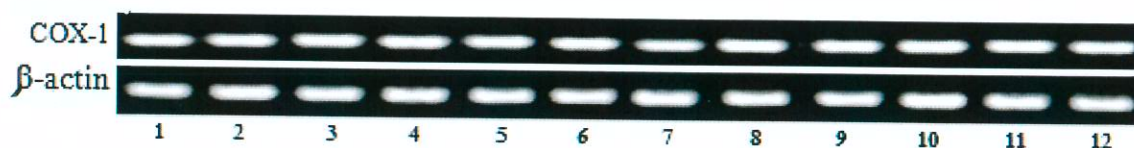
4.3.2.3 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-1

กลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS กระตุ้นเซลล์ให้มีการแสดงออกของยีน COX-1 สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS หรือกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุม เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11

สารสกัดกระเทียมแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 ที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ซึ่งเป็น internal control ระหว่างกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Indomethacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control groups) และกลุ่มควบคุม เซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11



รูปที่ 4-10 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

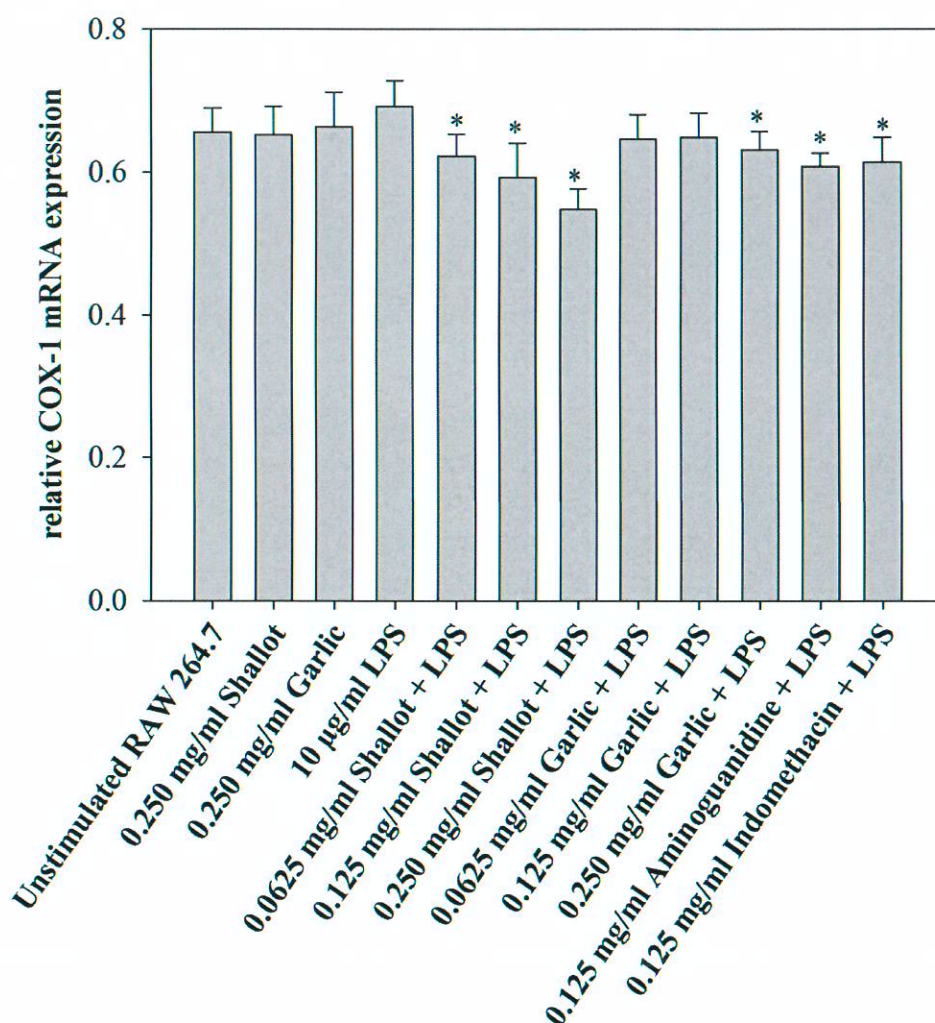
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



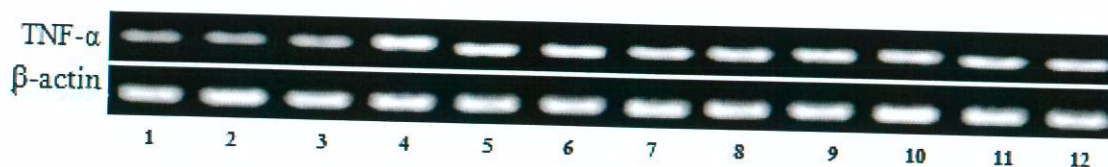
รูปที่ 4-11 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.4 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน TNF- α

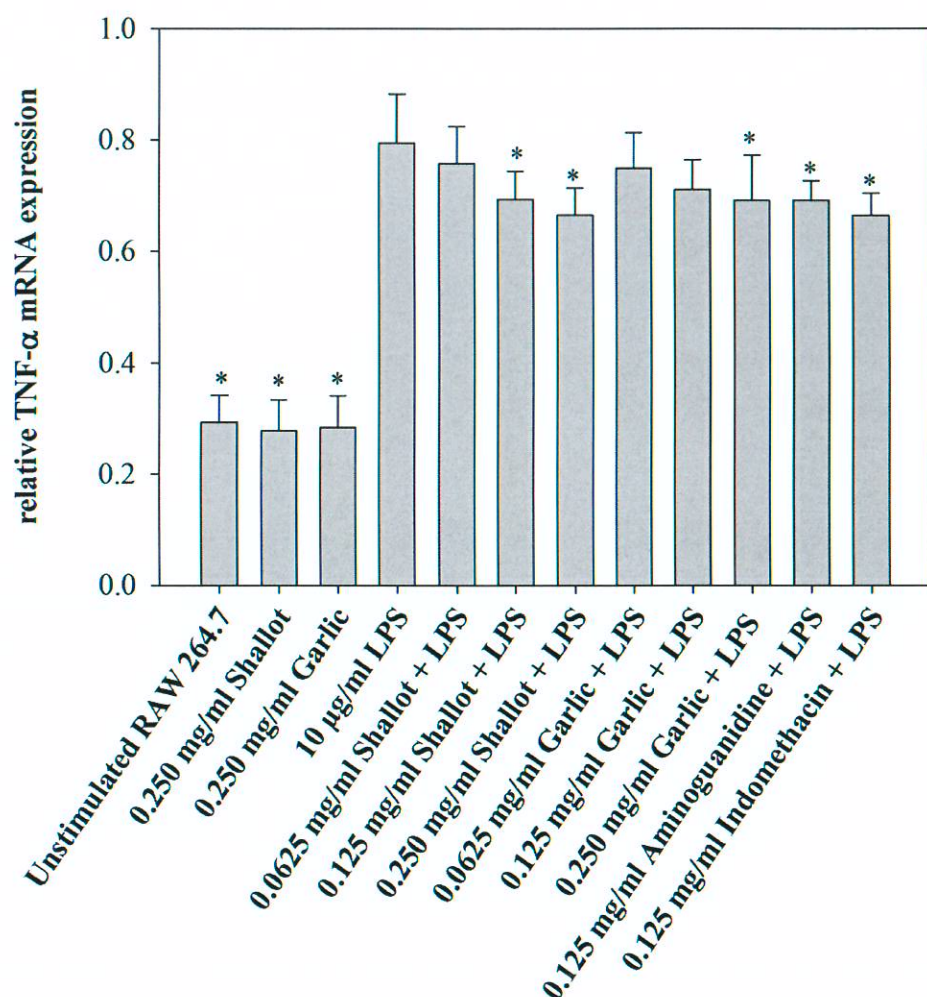
สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-12 และ 4-13

สารสกัดกระเทียมแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-12 และ 4-13



รูปที่ 4-12 ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

- 1 = Unstimulated RAW 264.7 cells
- 2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)
- 3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)
- 4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS
- 5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml
- 6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml
- 7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml
- 8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml
- 9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml
- 10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml
- 11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml
- 12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



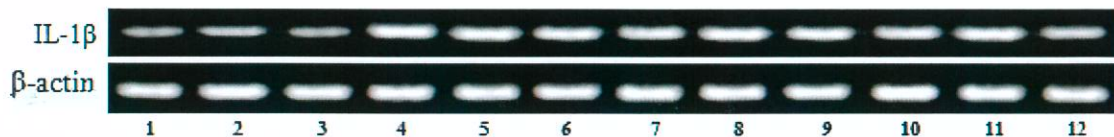
รูปที่ 4-13 ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.5 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-14 และ 4-15

สารสกัดกระเทียมในช่วงความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-14 และ 4-15



รูปที่ 4-14 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

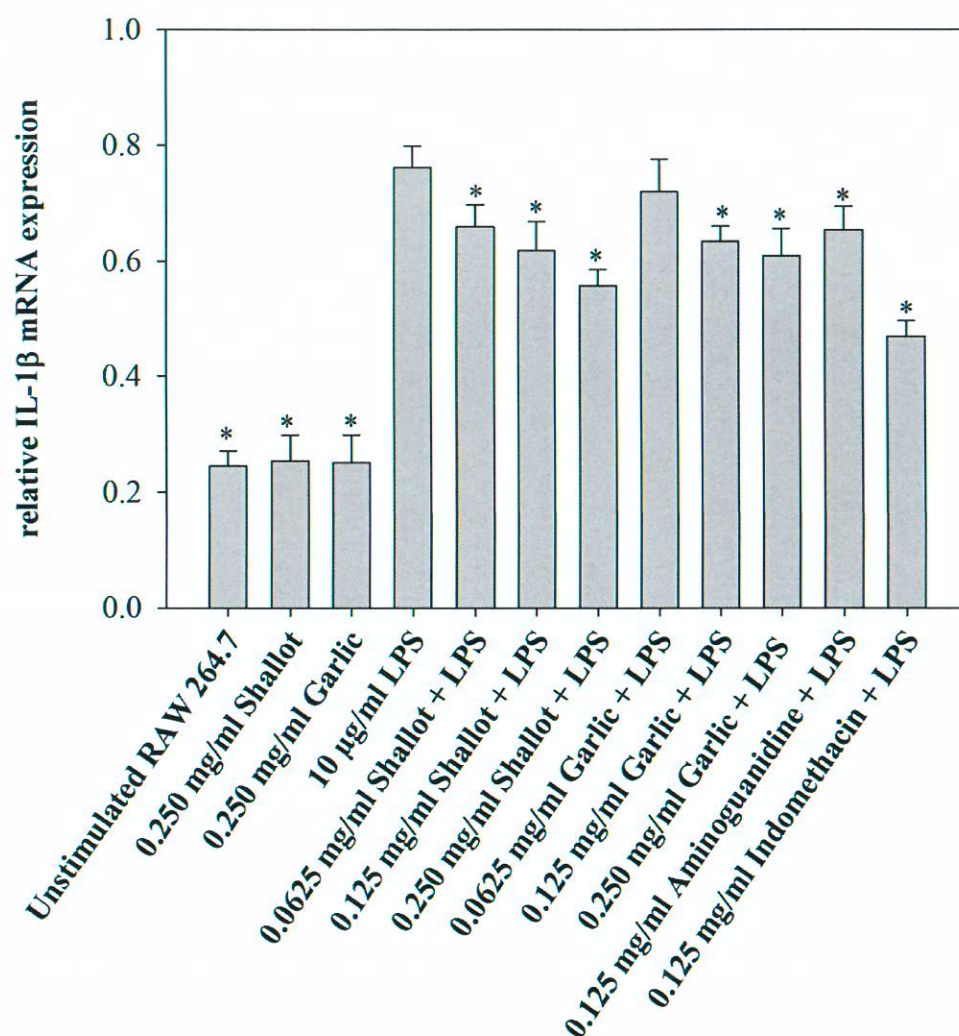
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



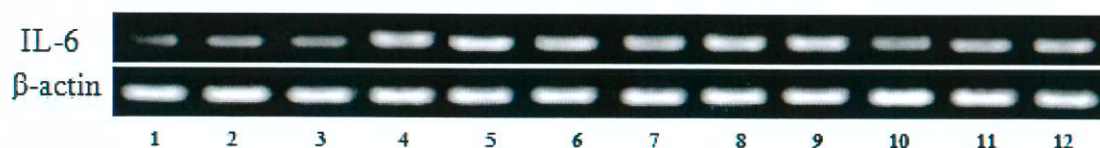
รูปที่ 4-15 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.6 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-6

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-16 และ 4-17

สารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้ สารสกัดกระเทียมยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ดีกว่าสารสกัดหอมแดงอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4-16 และ 4-17



รูปที่ 4-16 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

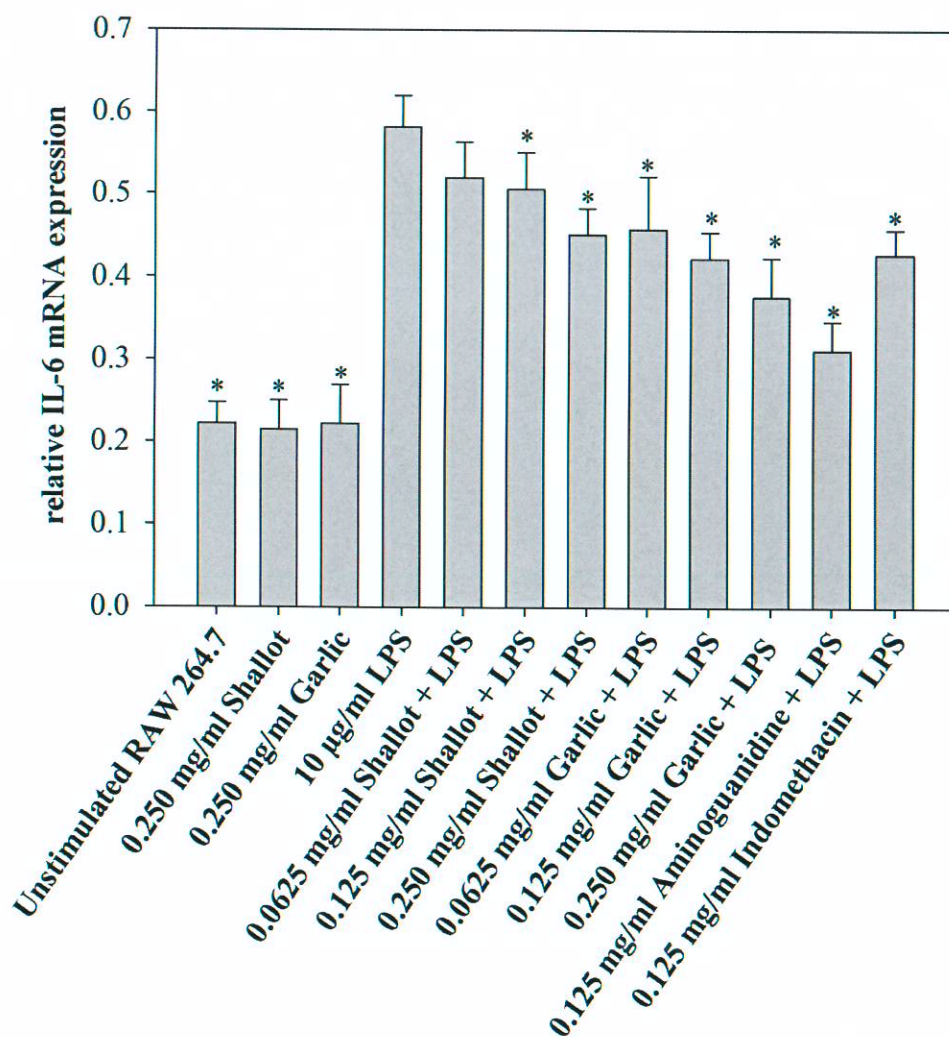
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



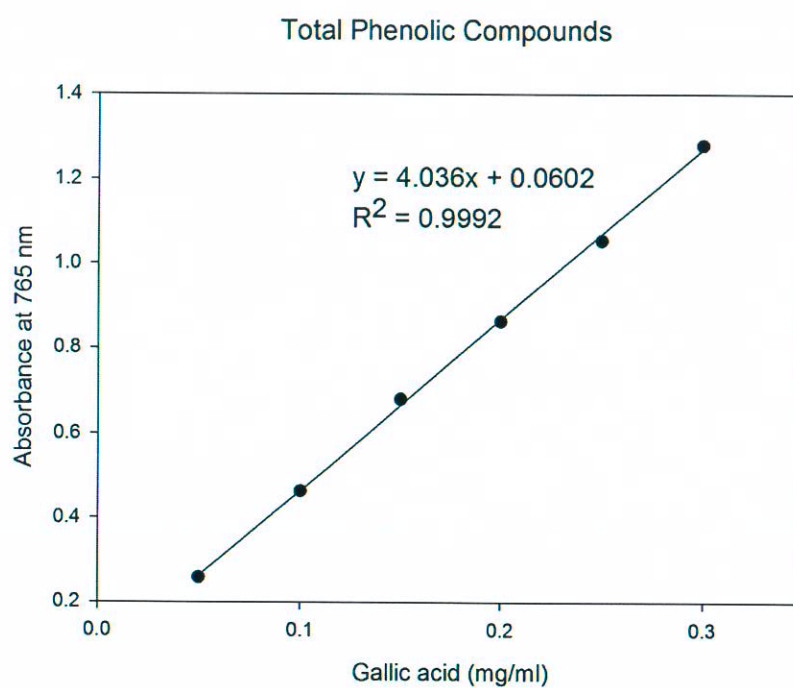
รูปที่ 4-17 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin-Ciocalteus

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ในการทดลองนี้ได้เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent และ Sodium carbonate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความเข้มข้นของ Gallic acid และได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ดังนี้ $y = 4.036x + 0.0602$ ค่า $R^2 = 0.9992$ ดังแสดงในรูปที่ 4-18 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมไปหาปริมาณ Total phenolic compounds โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteus และคำนวณหาปริมาณสมมูลกับ Gallic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 15.964 ± 0.122 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม ($n=3$) และสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟีนอลรวมเท่ากับ 4.020 ± 0.009 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม ($n=3$) ดังแสดงในตารางที่ 4-4

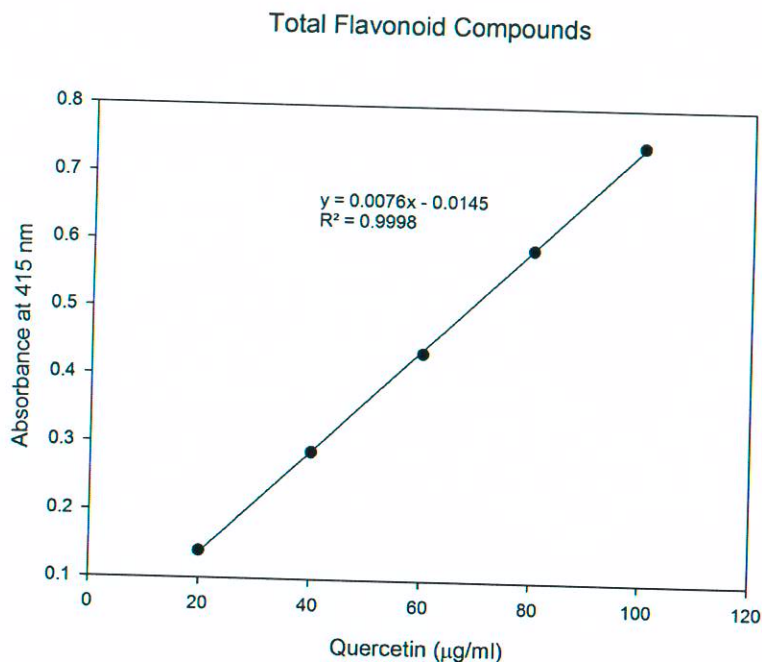
ในที่นี้หมายความว่าใน 1 กรัมของสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารฟีนอลรวมเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Gallic acid ประมาณ 15 มิลลิกรัม และใน 1 กรัมของสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟีนอลรวมเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Gallic acid ประมาณ 4 มิลลิกรัม สารสกัดหอมแดงในเอธานอลมีปริมาณสารฟีนอลรวมสูงกว่าสารสกัดกระเทียมในเอธานอล



รูปที่ 4-18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Phenolic Compounds ด้วยวิธี Folin-Ciocalteus

4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม

การวิเคราะห์หาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมพิจารณาโดยเทียบเท่าเป็นปริมาณของ Quercetin ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ในการทดลองนี้ได้เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับสาร Aluminium chloride และ Potassium acetate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของ Quercetin มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความเข้มข้นของ Quercetin และได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ดังนี้ $y = 0.0076x + 0.0145$ ค่า $R^2 = 0.9998$ ดังแสดงในรูปที่ 4-19 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมไปหาปริมาณ Total flavonoid compounds คำนวณเป็นปริมาณสมมูลกับ Quercetin ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 11.742 ± 0.012 มิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม (n=3) และสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 7.669 ± 0.038 มิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม (n=3) ดังแสดงในตารางที่ 4-4



รูปที่ 4-19 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Quercetin ($\mu\text{g/ml}$) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Flavonoid Compounds

ตารางที่ 4-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอล

สารทดสอบ	Total phenolic compounds (มิลลิกรัม/กรัม สารสกัดหยาบ)	Total flavonoid compounds (มิลลิกรัม/กรัม สารสกัดหยาบ)
สารสกัดหอมแดงในเอทานอล	15.964 ± 0.122	11.742 ± 0.012
สารสกัดกระเทียมในเอทานอล	4.020 ± 0.009	7.669 ± 0.038

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ (Discussion, Conclusion and Suggestions)

5.1 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนหัวของหอมแดงและส่วนหัวของกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอล พบว่า

สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ในขนาด 100-1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ใช้ในการทดสอบไม่มีฤทธิ์ระงับปวดเมื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดในหนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR ด้วยวิธี Hot-plate และ tail-flick โดยหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขนาด 100-1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทางช่องท้อง ไม่สามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนได้นานกว่าและไม่สามารถทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหางเมื่อเปรียบเทียบกับหนูถีบจักรกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเกลือ (Normal saline ,NSS 10 มิลลิตร/กิโลกรัม) ทั้งนี้เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สูงสุดที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ (% maximum possible effect, %MPE) ที่เวลา 15,30,45,60,90,120 นาทีแล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง %MPE และเวลา พบว่าหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขนาด 100-1200 มก./กก. ทางช่องท้องมีค่า Area of analgesia ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับยาระงับปวดมาตรฐานมอร์ฟีน ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แสดงฤทธิ์ระงับปวด โดยมีค่า Area of analgesia ที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในวิธี Hot-Plate และ Tail-Flick

Mouse Hot-Plate และ Mouse Tail-Flick method เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดในหนูถีบจักร โดยการกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อน ทั้งนี้ตัวกระตุ้นจะทำให้มีการส่งสัญญาณผ่านตัวรับรู้ความเจ็บปวดผ่านไขสันหลังไปสู่สมองและแสดงออกเป็นพฤติกรรมที่ตอบสนองต่อความเจ็บปวด ใน Hot-Plate test หนูที่ได้รับสารทดสอบและสามารถทนต่อการยืนบนแผ่นร้อนได้นานกว่ากลุ่มควบคุมจะถือว่าสารทดสอบนั้นมี

ฤทธิ์ระงับปวดที่ระดับเหนือไขสันหลัง (Supraspinal level) ใน Tail-Flick test หนูที่ได้รับสารทดสอบและสามารถทนต่อการกระตุ้นด้วยความร้อนที่บริเวณหางโดยไม่กระดกหางออกจากแสงนานกว่ากลุ่มควบคุมจะถือว่าสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ระงับปวดที่ระดับไขสันหลัง (Spinal level) (Barrot, 2012) จากการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดพบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลไม่แสดงฤทธิ์ระงับปวดในทั้งสองวิธีการทดสอบนี้ สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลไม่มีฤทธิ์ระงับปวดแบบเฉียบพลันที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนและไม่ออกฤทธิ์ระงับปวดที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนในระบบประสาทส่วนกลาง สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่ใช้ในการศึกษาอาจออกฤทธิ์ระงับปวดโดยออกฤทธิ์ผ่านระบบประสาทส่วนปลายโดยอาจยับยั้งการหลั่งของสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Owoyele และคณะ (2006) ทำการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัด ในเมธานอลและในชั้นน้ำ พบว่า สารสกัดของ *Allium ascalonicum* ในชั้นเมธานอลขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่สามารถระงับปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส แต่สามารถระงับปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส และสารสกัด *Allium ascalonicum* ในชั้นเมธานอลสามารถระงับปวดได้ดีใน Formalin test ทั้ง early phase (neurogenic phase) และ late phase (inflammatory phase) ในหนูขาว Formalin test เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยการฉีดสารเคมี formalin เข้าที่ฝ่าเท้าและสังเกตพฤติกรรมการเลียเท้าของหนูหลังฉีด formalin ในระยะ early phase ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่ออย่างเฉียบพลัน ส่วนใน ระยะ late phase จะมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ ได้แก่ สาร prostaglandin และสารสื่ออื่นๆ เช่น histamine serotonin และ bradykinin การยับยั้งใน early phase อาจมีผลยับยั้งผ่านระบบประสาทรับความรู้สึก หรือผ่าน opioid receptors ในระบบประสาทส่วนกลาง และการยับยั้งในระยะ late phase อาจเกิดจากการยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ (ปราโมทย์ มหคุณากร, 2553)

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ด้วยสาร *E. coli* LPS จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรไม่แสดงความเป็น

พิษต่อเซลล์ ในการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ทำโดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่เซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สร้างขึ้นด้วยวิธี RT-PCR พบว่ากลุ่มควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีการสังเคราะห์ mRNA ของ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในปริมาณสูง การใช้สารยับยั้งการอักเสบมาตรฐานคือ Aminoguanidine และ Indomethacin ในขนาด 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ได้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ระหว่างกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่า สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด และสารสกัดกระเทียมยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และ COX-1 ในขณะที่สารสกัดหอมแดงยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 และไม่มีผลต่อการแสดงออกของ COX-2

จากผลการทดลองที่สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS นั้น ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการรายงานผลของสารสำคัญในกระเทียม ได้แก่ diallyl sulfide, diallyl trisulfide, s-allyl cysteine, และ allicin ที่สามารถลดการหลั่งของ nitric oxide โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS (Chang et al., 2005; Liu et al., 2006; Kim et al., 2001; Shin et al., 2013) เอนไซม์ iNOS เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงสาร L-arginine ให้เป็น nitric oxide ปริมาณ nitric oxide ที่เพิ่มขึ้นมากเกินไปภายในเซลล์จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื้อเยื่อถูกทำลายและร่างกายเกิดพยาธิสภาพ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS เพื่อรักษาโรคที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS ที่มากเกินไปได้แก่ ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ ข้ออักเสบ ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง โรค

หืด โรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบและโรคมะเร็ง (Zamora et al., 2000). จากคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ในผลการทดลองนี้ สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลน่าจะเป็นตัวเลือกหนึ่งที่จะพัฒนาเพื่อเป็นยาที่ใช้ในการรักษาภาวะโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบ

Cyclooxygenase หรือ COX เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid ซึ่งพบที่เซลล์เมมเบรนของเซลล์ทั่วทั้งร่างกาย ไปเป็น Prostaglandins และ Thromboxane (TXA_2) เมื่อเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับการบาดเจ็บ จะเกิดการสร้าง Arachidonic acid ขึ้นมาจาก Membrane phospholipids โดยอาศัยเอนไซม์ Phospholipase A_2 แล้ว Arachidonic acid จะถูกเอนไซม์ COX และ lipoxygenase (LOX) เปลี่ยนไปเป็น Prostaglandins และ Leukotrienes (LT) ตามลำดับ ปัจจุบันได้มีการตรวจพบว่าเอนไซม์ Cyclooxygenase ที่สำคัญ 2 isoform ได้แก่ Cyclooxygenase-1 (COX-1) และ Cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยที่เอนไซม์ COX-1 เป็น constitutive form พบในภาวะปกติ มีหน้าที่ดูแล สมดุลของร่างกาย โดยจะเปลี่ยน Arachidonic acid ให้เป็น Thromboxane A_2 (TxA_2), Prostaglandin E_2 (PGE_2) และ Prostacyclin (PGI_2) ร่วมกันทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเกร็ดเลือด และยับยั้งการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ผิดปกติจนทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด นอกจากนี้ยังทำให้หลอดเลือดขยายตัวขึ้น เพิ่มการหลั่งเยื่อเมือก เพิ่มการหลั่ง bicarbonate บริเวณกระเพาะอาหาร และควบคุมการไหลเวียนของเลือดไปที่ไตรวมทั้งการกรองการขับโซเดียมและน้ำของไต (Schafer, 1999). ในขณะที่เอนไซม์ COX-2 ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกัน ส่วนใหญ่จะเป็น inducible form คือจะพบมากขึ้นในภาวะที่ร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือเมื่อมีตัวกระตุ้นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (de Leval, 2000). เนื่องจาก prostaglandins มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ทำให้เกิดอาการปวดและอาการไข้ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญของยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (Non-steroidal Anti-inflammatory drugs, NSAIDs) จึงเป็นผลให้การสร้าง prostaglandins ลดลงยากกลุ่มนี้ในขนาดต่ำจะสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งลดอาการไข้และอาการปวดทั้งที่เป็นแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง และถ้าใช้ในขนาดสูงจะสามารถลดการอักเสบได้ดี อาจแบ่งยากกลุ่ม NSAIDs ตามฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase ว่ายาจะมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ COX-1 หรือ COX-2 มากกว่ากัน โดยจะใช้ค่า IC_{50} (Inhibition concentration at 50% คือ ความเข้มข้นของยาที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง prostaglandin ได้ ร้อยละ 50) COX-2 : COX-1 (ทำให้สามารถแบ่งยากกลุ่มนี้ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Non-specific cox inhibitors หรือ traditional NSAIDs หรือ classical NSAIDs หมายถึง ยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช้ส

เตียรอยด์ที่มี IC_{50} COX-2 : COX-1 มากกว่า 1 ได้แก่ aspirin indomethacin ibuprofen, กลุ่มที่ 2 คือ COX-2 selective inhibitors หมายถึง ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ที่มีค่า IC_{50} COX-2: COX-1 อยู่ระหว่าง 1-0.01 ได้แก่ meloxicam nimesulide และ etodolac และกลุ่มที่ 3 คือ COX-2 specific inhibitors หมายถึง ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ที่มีค่า IC_{50} COX-2: COX-1 น้อยกว่า 0.01 ยากลุ่มนี้ที่ยังไม่ถูกถอนออกจากตลาดได้แก่ celecoxib parecoxib และ etoricoxib ยาในกลุ่มนี้มีราคาค่อนข้างสูง (พรทวิ เลิศศรีสถิต สุชีลา จันทรวิทย์ยานุชิต) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จะช่วยลดการเกิดการอักเสบ ฤทธิ์ในการลดการอักเสบและระงับปวดจึงเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ในขณะที่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 อาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่นการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร มีผลเสียต่อการทำงานของไตและการจับกลุ่มกันของเกร็ดเลือด ทำให้มีอุบัติการณ์ของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตเพิ่ม (Lanas, 2009). การแสดงออกของโปรตีน COX-2 ถูกกระตุ้นโดย growth factors สาร Pro-inflammatory cytokines และสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ดังนั้นเอนไซม์ COX-2 จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในการอักเสบและการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จึงสามารถพัฒนาเป็นยาด้านอักเสบและยารักษามะเร็งได้ (Dirsch and Vollmar, 2001) มีรายงานการศึกษาว่าสาร diallyl sulfides, ajoene, thiacremonone ซึ่งเป็นสาร sulfur compounds ที่แยกได้จากกระเทียมสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้ (Sengupta et al., 2004; Elango et al., 2004; Ban et al., 2007; Raman et al., 2008; Lee et al., 2012) จากการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin และ COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ระหว่างกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าสารสกัดกระเทียมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และ COX-1 จึงอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดกระเทียมในเอธานอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 และ COX-1 ได้ ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร prostaglandins และในขนาดที่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และในการทดลองพบว่า สารสกัดหอมแดงยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 โดยแปรตามความแรงของความเข้มข้น และไม่มีผลต่อการแสดงออกของ COX-2 จึงอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่า ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดหอมแดงอาจเกี่ยวข้องกับ

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 น้อย โดยอาจมีกลไกด้านการอักเสบอื่นที่เด่นกว่า เช่นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS หรือเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการหลั่งของสาร Pro-inflammatory cytokines อื่น ๆ

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีขนาดเล็กสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เช่น การได้รับสาร *E. coli* LPS จะทำให้มีการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ในปริมาณที่สูงขึ้นและทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ไซโตไคน์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับในขั้นตอนแรกของการอักเสบได้แก่ Tumor necrosis factor (TNF)- α , ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างสารไซโตไคน์อื่น ๆ ตามมา เช่น Interleukin(IL)-1 β และ IL-6. ทั้ง TNF- α , IL-1 β และ IL-6 จัดเป็น Pro-inflammatory cytokines และเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่นข้ออักเสบเรื้อรังและทำให้การทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูก (Zhao et al., 2013) จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลนี้มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 และน่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบได้

สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS นั้น ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการรายงานผลของสารสำคัญในกระเทียม ได้แก่ diallyl sulfide, diallyl trisulfide, s-allyl cysteine, และ allicin ที่สามารถลดการหลั่งของ nitric oxide โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล สรุปได้ว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่พบในสารสกัดหอมแดงอยู่ที่ระดับ 15.964 ± 0.122 มิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิก/กรัมของสารสกัด และสารสกัดกระเทียมในเอธานอลมีสารประกอบฟีนอลรวมที่ระดับ 4.020 ± 0.009 มิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิก/กรัมของสารสกัด และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอลูมิเนียมคลอไรด์ พบว่าสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเป็น 11.742 ± 0.012 มิลลิกรัมสมมูลกับสารเคอร์ซีทิน/กรัมของสาร

สกัด และสารสกัดกระเทียมในเอธานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเป็น 7.669 ± 0.038 มิลลิกรัมสมมูลกับสารเคอร์ซีติน/กรัมของสารสกัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลนี้มีส่วนประกอบของสารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fattorusso และคณะ (2002) การวิเคราะห์ทางพิษเคมีของส่วนหัวของหอมแดงพบสาร Furostanol saponins, ascalonicoside A1/A2 และ ascalonicoside B และในหอมแดงพบสารประกอบ โพลีฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง ได้แก่ isoliquiritigenin, quercetin และ quercetin glycosides สารประกอบฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์นับเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมได้ สารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลอาจเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบอย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาโครงสร้างสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล

กล่าวโดยสรุป สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลไม่แสดงฤทธิ์ระงับปวดในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี Mouse Hot-Plate และ Mouse Tail-Flick สารสกัดหัวหอมแดงในเอธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 และมีผลยับยั้งการแสดงออกของ COX-1 โดยไม่ยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 และสารสกัดหัวกระเทียมในเอธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 และ COX-1 โดยสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอาจเป็นสารที่เป็นฟีนอลหรือสารฟลาโวนอยด์ ผลการทดลองเหล่านี้สนับสนุนรายงานการวิจัยที่รายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบของหอมแดงและกระเทียม (Keiss et al., 2003; Lee et al., 2011; Shin et al., 2013; Leelarungrayub et al., 2006; Park et al., 2012) ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในการรักษาโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอื่นและควรทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยผู้วิจัยขอเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดหอมแดงในเอธานอลและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลการรักษาภาวะข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอื่น ควรทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเพื่อเป็นแนวทางในการนำสารดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป
2. หากสามารถหาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมได้ ควรทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ major component ซึ่งเป็นสารที่ทราบแล้ว เช่น ใช้สาร Allicin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในกระเทียมมาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอักเสบ ก็จะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งนี้ ควรแยกสารอื่นๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย
3. แม้ว่าผลการศึกษาเบื้องต้น ในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลให้ผลลบ แต่การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงให้ผลบวก ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดหอมแดงอาจมีฤทธิ์ระงับปวดในสภาวะที่มีการอักเสบร่วมด้วย จึงควรทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงด้วย Writhing test และควรพิสูจน์ฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองด้วย Rat-paw edema model
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นควรเลือกสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์และควรเลือกใช้หลายความเข้มข้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและสามารถสรุปและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมได้
5. สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบ แสดงว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลน่าจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยสารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติทั้งในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แม้ว่าในตัวอย่างสารสกัดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่มาก-น้อยแตกต่างกัน แต่มิได้บ่งบอกถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จึงจำเป็นต้องทำการพิสูจน์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทดสอบอื่นๆ อีก

เอกสารอ้างอิง

- จิราภา จอมโธสง. (2549). สารระงับจากผัก หอมแดง ใน จดหมายข่าว ส่วนส่งเสริมการผลิตผัก ไม้ดอกไม้ประดับและสมุนไพร. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. ปีที่ 3 ฉบับที่ 15.
- บุญเหลือ ศรีมุงคุณและอรอนงค์ วรรณวงษ์. (2552). ปลุกหอมแดงที่งามน้อย ใน น.ส.พ. กสิกร ปีที่ 82 ฉบับที่ 1 มกราคม – กุมภาพันธ์.
- ปราโมทย์ มหคุณากร และคณะ. (2553) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด (Study on the anti-inflammatory mechanisms of *Thunbergia laurifolia* leaf extracts). สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- นันทวัน บุญยะประภัศรและอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2543). สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน เล่ม 5. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด.
- พรทวี เลิศศรีสถิต สุชีลา จันทร์วิทย์านุชิต. ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs). Available at:
<http://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/NSAIDS.pdf>
 . Accessed 15/06/2557.
- วันดี ฤกษ์พนธ์. (2539). เกร็ดความรู้สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เมดิคอล มีเดีย.
- สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์. การอักเสบและการซ่อมแซม. Available at:
<http://www.med.cmu.ac.th/dept/patho/Lecture/07-09-inflammation&repair-text.pdf>
 Accessed 30/3/2555.
- สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน เรื่องกระเทียม. Available at: <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp>
 Accessed 9/9/2009.

- อำนวย ธิฐาพันธ์. Posted 04/20/2009. ความปวด Pain : concept & mechanism. ศูนย์การศึกษาต่อเนื่อง คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี. Available at: <http://ramacme.ra.mahidol.ac.th/?q=node/44>. Accessed 9/9/2009.
- Amin M, Kapadnis BP. (2005). Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi. Indian J Exp Biol. 43: 751-754.
- Barrot M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience. 211:39-50.
- Banerjee SK, and Maulik S. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders : a review. Nutri J. 4-18.
- Ban JO, et al. (2007). Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-kappaB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. J Pharmacol Sci. 104: 374-383.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. PlantaMed. 70: 93-103.
- Chang HP, Huang SY, Chen YH. (2005). Modulation of cytokine secretion by garlic oil derivatives is associated with suppressed nitric oxide production in stimulated macrophages. J Agric FoodChem. 53: 2530-2534.
- D'Amour FE. and Smith DL. (1941). A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther. 72: 74-79.
- de Leval X, Delarge J, Somers F, de Tullio p, Henrotin Y, Pirotte B, Dogne JM. (2000). Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. Curr Med Chem. 7: 1041-1062.
- Dirsch VM, Vollmar AM. (2001). Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? Biochem Pharmacol. 61: 587-593.

- Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. (2006). Anti diabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 13: 624-629.
- Elango EM, Asita H, Nidhi G, Seema P, Banerji A, Kuriakose MA. (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2 by diallyl sulfides (DAS) in HEK 293T cells. *J Appl Genet*. 45: 469-471.
- Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O. (2002). Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *J Agric Food Chem* 50, 5686-5690.
- Gorji A. (2003). Pharmacological treatment of headache using traditional persian medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*. 24 : 331-334.
- Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB. (2007). Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr*. 41: 218-223.
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Vollmar AM. (2003). Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr*. 133: 2171-2175.
- Kendler BS. (1987). Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med*. 16: 670-685.
- Kim KM, et al. (2001). Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med*. 30: 747-756.
- Kunnumakkara AB, et al. (2009). Traditional uses of spices: an overview. In: Aggarwal BB and Kunnumakkara AB (ed) *Molecular targets and therapeutic uses of spices- modern uses of ancient medicine*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, pp 1-24.
- Kumar GR and Reddy KP. (1999). Reduced nociceptive response in mice with alloxan induced hyperglycemia after garlic (*Allium sativum* Linn.) treatment. 37 :662-666. [Abst]

- Lanas A, Sopena F (2009). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications. *Gastroenterol Clin North Am.* 38 : 333-352.
- Lee EN, et al (2011). Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF- α - induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF-kappaB activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res.* 25: 92-100.
- Lee YL, Cesario T, Wang Y, Shanbrom E, Thrupp L. (2003). Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition.* 19: 994-996.
- Lee da Y, Li H, Lim HJ, Lee HJ, Jeon R, Ryu JH. (2012). Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. *J Med Food.*15: 992-999.
- Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki JM. (2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition.* 22: 266-274.
- Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Srichairatanakool S, Channarat , Gebicki JM. (2004). Anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects of Thai shallot (*Allium ascalonicum* L.) extracts in human monocytic (U937) cells. *Niigata J Health Welfare* 4, 11-21.
- Liu KL, Chen HW, Wang RY, Lei YP, Sheen LY, Lii CK. (2006). DATS reduces LPS- induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem.* 54: 3472-3478.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63
- Mohammadi-Motlagh HR, Mostafaie A, Mansouri K. (2011). Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Arch Med Sci* 7, 38-44.
- Owoyele BV, Abioye AIR, Afinowi NO, Jimoh SA, Soladoye AO. (2006). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Allium ascalonicum*. *Trop J Health Sci.* 13: 28-32.

- Park HJ, Jeon BT, Kim HC, Roh GS, Shin JH, Sung NJ, Han J, Kang D. (2012). Aged red garlic extract reduces lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and acute pulmonary inflammation through haeme oxygenase-1 induction. *Acta Physiol (Oxf)*. 205: 61-70.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol*. 5: 1142-1145.
- Raman p, Dewitt DL, Nair MG. (2008) Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytother Res*. 22: 204-212.
- Sarrell EM, Cohen HA, & Kahan E. (2003). Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics*. 111: 574-579. [Abst]
- Singleton VL, Joseph A and Rossi Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult*. 16:144-158.
- Schafer AL. (1999). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on platelets. *Am J Med*. 106: 25S-36S.
- Sengupta A, Ghosh S, Das S. (2004). Modulatory influence of garlic and tomato on cyclooxygenase-2 activity, cell proliferation and apoptosis during azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Lett*. 208: 127-136.
- Seyfi p, Mostafaie A, Mansouri K, Arshadi D, Mohammadi-Motlagh HR, Kiani A. (2010). In vitro and in vivo anti-angiogenesis effect of shallot (*Allium ascalonicum*): a heat-stable and flavonoid-rich fraction of shallot extract potently inhibits angiogenesis. *Toxicol In Vitro*. 24: 1655-1661.

- Shin JH, Ryu JH, Kang MJ, Hwang CR, Han J, Kang D. (2013). Short-term heating reduces the anti-inflammatory effects of fresh raw garlic extracts on the LPS-induced production of NO and pro-inflammatory cytokines by downregulating allicin activity in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 58: 545-551
- Shobana S, Naidu KA. (2000). Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 62: 107-110.
- Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. (2003). Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J Med Microbiol.* 52: 29-34
- Thomson M, Ali M. (2003). Garlic [*Allium sativum*] , a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug Targets.* 3: 67-81.
- Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K. (2011). Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem.* 11: 249-253.
- Wiczowski W, et al. (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. aggregatum) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr.* 138: 885-888.
- Wang HX, Ng TB. (2002). Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs. *Peptides* .23: 1025-1029.
- Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT. (2006). Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *Br J Pharmacol.* 148: 216-225
- Wongmekiat O, et al. (2008). Beneficial effect of shallot (*Allium ascalonicum* L.) extract on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 46(5): 1844-1850.
- Woolfe G, MacDonald AD. (1944). The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther.* 80: 300-7.

- Yin MC, Tsao SM. (1999). Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *Int J Food Microbiol.* 49: 49-56.
- Zamora R, Vodovotz Y, and Billiar TR. (2000). Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 6: 347-373.
- Zhao R, Zhou H, Su SB. (2013). A critical role for interleukin-1beta in the progression of autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 17: 658-669.

ภาคผนวก

การขอรับใบอนุญาตการรับรองให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ โครงการจัดตั้งกองส่งเสริมการวิจัยฯ สำนักงานอธิการบดี โทร. 3035, 3042

ที่ ศธ 0529.1.4/ 2484

วันที่ 5 มิ.ย. 2552

เรื่อง แจ้งรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

เลขที่	6059
วันที่	6 มิ.ย. 2552
เวลา	11-00

เรียน คณะบดีคณะเภสัชศาสตร์

ตามบันทึกข้อความคณะเภสัชศาสตร์ที่ ศธ 0529.11/ 9002 ลงวันที่ 9 ตุลาคม 2552 หน่วยงานของท่านได้ส่งข้อเสนอการวิจัย เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง ฉบับแก้ไขตามมติคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ซึ่งเห็นควรให้ปรับปรุงแก้ไขและชี้แจงเหตุผลการขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานวิจัยให้คณะกรรมการฯ พิจารณาอีกครั้งนั้น

บัดนี้ การพิจารณาการขออนุญาตใช้สัตว์ของข้อเสนอการวิจัยดังกล่าวได้ดำเนินการเรียบร้อยแล้ว คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เห็นชอบการให้สัตว์ทดลองตามข้อเสนอการวิจัยฉบับแก้ไข และได้นำเรียนอธิการบดีพิจารณาและลงนามในใบรับรองอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว ดังนั้น จึงใคร่ขอแจ้งรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามข้อเสนอการวิจัยดังกล่าว โดยมีเอกสารรับรองตามแนบ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และโปรดแจ้งผู้เกี่ยวข้องทราบ จักขอบคุณยิ่ง

(น.สพ.ดร.นันทกรณ สุรโสภณ)

รองประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เรียน อธิบดี

-เพื่อขอพิจารณา

เดิมขอหนังสือ อธิบดีฯ เรื่อง จักขอบคุณ

เพื่อทราบ 6 มิ.ย. 52

6 มิ.ย. 52

เรียน อธิบดีฯ

เพื่อขอพิจารณา

6 มิ.ย. 52

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

ID # 23 / 2552 / Research

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง

(ภาษาอังกฤษ) The Study of Analgesic Activity of the Extracts from *Allium ascalonicum*

ชื่อ-สกุลผู้เสนอข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) ดร.นุติยา วีระวัชรชัย

(ภาษาอังกฤษ) Miss Nuttiya Werawattanachai, Ph.D.

หน่วยงานที่สังกัด คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

กระทรวงศึกษาธิการ

สถานที่ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2553 ถึง วันที่ 30 กันยายน พ.ศ.2555

ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ ตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ ตามระยะเวลาที่กำหนดในใบรับรองนี้

ลงนาม 

(น.สพ.ดร.นันทกรณ อู่อโสมณ)

ตำแหน่ง แทนประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

วันที่ 26 ตุลาคม พ.ศ.2552

ลงนาม 

(ศาสตราจารย์ ดร.ประภอบ วิโรจน์ภู)

ตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

วันที่ 29 ตุลาคม พ.ศ.2552

การดำเนินการขออนุญาตซื้อขายเสพติดให้โทษประเภทที่ 2
จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โทร. 3630

ที่ ศธ 0529.11/ 4773

วันที่ 9 พฤษภาคม 2554

เรื่อง ขออนุญาตซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2 มอร์ฟินชนิดฉีดเพื่อใช้ในการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์
ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง

เรียน คณบดี คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ข้าพเจ้านางสาวนุศติยา วีระวัธนชัย อาจารย์ระดับ 7 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มีความประสงค์ขอซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2 มอร์ฟิน เพื่อใช้ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง” โดยใช้มอร์ฟินเป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดใน Mouse hot-plate model และ Mouse tail-flick model สถานที่ดำเนินการวิจัยคือ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ในการนี้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มีใบอนุญาตมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษ ในประเภท 2 ใบอนุญาตที่ 83/2550 หมวด ก ต่ออายุครั้งที่ 4 วันหมดอายุ วันที่ 31 ธันวาคม 2554 แล้ว ข้าพเจ้าจึงใคร่ขออนุญาตซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2 คือ Morphine for injection ชนิด ไม่มี preservative (กล่องสีม่วง) ขนาด 10 mg/ampule จำนวน 10 ampules จากกองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขเพื่อใช้ในการงานวิจัย ดังกล่าว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา หากอนุญาตขอได้โปรดลงนามในร่างหนังสือ และ แบบ ข.ศ. 4 คำขอซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2 ที่แนบมาพร้อมนี้

นุศติยา วีระวัธนชัย
(นางสาวนุศติยา วีระวัธนชัย)
อาจารย์ระดับ 7

อ.ศ. น.ดร.
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาริย์ ทองงอก)
หัวหน้ากลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์

เลขาธิการสมาคมเภสัช

11/5/54



ที่ ศธ 0529.11/ 4867

คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อำเภอวารินชำราบ
จังหวัดอุบลราชธานี 34190

11 พฤษภาคม 2554

เรื่อง ขอส่งเอกสารเพื่อประกอบคำขอซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2

เรียน เลขาธิการคณะกรรมการอาหารและยา

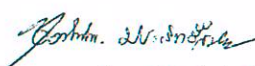
- สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. แบบ ข.ส. 4
2. สำเนาใบอนุญาตมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 จำนวน 1 ชุด
3. สำเนาบัตรประจำตัวข้าราชการ นางชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา จำนวน 1 ชุด

ด้วยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มีความประสงค์ขอซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2 มอร์ฟีน เพื่อใช้ในการวิจัยเรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง" ซึ่งมีนางสาวนุศติยา วีระวัธนชัย อาจารย์ระดับ 7 สังกัดกลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย ทั้งนี้ ในการวิจัยต้องใช้มอร์ฟีนเป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดใน Mouse hot-plate model และ Mouse tail-flick model

ในการนี้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จึงใคร่ขอนำส่งเอกสารเพื่อประกอบคำขอซื้อขายเสพติดให้โทษในประเภท 2 คือ Morphine for injection ชนิด ไม่มี preservative (กล่องสีม่วง) ขนาด 10 mg/ampule จำนวน 10 ampules

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

สำนักงานเลขานุการ
โทร. 045-353600
โทรสาร. 045-353626

แบบ ยส 4

เลขที่รับ.....
วันที่.....
ผู้รับ.....

คำขอซื้อยาเสพติดให้โทษในประเภท 2

เขียนที่ ...คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.....

วันที่9..... เดือน ...พฤษภาคม..... พ.ศ....2554..

ข้าพเจ้านางชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูมิวิชา..... ซึ่งเป็นผู้

ดำเนินการชื่อ.....คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.....

ได้รับอนุญาตให้จำหน่ายหรือมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 ตามใบอนุญาตที่83/2550.....

หมวดก.....

ณ สถานที่ชื่อ.....คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.....

อยู่เลขที่85..... ต.รอก/ซอย-..... ถนนวารินชำราบ-เดชอุดม.....

หมู่ที่ตำบล/แขวงเมืองศรีโค..... อำเภอ/เขตวารินชำราบ.....

จังหวัดอุบลราชธานี..... โทรศัพท์045-353611 -12.....

ขอยื่นคำร้องต่อเลขาธิการเพื่อขอซื้อยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 ตามรายการดังต่อไปนี้

ชื่อของสิ่งปรุง	ปริมาณ ของ สิ่งปรุง	ชื่อยา เสพติด ให้โทษ	ปริมาณของ ยาเสพติด ให้โทษคิด เป็นร้อยละ	ปริมาณยาเสพติดให้โทษ (ระบุเป็นหน่วย Amp, Tab, Cap, Patch)			
				ที่ขอซื้อ	ที่ได้รับ แต่ต้นปีถึงวันนี้	ที่ได้จำหน่าย แต่ต้นปีถึงวันนี้	ที่คงเหลือ
Morphine Injection ไม่มี pres. (กลั้วสีม่วง)	10 mg/amp.	Morphine	-	10 amp.	0 amp.	0 amp.	0 amp.

ขอรับรองว่ายาที่ขออนุญาตซื้อไม่เกินปริมาณซึ่งข้าพเจ้าได้รับอนุญาตให้มีได้

(ลายมือชื่อ) (ผู้ขอซื้อ)

หมายเหตุ ให้จัดส่งทางไปรษณีย์

ใบรับรองสำหรับตัวแทนในกรณีที่ได้รับอนุญาตไม่ได้มารับยาด้วยตนเอง

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผู้นำคำขอมานี้

เป็นตัวแทนข้าพเจ้าในการรับยาข้างบนนี้ และข้าพเจ้าขอรับผิดชอบในการรับยาและนำส่งให้ข้าพเจ้าโดยเรียบร้อย

(ลายมือชื่อ) (ผู้ขอซื้อ)

หมายเหตุ ให้ชี้แจงข้อความที่ไม่ต้องการออก

สำหรับเจ้าหน้าที่ผู้พิจารณาอนุมัติ

แบบ ข.ศ. 3



ใบอนุญาต

มีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษ

ในประเภท 2



ใบอนุญาตที่ 83/2550 หมวด ก.....

ใบอนุญาตฉบับนี้ให้ไว้แก่

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โดยมี นางสาว นงนิตย์ นีระวัฒนสุข เป็นผู้ดำเนินการ เพื่อแสดงว่า
เป็นผู้รับอนุญาตให้มีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อ
ใช้ในการเรียนการสอนรายวิชาปฏิบัติการเภสัชศาสตร์และเภสัชเวทของนักศึกษาเภสัชศาสตร์

รายการดังต่อไปนี้ คือ

ยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 ทุกชนิด

ณ สถานที่ชื่อ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อยู่เลขที่ 85 ตรอก/ซอย

ถนน วารินชำราบ-เดชอุดม หมู่ที่ ตำบล/แขวง เมืองศรีโคก

อำเภอ/เขต วารินชำราบ จังหวัด อุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 0-4535.3611-2

ใบอนุญาตฉบับนี้ให้ใช้ได้จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2550 และให้ใช้ได้เฉพาะสถานที่ซึ่งระบุไว้ในใบอนุญาตเท่านั้น

ให้ไว้ ณ วันที่ 6 เดือน พ.ศ. 2550

ตำแหน่ง



(นางไพศาล ประทุมมา)

ผู้อำนวยการกองควบคุมการ

เก็บรักษาการบัญชียาเสพติดและการออกใบอนุญาต

การต่ออายุใบอนุญาต

ใบอนุญาตนี้ต้องแสดงไว้ในที่เปิดเผย

และต้องต่ออายุภายในวันที่ 31 ธันวาคม ทุกปี

การต่ออายุ ครั้งที่ 1

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2551

(นายอรรถพร นามะ)

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการกองควบคุมการ

เก็บรักษาการบัญชียาเสพติดและการออกใบอนุญาต

28 ธ.ค. 2551

การต่ออายุ ครั้งที่ 2

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2552

(นายอรรถพร นามะ)

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการกองควบคุมการ

เก็บรักษาการบัญชียาเสพติดและการออกใบอนุญาต

28 ธ.ค. 2551

การต่ออายุ ครั้งที่ 3

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2553

(นายอรรถพร นามะ)

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการกองควบคุมการ

เก็บรักษาการบัญชียาเสพติดและการออกใบอนุญาต

30 ธ.ค. 2552

การต่ออายุ ครั้งที่ 4

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง
วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2554...

(ลายมือชื่อ)
(ตำแหน่ง)

ผู้อำนวยการกองบริหารการอาหารและยา
ผู้อนุญาต



การต่ออายุ ครั้งที่ 5

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ.

(ลายมือชื่อ)

ตำแหน่ง

ผู้อนุญาต

.....

การต่ออายุ ครั้งที่ 6

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ.

(ลายมือชื่อ)

ตำแหน่ง

ผู้อนุญาต

.....

รายการแก้ไขหรือเปลี่ยนแปลงในใบอนุญาต

ครั้งที่ 1/2554



อนุญาตให้เปลี่ยนผู้ดำเนินการ จาก นางสาวนงนิตย์ ชีระวัฒนสุข เป็น นางชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา

ทั้งนี้ตั้งแต่วันที่ 3 มีนาคม 2554 เป็นต้นไป



ปฏิบัติราชการแทนเลขาธิการคณะกรรมการอาหารและยา

สำเนาถูกต้อง

.....



ใบแจ้งหนี้ / ใบกำกับภาษี / ใบส่งของ

ต้นฉบับ

เอกสารออกเป็นชุด

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
กลุ่มเงินทุนหมุนเวียนยาเสพติด
ถ.ติวานนท์ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
โทร. 0-2590-7732, 0-2590-7736, 0-2590-7739, 0-2590-7781
โทรสาร 0-2590-7731
โปรดชำระหนี้ให้ถ้วน

วันที่ 01/06/2554

เลขที่ ข. 54/04403

เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 4 102030736

ชื่อผู้ซื้อ

มหาวิทยาลัยอัสสัมชัญ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอัสสัมชัญ

นางสุจินต์ ประสิทธิ์ผู้วิเศษ

85 ถ.วชิราลงกรณ์-เดชอุดม ต.เมืองศรีโค อ.วชิราลงกรณ์ จ.

อัสสัมชัญ 34190

รหัสสถานที่
24245รหัสผู้ถือใบอนุญาต
24245เลขที่คำขอซื้อ
02-2845/54วันที่ขอซื้อ
25/05/2554กำหนดชำระ
90 วันวันถึงกำหนด
30/08/2554

ลำดับ	รายการ	จำนวน	ราคาต่อหน่วย	จำนวนเงิน
1	Morphine Sulfate Injection 10 mg/ml Ampoules (P 479D)	1 : box	60.00	60.00

เจ้าหนี้ที่ทำการค้าขอซื้อยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์

ตั้งคำขอซื้อยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ กรุณาระบุ

เป็นเรียน ผู้อำนวยการกลุ่มเงินทุนหมุนเวียนยาเสพติด

กระทรวงสาธารณสุข

ฝ่ายขาย

จำนวนเงินรวมทั้งสิ้น (ตัวอักษร) [หกสิบบาทถ้วน]
 เสนอรับแล้ว โปรดส่งกลับคืนสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ใบ ด้วย ตามใบสั่งซื้อที่ : 02-2845/54 จำนวนภาษีมูลค่าเพิ่ม 7 %
 ได้รับทั้งของตามรายการข้างบนนี้ครบถ้วนและสัญญาว่าจะชำระเงินภายในวันที่ : 30/08/2554 จำนวนเงินที่ต้องชำระทั้งสิ้น 60.00

ผู้รับยา
()

นางนรดา คุณานุรักษ์กิจ

ผู้ออกใบแจ้งหนี้/

() ใบกำกับภาษี/ใบส่งของ ()

นายวิรัช เปาโรหิต

ผู้ส่งยา

* จำนวนยาในการสั่งซื้อโปรดระบุหน่วยเป็นหลอด เม็ด หรือ ขวด ให้ชัดเจน

* ยาที่ซื้อไป ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กลุ่มเงินทุนหมุนเวียนยาเสพติดไม่รับเปลี่ยน หรือคืน

1/154

เลขกำกับเอกสาร 54 ข 001290

ได้ใบแจ้งหนี้ ๑ ฉบับ

ใบขอรับการรักษาพยาบาลให้โทษทัณฑ์

ผู้รับ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ห้อง ๕๕

ถนน ขอนแก่น-อุดรธานี

ตำบลเมืองศรีไทย อำเภอเมืองขอนแก่น

จังหวัดขอนแก่น ๔๓๐๐๐

จำนวนใบขอรับการรักษา : ๑ ใบ

หมายเลขใบขอรับ : ๑

ตามรายชื่อผู้รับ

ตัวขอรับ : ๕๔/๐๒๔๕

ใบขอรับวันที่

: ๕๔/๐๔๔๐๓

online Sulfate Injection 10 mg/ml Ampoules (Preservative-Free) 4790

จำนวน 1 box

ลงชื่อผู้รับรักษา

ลงชื่อผู้ตรวจพบ



๑๖๕๖๗

วันที่ ๑ เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๔

แบบ บ.ร. 3



ใบอนุญาต

มีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษ

ในประเภท 2



ใบอนุญาตที่ 83 2550 หมวด ก

ใบอนุญาตฉบับนี้ให้ไว้แก่

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โดยมี

นางสาว นงนิตย์ ธีระวัฒนสุข

เป็นผู้ดำเนินการ เพื่อแสดงว่า

เป็นผู้รับอนุญาตให้มิไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อ

ใช้ในการเรียนการสอนรายวิชาปฏิบัติการเภสัชศาสตร์และเภสัชเวทของนักศึกษาเภสัชศาสตร์

รายการดังต่อไปนี้คือ

ยาเสพติดให้โทษในประเภท 2 ทุกชนิด

ณ สถานที่ชื่อ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ออกเลขที่ 85 ตรวจ/ชอย

ถนน วรวิชัย-เลขอุดม หมู่ที่ ตำบลแขวง เมืองศรีโค

อำเภอ เขต วรวิชัย จังหวัด อุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 0 4535 3611-2

ใบอนุญาตฉบับนี้ให้ใช้ได้จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2550 และให้ใช้ได้เฉพาะสถานที่ซึ่งระบุไว้ในใบอนุญาตเท่านั้น

ให้ไว้ ณ วันที่ 6 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550



ตำแหน่ง

(นายไพศาล ปวงมัย)

ผู้อำนวยการกองควบคุมคุณภาพการศึกษา

ใบอนุญาตนี้ต้องแสดงไว้ในที่เปิดเผย

และต้องต่ออายุภายในวันที่ 31 ธันวาคม ทุกปี

การต่ออายุใบอนุญาต

การต่ออายุ ครั้งที่ 1

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2551

(ลายมือชื่อ
นางสาวอรรณพ อมรรตวรังค์)
ตำแหน่ง ศึกษานิเทศก์

ผู้อำนวยการกองควบคุมคุณภาพการศึกษาและยา

2 S.O. 2551

การต่ออายุ ครั้งที่ 2

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2552

(ลายมือชื่อ
นายธีระ ชัยเศรษฐศิลป์)
ตำแหน่ง ศึกษานิเทศก์

ผู้อำนวยการกองควบคุมคุณภาพการศึกษาและยา

26 พ.ย. 2551

การต่ออายุ ครั้งที่ 3

ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง

วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2553

(ลายมือชื่อ
นายธีระ ชัยเศรษฐศิลป์)
ตำแหน่ง ศึกษานิเทศก์

ผู้อำนวยการกองควบคุมคุณภาพการศึกษาและยา

30 S.O. 2552

การต่ออายุ ครั้งที่ 4 ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2554 (นางสาวจิราพร จิตนรินทร์) ตำแหน่ง ผู้ช่วยกรรมการบริหาร คณะกรรมการอาหารและยา 4 ส.ค. 2554	การต่ออายุ ครั้งที่ 5 ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2555 (นางสาวจิราพร จิตนรินทร์) ตำแหน่ง ผู้ช่วยกรรมการบริหาร คณะกรรมการอาหารและยา 4 ส.ค. 2555	การต่ออายุ ครั้งที่ 6 ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2556 (นางสาวจิราพร จิตนรินทร์) ตำแหน่ง ผู้ช่วยกรรมการบริหาร คณะกรรมการอาหารและยา 4 ส.ค. 2556
--	--	--

รายการแก้ไขหรือเปลี่ยนแปลงในใบอนุญาต

ครั้งที่ 1/2554



อนุญาตให้เปลี่ยนผู้ดำเนินการ จาก นางสาวณนิตย์ จิระวัฒนสุข เป็น นางชุดินันท์ ประสิทธิ์อุริปริชา

ทั้งนี้ตั้งแต่วันที่ 3 มีนาคม 2554 เป็นต้นไป



ปฏิบัติราชการแทนเลขาธิการคณะกรรมการอาหารและยา



NRCT-JSPS RESEARCH REPORT

Preliminary study “Effect of Shallot Extract on the
Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2”

**National Research Council of Thailand-Japan Society for the Promotion of Science
(NRCT-JSPS) joint research program**

**Core University Program
RESEARCH REPORT**

Name of visiting scientist: Nuttiya Werawattanachai

Host scientist: Professor Koichi Ueno

Department of Geriatric Pharmacology and Therapeutics.
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-
8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba, 260-8675, JAPAN.

Topic of research in Japan:

Effect of Shallot Extract on the Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2

Effect of Shallot Extract on the Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2

Allium ascalonicum L. or shallot is a major component of many Asian diets and is widely believed to be beneficial to health. The shallot is relative to garlic, *Allium sativa* L. Garlic is now recognized as an important medicinal food with anti-aging effects, helping to reduce the risk of age-related, oxidant-mediated conditions, heart disease, cancer and chronic disease. Shallot bulb is darker than garlic and has a stronger odor that correlates with its sulfide content. Shallot has been reported to exhibit antioxidative and free radical scavenging activity similar to that associated with garlic. Chemical constituents of shallot include high contents of flavone, sulfur-containing compounds, and poly-phenolic derivatives. Both garlic and shallot are economic agricultural plant for Thai export and grown well in Srisaket, a northeastern province, Thailand.

Inflammation is a complex phenomenon involving multiple cellular and molecular interactions which must be tightly regulated. Pro-inflammatory molecules including platelet-activating factor, prostaglandins, enzymes, and free radicals, such as nitric oxide (NO). Among a variety of inflammatory mediators, two of the most prominent are nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS) and prostaglandins by cyclooxygenase-2 (COX-2; prostaglandin H₂ synthase). When iNOS was up-regulated in inflammatory cells, COX-2 expression increased in a similar pattern, suggesting the interaction between iNOS and COX-2. Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2 suggesting anti-inflammatory activity of the test compound. It is likely that shallot may be useful to alleviate an inflammatory pain by inhibiting the expression of the inflammatory mediators.

Objectives :

1. To investigate the effect of shallot extract on the expression of iNOS compare to garlic extract.
2. To investigate the effect of shallot extract on the expression of COX-2 compare to garlic extract.

Material and Methods :

Plant materials :

The plant materials were purchased from local market in Si Saket Province, Thailand, and were identified by Assistant Professor Rawiwun Kaewammatawong, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

Extraction : The plant materials were cut into small pieces and were macerated in ethanol for 3 days and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure until dryness and then were lyophilized. All extracts are stored in the dessicator.

All of the tested materials were dissolved in MilliQ water at the concentration of 1,000 mg/ml as stock solutions.

Macrophage cell culture :

Mouse macrophage cell line, RAW 264.7 were cultured in RPMI-1640 medium, containing 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics.

Macrophages were incubated at 37 °C in humidified atmosphere of 5% CO₂ /95% air.

Cell viability assay :

The effect of extract on cell viability was evaluated by MTT assay, in which MTT is reduced to formazan in viable cells. In brief, RAW264.7 cells were seeded onto a 96-well plat at a density of 3×10^4 cells per well and incubated at 37 °C for 24 h. The cells were then treated with various concentrations of extract. After 48 hour incubation, 100 μ l of the 0.25 mg/ml MTT solution was added to the wells. Cultures were incubated in a 5% CO₂ incubator at 37 °C for 1 hr and the culture medium in each well was aspirated off without disturbing the formazan precipitate. Then 100 μ l of DMSO was added to each well to solubilize the formazan crystals. The absorbance in each well was measured using microplate reader at a measuring wavelength of 540 nm and a reference wavelength of 650 nm. The cellular reduction of MTT which represents metabolic activity and viability was expressed as the percent absorbance of treated cells compared with the absorbance of control cells.

Nitrite assay or NO detection :

RAW 264.7 cells were seeded onto a 6-well culture plate at a density of 1×10^6 cells per well with 2,000 μ L of culture medium and incubated for 24 h. Cells were treated with LPS (1 μ g/mL) and different concentrations of test compounds (Garlic and Shallot extract; 250 μ g/mL, 1,000 μ g/mL). After 48 hour incubation, nitrite levels in the cultured media which reflect intracellular nitric oxide synthase activity were determined by Griess reaction. Briefly, The supernatants (0.05 ml) were simultaneously treated with 0.05 ml Griess solution (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, and 5% phosphoric acid) for 10 min at room temperature. NaNO_2 was used to generate a standard curve; nitrite production was measured by a spectrophotometer at 540 nm. And the calculated concentration was taken as the indicator of NO production.

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction :

RAW264.7 cells were co-treated with different concentration of extract and LPS (1 μ g/mL). The total RNA was purified from the cells using RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and subjected to semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using an PCR Thermal Cycler (TaKaRa) with *PreMix Ex Taq* Hot Start Version (TaKaRa) according to the manufacturer's instructions. Sequences of primers used in a RT-PCR analysis for quantification of iNOS, eNOS, TNF- α , COX-2 and β -actin transcripts were as follows (F: forward, R: reverse) :

iNOS (449 bp)

F : 5'-ATGTCCGAAGCAAACATCAC-3' (T_m =62.5)

R : 5'-TAATGTCCAGGAAGTAGGTG-3' (T_m =56.6)

COX-2 (582 bp)

F : 5'-TTTGATTAGTAGTACTACTGTAGGGTTAATG-3' (T_m =62.4)

R : 5'-ACTCACTCAGTTTGTTGAGTCTATTC-3' (T_m =57.1)

β -actin (101 bp)

F : 5'-TGTCCACCTTCCAGCAGATGT-3' (T_m =58.0)

R : 5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA-3' (T_m =60.0)

The mRNA of β -actin is used as an internal control.

Condition of reaction :

iNOS

95°C 5 min

95°C 30 sec

49°C 30 sec } 30 cycles

68°C 90 sec }

68°C 10min

4°C ∞

• COX2

95°C 5 min

95°C 30 sec

57°C 45 sec } 34 cycles

72°C 60 sec }

72°C 10 min

4°C ∞

The PCR products were analyzed on 3% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide and viewed with UV transillumination. The density of target bands were quantified by image. Results were expressed as relative ratios of band intensity between the mRNA of interest and β -actin mRNA.

Real time PCR analysis :

Macrophages were incubated for 48 hour with or without LPS (1 μ g/mL). After washing with PBS twice, total RNA was isolated from the cell pellet using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's directions. Quantitative real time PCR was performed with the SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa), and results were analyzed with the ABI StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems). Each 20 μ L PCR reaction contained 2 μ L of the original cDNA, 0.4 μ L (10 μ M) of each primer, 0.4 μ L of ROX Reference Dye (50X), 10 μ L of SYBR Premix Ex Taq (2X), and 7.2 μ L D.W. The PCR

amplification was performed under the following conditions: 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 95 °C for 5 s and extension at 60 °C for 31 s. The fluorescence signal was detected at the end of each cycle. Melting curve analysis was used to confirm the specificity of the products.

Results :

1. Effects of Shallot and Garlic extracts on cell viability

RAW 264.7 macrophage viability in the presence of Shallot extract and Garlic extract are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. Shallot extract did not show obvious cytotoxicity to RAW 264.7 cells with the concentration of compound up to 1,000 µg/mL after 48 hour incubation. Garlic extract show concentration dependent to affect cell viability. At 1,000 µg/mL Garlic extract decreased percent cell viability to 17.59. With this result, concentrations 250 µg/mL and 1,000 µg/mL of Shallot extract and Garlic extract were chosen for subsequent experiments.

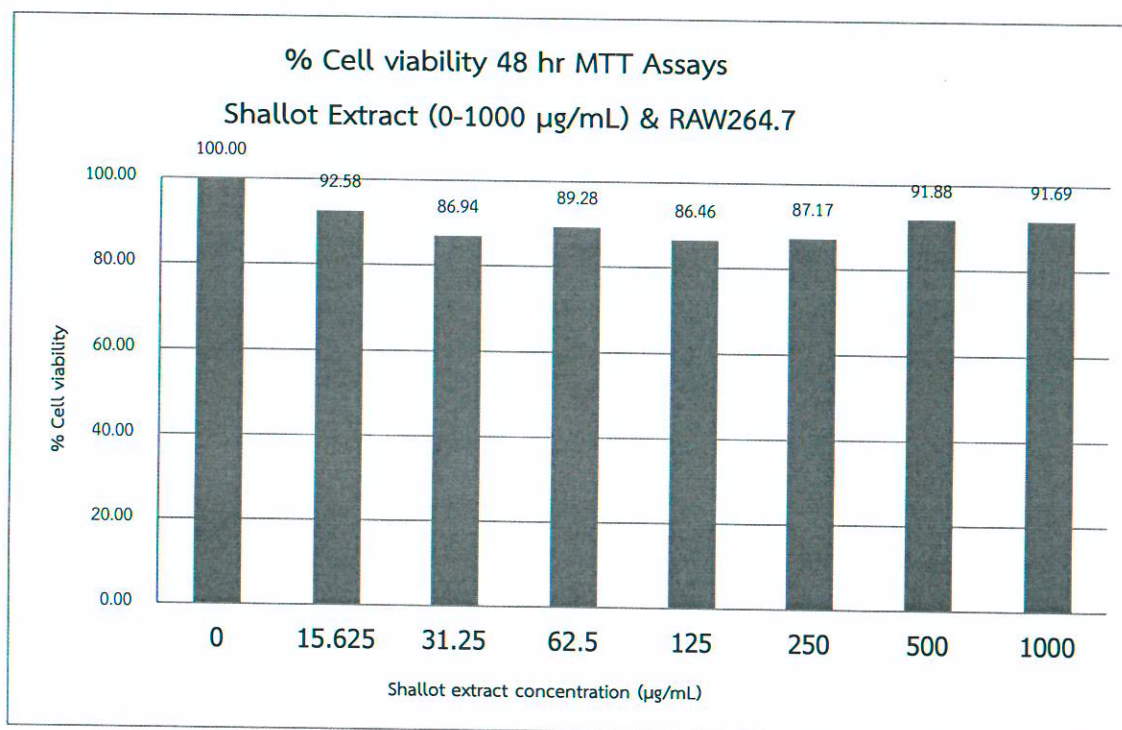


Fig. 1. Effects of Shallot extract on the cell viability. Cell viability was evaluated by MTT assay 48 hour after Shallot treatment in RAW 264.7 macrophages.

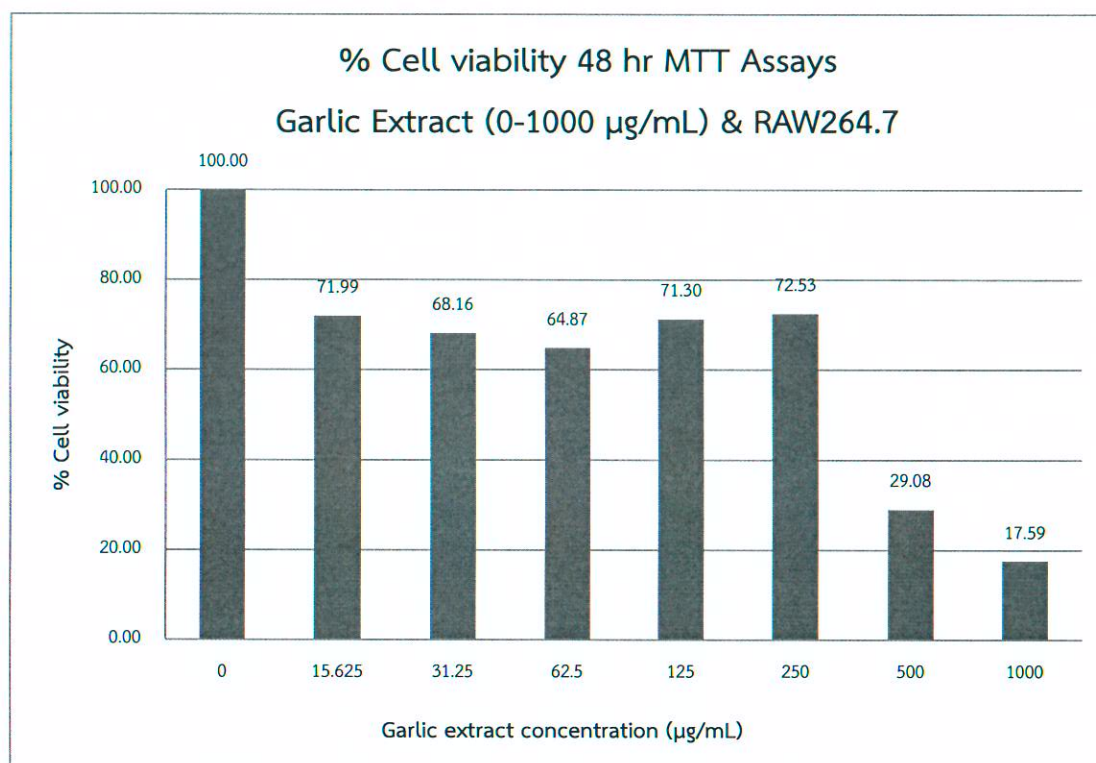


Fig. 2. Effects of Garlic extract on the cell viability. Cell viability was evaluated by MTT assay 48 hour after Garlic treatment in RAW 264.7 macrophages.

2. Effects of Shallot and Garlic extracts on NO production

The effects of Shallot and Garlic extracts on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells are shown in Fig. 3 (RAW 264.7 1×10^6 cells) and Fig. 4 (RAW 264.7 2.5×10^5 cells). RAW 264.7 cells were treated with extract at concentration 250 and 1,000 µg/mL and LPS (1 µg/mL) for 48 hour. Nitrite levels in LPS-stimulated cells increased significantly compared to control. LPS-induced NO production was decreased by Garlic extract at the concentration 250 µg/mL, however it was not shown a dose-dependent manner. In RAW 264.7 macrophage cell culture (2.5×10^5 cells), LPS-induced NO production was decreased by 250 µg/mL, 1,000 µg/mL Garlic extract and 1,000 µg/mL Shallot extract. To investigate the effects of Shallot and Garlic extracts on NO production in RAW 264.7 with or without LPS stimulation, the average ratio compare to no LPS and no extract condition were calculated and shown in Fig.5.

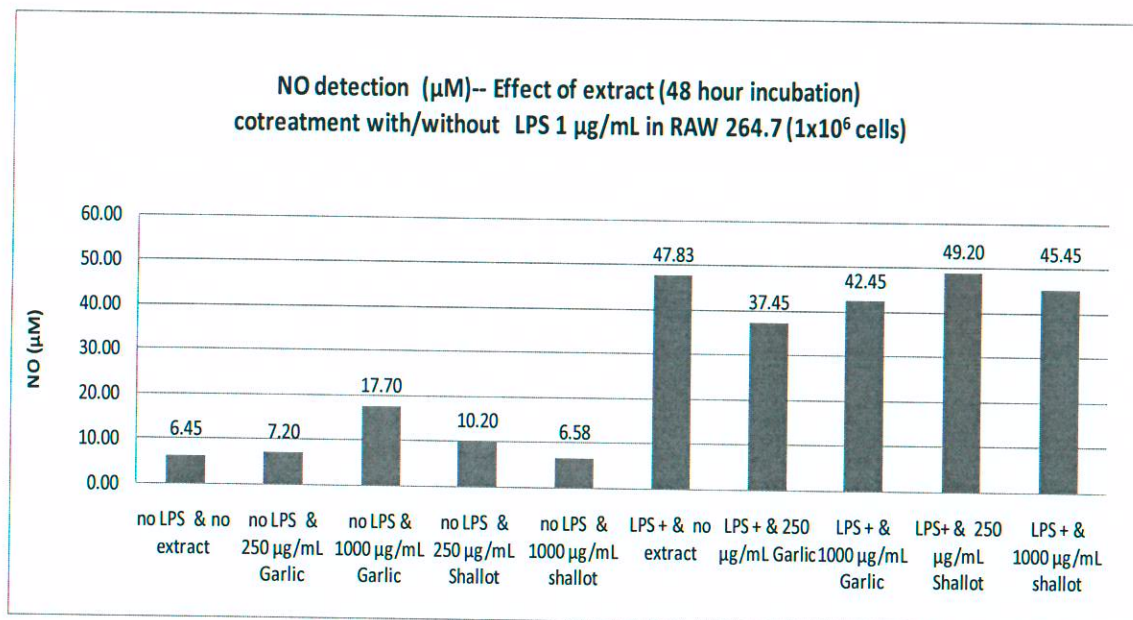


Fig. 3. Effects of Shallot and Garlic extracts on nitrite (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (1×10^6 cells/well). NO production was measured by the Griess reaction assay and expressed as a μM of NO.

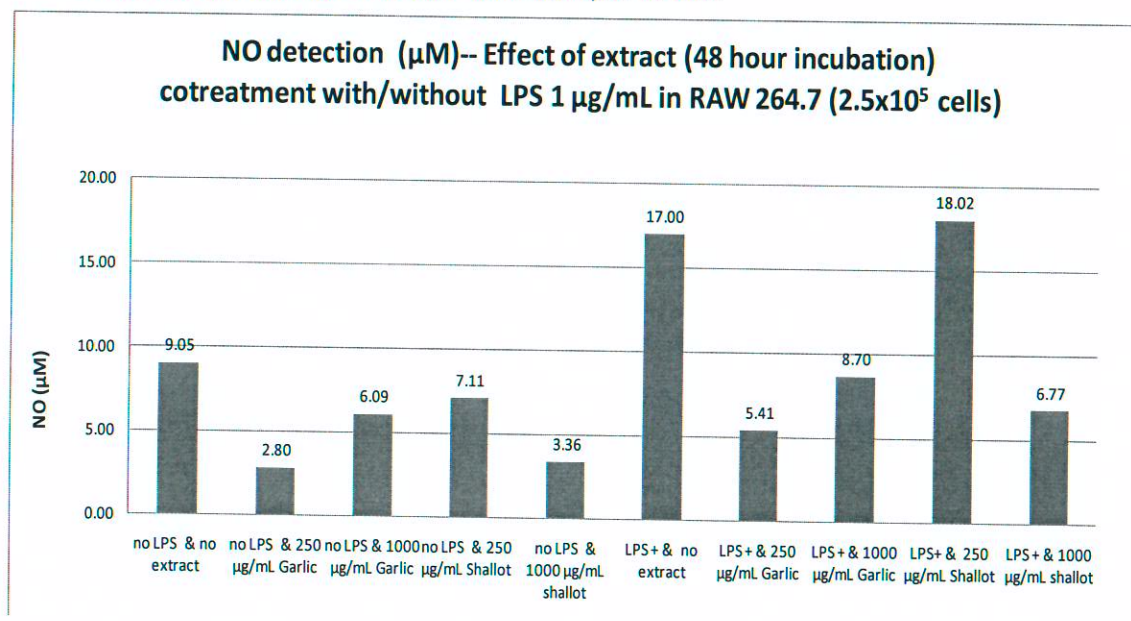


Fig. 4. Effects of Shallot and Garlic extracts on nitrite (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (2.5×10^5 cells/well). NO production was measured by the Griess reaction assay and expressed as a μM of NO.

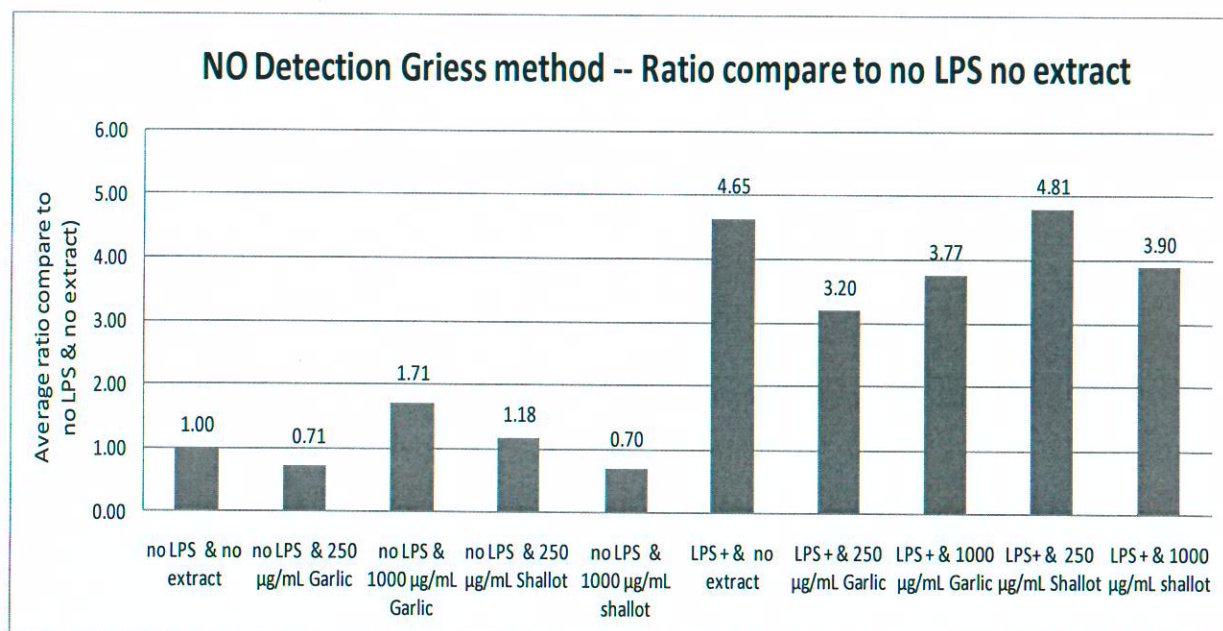


Fig. 5. Effects of Shallot and Garlic extracts on nitrite (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The ratio of NO production in each experiment were compared to no LPS and no extract condition.

3. Effects of Shallot and Garlic extracts on the expression of iNOS and COX-2

3.1 Reverse transcription polymerase chain reaction analysis

LPS stimulation alone can induce iNOS and COX-2 transcription. The effects of Shallot and Garlic extracts on the expression of iNOS and COX-2 were not clearly by reverse transcription polymerase chain reaction experiments as shown in agarose gel UV transillumination in Fig.6 and Fig.7, respectively.

<i>Lane 1 no LPS & no extract</i>	<i>Lane 2 no LPS & 250 μg/mL Garlic</i>
<i>Lane 3 no LPS & 1000 μg/mL Garlic</i>	<i>Lane 4 no LPS & 250 μg/mL Shallot</i>
<i>Lane 5 no LPS & 1000 μg/mL shallot</i>	<i>Lane 6 LPS + & no extract</i>
<i>Lane 7 LPS + & 250 μg/mL Garlic</i>	<i>Lane 8 LPS + & 1000 μg/mL Garlic</i>
<i>Lane 9 LPS+ & 250 μg/mL Shallot</i>	<i>Lane 10 LPS + & 1000 μg/mL shallot</i>

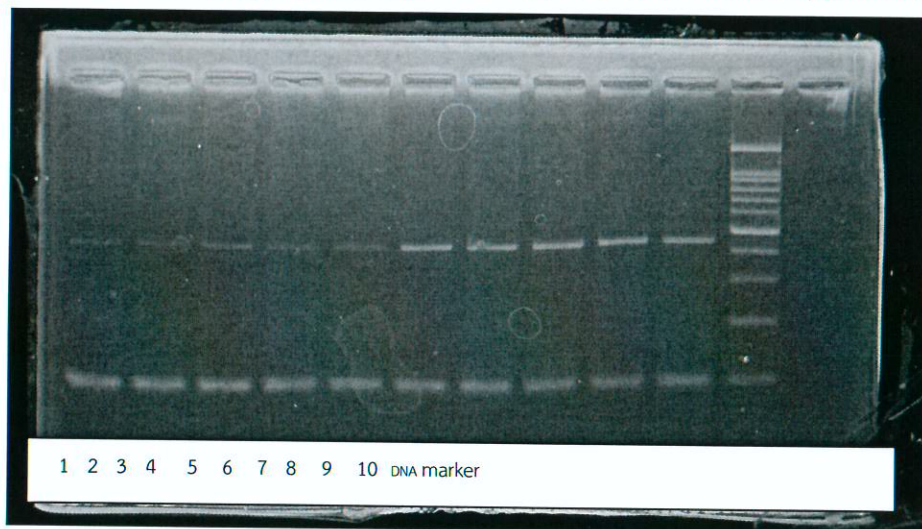


Fig.6. Expression of *iNOS* in RAW 264.7 after exposure to Shallot and Garlic for 24 hour after LPS stimulation

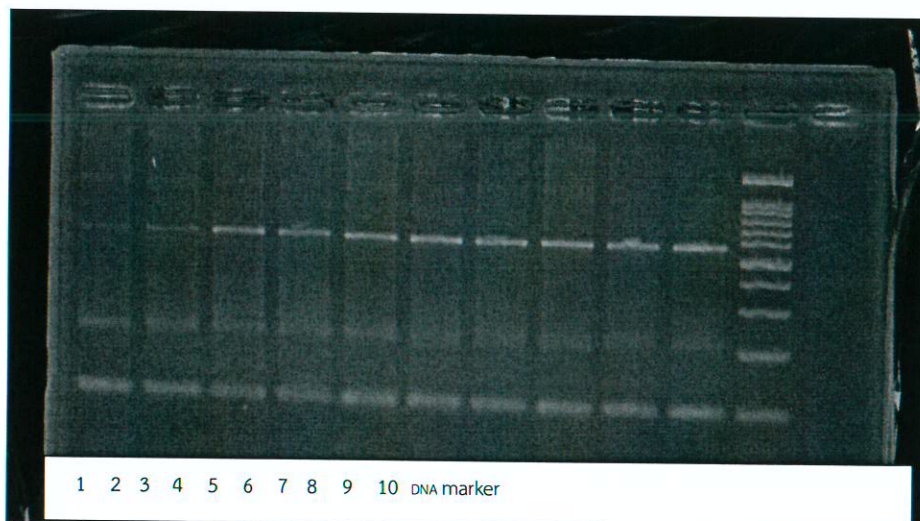


Fig.7. Expression of *COX-2* in RAW 264.7 after exposure to Shallot and Garlic for 24 hour after LPS stimulation

3.2 Real –time polymerase chain reaction analysis

In real-time PCR experiments, both Shallot and Garlic extract have no effect on *iNOS* expression in LPS-activated macrophage. Garlic extract at the concentration 250 µg/mL and Shallot extract at the concentration 250 and 1,000 µg/mL attenuates increase in COX-2 expression in LPS-activated macrophage.

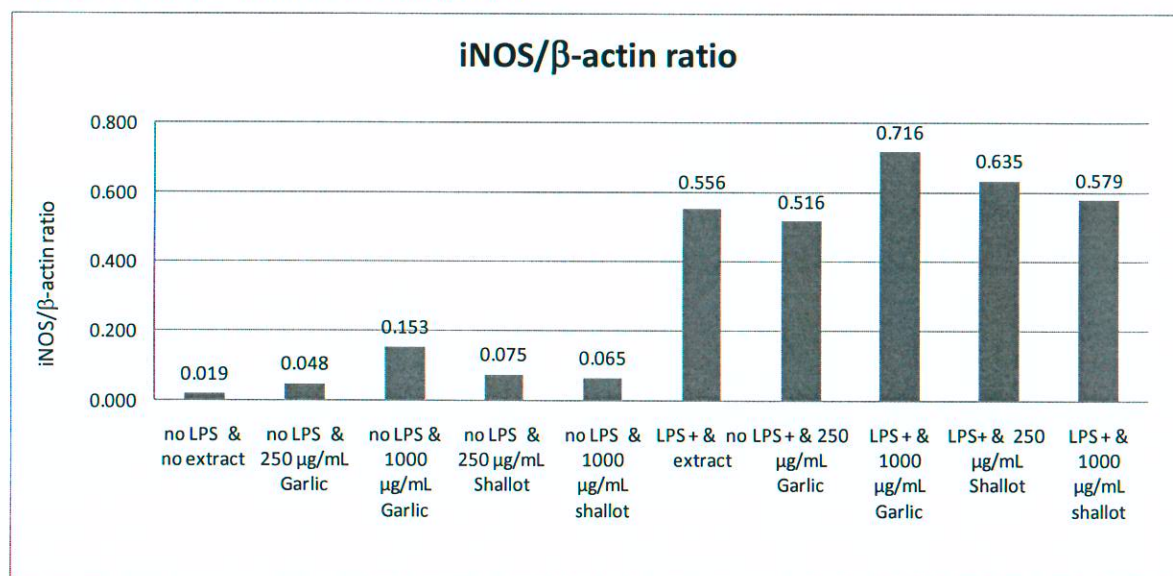


Fig.8. Real time PCR for the expression of *iNOS* in RAW 264.7 after coculture between Shallot or Garlic and LPS for 48 hour

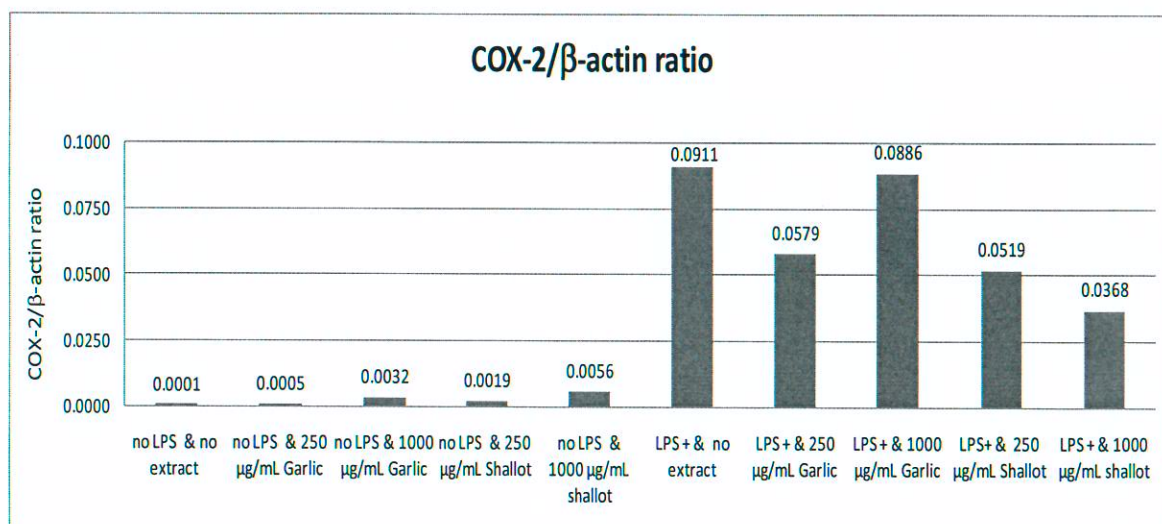


Fig.9. Real time PCR for the expression of *COX-2* in RAW 264.7 after coculture between Shallot or Garlic and LPS for 48 hour

Summary :

The numbers of viable murine RAW 264.7 macrophages were not altered by the Shallot extract (0 – 1,000 µg/mL) as determined by MTT assays, indicating that shallot did not show cytotoxicity. Garlic extract (1,000 µg/mL) markedly decreased RAW 264.7 cell viability to 17.59%.

LPS stimulation alone at the concentration 1 µg/mL can induce NO production. In Greiss Method, nitrite levels in LPS-stimulated cells increased significantly compared to control. To evaluate whether extracts could modulate NO production by activated macrophages, we examined the effects of Shallot and Garlic extract on NO production by RAW 264.7 cells. As shown in Fig.5, Shallot extract (1,000 µg/mL) and Garlic extract (250 and 1,000 µg/mL) inhibited LPS-induced NO production by RAW 264.7 cells. However, Shallot and Garlic extract did not attenuate the increase in iNOS expression in both reverse transcription-polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction. these results suggest that the mechanism that Shallot and Garlic extract inhibited NO production maybe not involving the reduction of iNOS mRNA expression. Further studied would be needed to confirm these results.

In a variety of inflammatory cells, including macrophages, COX-2 is induced by LPS, resulting in the release of large amounts of PGE₂ at inflammatory sites. As shown in real-time polymerase chain reaction analysis in Fig. 9, the results suggested that Shallot extract (1,000 µg/mL) and Garlic extract (250 and 1,000 µg/mL) decreases the production of COX-2 by LPS-activated RAW 264.7 macrophages.

In summary of this preliminary study, we have shown that the ethanolic extract of Shallot and Garlic suppresses the production of proinflammatory mediators in murine macrophage cells exposed to LPS especially COX-2. Further investigations on the anti-inflammatory activity of these extracts need to be performed.

Acknowledgement :

The author thank Professor Koichi Ueno and Assistant Professor Hiromi Sato, Department of Geriatric Pharmacology and Therapeutics. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba, 260-8675, JAPAN. This study was supported by the research grant from the NRCT-JSPS JFY2010.

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม
โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยส่ง ตัวอย่างสารสกัดหยาบ 2 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสารสกัด A เป็นสารสกัดหอมแดงในเอธานอล ลักษณะขุ่นหนืด สีน้ำตาล ละลายน้ำได้ดี และสารสกัด B เป็นสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน ละลายน้ำได้ดี ไปทดสอบที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยส่งสารสกัดเพื่อทดสอบ

6.1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Cancer cell growth inhibition) ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB: human oral cavity carcinoma ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7: human breast adenocarcinoma ATCC HTB22) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187: human small cell lung carcinoma ATCC CRL-5804) ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (Brien et al., 2000) และใช้ Ellipticine, Doxorubicin และ Tamoxifen เป็น positive control และมี 0.5% DMSO และน้ำเป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทำได้โดยนำ cell line ของมะเร็งแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงและเจือจางให้มีความหนาแน่น ดังนี้ เซลล์มะเร็งในช่องปาก 2.2×10^4 cells/ml และเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปอดจำนวน 3.3×10^4 cells/ml ใส่เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงปริมาตร 45 μ l ในถาดหลุมชนิด 384-well plates พร้อมกับใส่สารสกัดหยาบความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 5% DMSO ปริมาตร 5 μ l ลงในถาดหลุม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน สภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลาต่างๆ กันในแต่ละเซลล์มะเร็ง โดยเพาะเลี้ยงไว้นาน 3 วันสำหรับเซลล์มะเร็งในช่องปากและเซลล์มะเร็งเต้านม และเป็นเวลานาน 5 วันสำหรับเซลล์มะเร็งปอด เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 62.5 μ g/ml ลงไป 12.5 μ l ในแต่ละหลุมทดสอบ นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการเรืองแสง fluorescence ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

6.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cells) ด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP) detection (Hunt et al., 1999) และใช้ Ellipticine เป็น positive control และ 0.5% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero, ATCC CCL-81) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ไตของลิง และติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) โดย transfect cell ด้วย pEGFP-N1 plasmid (Clontech) และเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate และ geneticin 0.8 mg/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ไตของลิง (Vero) ให้มีความหนาแน่น 3.3×10^4 cells/ml ใส่เซลล์เพาะเลี้ยงปริมาตร 45 μ l ลงในถาดหลุมชนิด 384-well plates พร้อมกับใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 5% DMSO ปริมาตร 5 μ l ลงในถาดหลุม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน สภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 4 วัน นำไปวัดค่าการเรืองแสง ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 485 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 535 นาโนเมตร คำนวณหา % cytotoxicity จากสมการ

$$\% \text{ cytotoxicity} = [1 - (FU_T / FU_C)] * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

คำนวณค่า IC₅₀ ของ Ellipticine จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น 6 ความเข้มข้น และการเรืองแสง โดยใช้โปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular device)

6.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (Brien et al., 2000) และใช้ Amphotericin B เป็น positive control และ 0.5% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ *Candida albicans* (ATCC 90028) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ *Candida albicans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 3 วัน และนำโคโลนีของยีสต์มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 จนกระทั่งเซลล์

เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่น 5×10^5 CFU/ml ใส่เซลล์ยีสต์ปริมาตร 45 μ l ในถาดหลุมชนิด 384-well plates พร้อมกับใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 5% DMSO ปริมาตร 5 μ l ลงในถาดหลุม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน สภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลานาน 5 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 62.5 μ g/ml ลงไป 10 μ l ในแต่ละหลุมทดสอบ นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการเรืองแสง fluorescence ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 530 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 590 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

คำนวณค่า IC₅₀ ของ Amphotericin B จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและการเรืองแสง โดยใช้โปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular device) ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้นโดยเจือจางสารให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution)

6.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Ra) ด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP) detection (Changsen et al., 2003; Collins et al., 1998) และใช้ Rifampicin, Ofloxacin, Streptomycin, Isoniazid และ Ethambutol เป็น positive control และ 0.5% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Ra) และติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) เพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1×10^5 CFU/ml/well ใส่เซลล์เพาะเลี้ยงปริมาตร 45 μ l ลงในถาดหลุมชนิด 384-well plates พร้อมกับใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 5% DMSO ปริมาตร 5 μ l ลงในถาดหลุม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 10 วัน นำไปวัดค่าการเรืองแสง ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 485 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 535 นาโนเมตร

คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

หาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 90% โดยเจือจางสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution)

6.5 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคใบไหม้ในข้าว *Magnaporthe grisea* ด้วยวิธี 5,(6) carboxy fluoresce diacetate (CFDA) fluorometric detection (Haugland, 2002; NCCLS, 2002) และใช้ Amphotericin B เป็น positive control และ 5% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคใบไหม้ในข้าว ทำได้โดยนำสปอร์ของ *Magnaporthe grisea* (Mat 1-1 strain THL16, BCC 100008) ที่เพาะเลี้ยงใน 10% Salt medium ใส่ในภาตหลุมชนิด 384-well plates ให้มีความหนาแน่น 1×10^5 spores/25 μ l/well พร้อมกับใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 0.5% DMSO ปริมาตร 25 μ l ลงในภาตหลุม บ่มไว้นาน 14-16 ชั่วโมง จากนั้นเติม distilled water 25 μ l เติมสาร 5,(6) carboxy fluoresce diacetate (CFDA) ใน 70 %DMSO ปริมาตร 2 μ l วางทิ้งไว้นาน 5 นาที ทำการล้างออกด้วยน้ำประปาและวางให้แห้งบนกระดาษ จากนั้น นำไปอ่านค่าการเรืองแสง ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 485 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 535 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

หาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ Amphotericin B ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 90% โดยเจือจางสารให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial

dilution)

6.6 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคเมล็ดต่างในข้าว *Curvularia lunata* ด้วยวิธี 5,(6) carboxy fluoresce diacetate (CFDA) fluorometric detection (Haugland, 2002; Josep et al., 1988; NCCLS, 2002) และใช้ Amphotericin B เป็น positive control และ 5% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคเมล็ดต่างในข้าว ทำได้โดยนำสปอร์ของ *Curvularia lunata* DOAC 1479 (BCC 15558) ที่เพาะเลี้ยงใน 10% Salt medium ใส่ในภาตหลุมชนิด 384-well plates .ให้มีความหนาแน่น 1.4×10^5 spores/ml วางไว้ในที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์ติดอยู่ที่บริเวณก้นหลุม จากนั้นใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 µg/ml ที่ละลายใน 0.5% DMSO ปริมาตร 25 µl ลงในภาตหลุม บ่มไว้นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติม cocktail ประกอบด้วย 40% Glycerol และ 5,(6) carboxy fluoresce diacetate (CFDA) ความเข้มข้น 0.145 mM ใน 70 %DMSO ปริมาตร 25 µl. ลงในหลุมทดสอบ วางทิ้งไว้ในที่มืดนาน 5 นาที ทำการล้างออกด้วยน้ำประปาและวางให้แห้งบนกระดาษ จากนั้น นำไปอ่านค่าการเรืองแสง ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 485 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 535 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

หาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ Amphotericin B ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 90% โดยเจือจางสารให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution)

6.7 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) (Sarker et al., 2007) และใช้ Vancomycin เป็น positive control และ 0.5% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 (TISTR 687) ทำได้โดย Streaked เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) และเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวออกมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด broth นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที ทำการเจือจางเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาทีนาน 3 ชั่วโมง เตรียมเชื้อแบคทีเรีย 15,000 cells ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth ใส่เซลล์ปริมาตร 75 μ l ในถาดหลุมชนิด 384-well plates พร้อมกับใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 5% DMSO ปริมาตร 7.5 μ l ลงในถาดหลุม ใส่สารละลาย resazurin ความเข้มข้น 0.25 mM 25 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงนำไปวัดค่าการเรืองแสง fluorescence ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 530 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 590 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_C หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

หาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐาน Vancomycin ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 90%

6.8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuramidase ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ด้วยวิธี Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay) (Potier et al., 1979) และใช้ Oseltamivir เป็น positive control และ 1% DMSO เป็น negative control

วิธีการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuramidase ทำได้โดยใส่เอนไซม์ neuramidase 5 μ l (0.2 ยูนิต) ในถาดหลุมชนิด 384-well plates พร้อมกับใส่สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 50 μ g/ml ที่ละลายใน 5% DMSO ปริมาตร 5 μ l ลงในถาดหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสาร

fluorogenic substrate; 2'-4 Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) 10 μ l ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสาร 100 μ M glycine pH 10.7 ใน 25% เอทานอล ปริมาตร 30 μ l นำไปวัดค่าการเรืองแสง fluorescence ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader ที่ excitation wavelength 365 นาโนเมตรและ emission wavelength ที่ 450 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \{1 - [(FU_T - FU_B) / (FU_F - FU_B)]\} * 100$$

โดยค่า FU_T หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มทดสอบ

FU_F หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุมที่มีเฉพาะ
เอนไซม์นิวรามิเดส

FU_B หมายถึงค่าเฉลี่ยของการเรืองแสง fluorescence ของกลุ่มควบคุม

คำนวณค่า IC_{50} ของ Oseltamivir carboxylate จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและการเรืองแสง โดยใช้โปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular device) ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้นโดยเจือจางสารให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 3 เท่า (3-fold serial dilution)

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมไม่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งในช่องปาก มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด ไม่มีพิษต่อเซลล์ไตของลิง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ เชื้อราโรคใบไหมในข้าว เชื้อราโรคมล็ดต่างในข้าว เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเอนไซม์ Neuramidase ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ดังแสดงในตารางที่ 6-1

สำหรับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคพบว่าสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* ได้ ในขณะที่สารสกัดหอมแดงในเอธานอลที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรค ดังแสดงในตารางที่ 6-1

ตารางที่ 6-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม ในเอธานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยศูนย์ BIOTEC

	การทดสอบฤทธิ์	สารสกัดหอมแดงในเอธานอล (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	สารสกัดกระเทียมในเอธานอล (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1.	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB: human oral cavity carcinoma)	Inactive	Inactive
2.	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7: human breast adenocarcinoma)	Inactive	Inactive
3.	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187: human small cell lung carcinoma ATCC CRL-5804)	Inactive	Inactive
4.	ความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cells)	Non-cytotoxic	Non-cytotoxic
5.	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ <i>Candida albicans</i>	Inactive	Inactive
6.	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Inactive	Active
7.	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคใบไหม้ในข้าว <i>Magnaporthe grisea</i>	Inactive	Inactive
8.	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคเมล็ดต่างในข้าว <i>Curvularia lunata</i>	Inactive	Inactive
9.	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก <i>Bacillus cereus</i>	Inactive	Inactive
10.	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuramidase ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1	Inactive	Inactive

เอกสารอ้างอิงการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

- Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 267:5421-6.
- Changsen C, Franzblau SG, Palittapongarnpim P. (2003). Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3682-7.
- Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. (1998). Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:344-7.
- Haugland, RP. (2002). Assays for cell viability, proliferation and function. In *Handbook of fluorescent probes and research products* ed. Gregory, J. Oregon, USA: Molecular Probes, Inc. pp. 966.
- Hunt L, Jordan M, De Jesus M, Wurm FM. (1999). GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode. *Biotechnol and Bioeng.* 65: 201-5.
- Josep G, Isabel P, Carmen A, Cories L and Joan F. (1998). Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 42: pp. 385 - 3871.
- Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Melancon SB. (1979). Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4- methylumbelliferyl-a-D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal. Biochem.* 94: 287-296.
- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 42: 321-324

POSTER PRESENTATION

In 18th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN)

“Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness”

December 1-3, 2014: Ubon Ratchathani, THAILAND



18th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN)
“Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness”

LETTER OF ACCEPTANCE

Technical Program Committee
Faculty of Agriculture,
Ubon Ratchathani University,
Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190 THAILAND
Tel : +66-45-353-500, Fax : +66-45-288373
conference_food@ubu.ac.th

30 October, 2014

Dear Miss Nuttiya Werawattanachai,

We are pleased to inform you that the Technical Program committee of 18th WCCN has decided to **ACCEPT** your article to be presented in the 18th WCCN.

The 18th WCCN will be held at Sunee Grand Hotel & Convention Center, Ubon Ratchathani, Thailand, December 1-3, 2014.

Article Title: Anti-Inflammatory Potential of Ethanolic Bulb Extract of *Allium ascalonicum* Through Alteration in Production of Inducible Nitric Oxide Synthase and Pro-inflammatory Cytokines

Presentation Type: Poster Presentation

Please visit our website at <http://18thwccn.ubu.ac.th/index.php> to prepare the abstract and manuscript separately regarding to the instructions and the template. The submission of manuscripts proceeds fully online by connecting to <http://www.ubu.ac.th/wccn/>, in the same way you have already submitted your abstract. Please note that if you wish to publish your abstract and full paper in our proceedings, you have to submit your paper by the deadline indicated in the Announcement.

Thank you in advance for your contribution toward the success of WCCN. We are looking forward to welcoming you in 18th WCCN 2014.

Yours sincerely,

(Asst. Prof. Dr. Wiriya Phomkong)
Chairman, 18th WCCN Technical Program



December 1-3, 2014: Ubon Ratchathani, THAILAND
 18th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN)
 "Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness"

Anti-Inflammatory Potential of Ethanolic Bulb Extract of *Allium ascalonicum* Through Alteration in Production of Inducible Nitric Oxide Synthase and Pro-inflammatory Cytokines

Nuttiya Werawattanachai^a, Rawiwun Kaewamatawong^a,
 Jintana Junlatat^b, and Bung-orn Sripanidkulchai^b

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,
 85 Sathonlamark Rd., Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190 Thailand
^bFaculty of Pharmaceutical Sciences and Center for Research and Development
 of Herbal Health Products, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

*Corresponding Author's E-mail: phnuttwe@mail2.ubu.ac.th

Abstract

Allium ascalonicum L. is used as a spice and has been used in traditional folk medicines. The anti-inflammatory effect of the ethanolic extract obtained from the bulbs of *Allium ascalonicum* L. (AAE) was evaluated *in vitro*. The effects of AAE on lipopolysaccharide (LPS) induced expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in the murine macrophage cell line, RAW264.7 cells, were examined. The gene expressions were tested using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results indicated that the expressions of iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 at the mRNA level were inhibited by AAE in a concentration-dependent manner. AAE suppressed production of mRNA for COX-1, while did not significantly affect COX-2. AAE performed anti-inflammatory action via mixed inhibitory actions against iNOS and pro-inflammatory cytokines. Total phenolic content analysis was performed by Folin-Ciocalteu reaction. The total phenolic compound of AAE was 15.964 ± 0.122 mg gallic acid equivalent. g⁻¹ plant extract. Total flavonoid content was determined by aluminium chloride colorimetric method. Total flavonoid content of AAE was 11.742 ± 0.012 mg quercetin equivalent. g⁻¹ plant extract. The present study revealed that ethanolic extract of *Allium ascalonicum* contained constituents such as total phenol and total flavonoid contents and exhibited anti-inflammatory activity in the murine macrophage cell line, supporting that it could be further developed to be an alternative anti-inflammatory agent.

Keywords: *Allium ascalonicum*; anti-inflammatory; iNOS; COX-2; pro-inflammatory cytokines



Anti-Inflammatory Potential of Ethanolic Bulb Extract of *Allium ascalonicum* Through Alteration in Production of Inducible Nitric Oxide Synthase and Pro-inflammatory Cytokines

Nuttiya Werawattanachai^a, Raviwun Kaewamatawong^a, Jintana Junlatat^b, and Bung-orn Sripanidkulchai^b

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190 Thailand

^bFaculty of Pharmaceutical Sciences and Center for Research and Development of Herbal Health Products, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

*Corresponding Author's E-mail: phnuttw@mail2.ubu.ac.th

Introduction

Inflammation is a normal protective response to tissue injury caused by any noxious stimulus to destroy the invading organisms. Macrophages are the main pro-inflammatory cells responsible for invading pathogens by releasing inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS), prostaglandins (PG) by cyclooxygenase-2 (COX-2), and pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6. Recent evidence has indicated that cytokines are involved in the pathophysiology of many inflammatory diseases, including sepsis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and asthma. Various compounds of plants show anti-inflammatory activity by inhibiting inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenases or modulating the expressions level of inflammation-associated genes (Calixto et al., 2004). *Allium ascalonicum* is an important part of the diet of many populations and widely beneficial to health. To date, there has been report about the anti-inflammatory activity of *Allium ascalonicum*. However, there is scant work regarding the detailed mechanisms associated with anti-inflammatory action of *Allium ascalonicum*. Thus, in the present study we determined the effects of the ethanolic extract of *Allium ascalonicum* (AAE) on the expressions of inflammation-associated genes in RAW264.7 macrophage cell line stimulated with lipopolysaccharide.

Methods

Preparation of the plant extract:

The bulbs of *Allium ascalonicum* growing in Sri Saket Province, Thailand were used as plant materials. They were cut into small pieces and macerated in ethanol for 3 days and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure until dry and then was lyophilized.

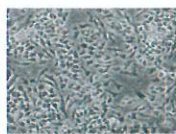


Murine macrophage cell culture:

RAW264.7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin and incubated at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air.

Cell viability assay:

RAW264.7 cells (1x10⁴ cells/well) were treated with various concentrations of extract and incubated at 37°C for 24 h. Cell viability was assessed by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The absorbance in each well was measured by using microplate reader at a wavelength of 570 nm. The results were calculated for % inhibition.



Detection of mRNA expressions of iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis: RAW264.7 cells (1x10⁴ cells/well) were overnight cultured and treated with various concentrations of extract. After incubation for 22 h, the LPS was added to a final concentration of 10 μ g/ml and then further incubated for 2 h. Total RNA was purified from the cells using the RNA extraction kit according to the manufacturer's directions. The cDNA was synthesized from total RNA (40 ng) with Omniscript reverse transcriptase kit. Amplification was completed for 27 cycles by using a PCR thermal cycler (GeneAmp® PCR system 2400, Perkin-Elmer, USA) and the cycle conditions for PCR amplification were followed previous reports (Sugawara et al., 2003; Won et al., 2006). The RT-PCR products were separated with 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with Novex Juice and visualized under UV light. The density of target bands including iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 were measured by gel documentation and system analysis device (InGenius[®], Bio-Rad, USA). Results were expressed as the relative mRNA expression values which were normalized with mRNA expression of β -actin.

Determination of total phenolic and total flavonoid contents:

Total phenolic content was determined by using Folin Ciocalteu method with gallic acid as standard whereas total flavonoid content was determined by using aluminium chloride colorimetric method with quercetin as standard.

Statistical analysis:

Data are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) (n=3). The statistical significance of the difference between groups was evaluated by one way ANOVA followed by Least Significant Difference (p<0.05).

Results & Discussion

The effect of AAE on RAW264.7 cell viability:

There were no significant inhibitory effects on cell survival with AAE at concentrations ranging from 62.5-250 μ g/ml.

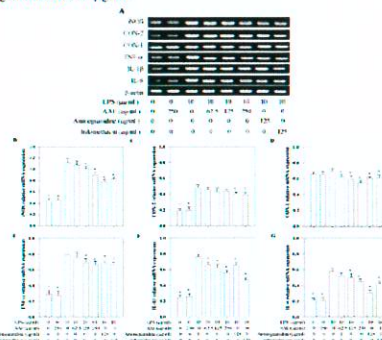


Figure 1. Inhibitory effects of AAE on the expressions of inflammation-associated genes in RAW264.7 cells (A). Amplified bands of iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and β -actin of representative samples (B). (C), (D), (E), (F), and (G) the relative mRNA expressions of iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-6, respectively, which were normalized to β -actin.

*Significantly different from the LPS treatment alone at p<0.05

Influence of AAE on LPS-induced mRNA expressions:

The expressions of inflammation-associated genes, including iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 markedly increased following LPS stimulation (Fig 1A lane 3). Aminoguanidine and indomethacin, positive controls, significantly reduced the LPS-induced mRNA expressions of those inflammation-associated genes. Pretreating cells with AAE significantly decreased mRNA expressions of iNOS, COX-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in a concentration-dependent manner (Fig 1B, 1D, 1E, 1F, 1G, respectively). The expression of COX-2 was not significantly inhibited by AAE (Fig 1C). The prolonged production of inflammatory mediators lead to many pathological states. The iNOS inhibitors have been investigated for the treatment of septic shock, arthritis, atherosclerosis, asthma, inflammatory diseases and carcinogenesis. TNF- α , IL-1 β , and IL-6 are primary cytokines involved in the progression of chronic joint inflammation and the concomitant erosive changes in cartilage and bone. Inhibition of COX-2 inhibits inflammation, while inhibition of COX-1 reduces basal production of cytoprotective prostaglandins and causes ulceration or renal dysfunction (Calixto et al., 2004; Won et al., 2006). AAE could be possible candidate to be considered in the treatment of various inflammatory diseases since it reduced the productions of iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6. However, the anti-inflammatory activity of AAE might not directly through inhibiting COX-2 activity and it is possible that AAE could provoke some unwanted adverse effects such as gastric ulcer by inhibiting COX-1 activity.

Total phenolic and total flavonoid contents: The total phenolic compound of AAE was 15.964 $\pm$ 0.122 mg gallic acid equivalent, g⁻¹ plant extract and the total flavonoid content of AAE was 11.742 $\pm$ 0.012 mg quercetin equivalent, g⁻¹ plant extract. Phenolic and flavonoid compounds have been used as nutritional supplements for anti-inflammatory activity. The inhibitory effect against iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 gene expression of AAE may be related to these compounds.

Conclusion

In conclusion, the ethanolic extract of *Allium ascalonicum* contained total phenolic and total flavonoid compounds and exhibited inhibitory effect against iNOS, and pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 gene expressions, in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. Thus, *Allium ascalonicum* could provide a beneficial effect for inflammatory-mediated diseases.

Selected References

- Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., and Santos, A.R. (2004). "Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules". *Planta medica*, Vol. 70, pp. 93-103.
- Sugawara, I., Yamada, H., and Mizuno, S. (2003). "Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis". *Journal of medical microbiology*, Vol. 52, pp. 29-34.
- Won, J.H., Im, H.T., Kim, Y.H., Yun, K.J., Park, H.J., Choi, J.W., Lee, K.T. (2006). "Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation". *British journal of pharmacology*, Vol. 148, pp. 216-225.

Acknowledgement

This study was financially supported by National Research Council of Thailand. The authors wish to thank Professor Koichi Ueno and Assistant Professor Hiromi Sato, Chiba University, Japan, for technical assistance in the preliminary study.

Manuscript for publication
entitled “Anti-inflammatory activities of shallot and garlic extracts on
lipopolysaccharide-activated murine macrophage cell line”

Anti-inflammatory activities of shallot and garlic extracts on lipopolysaccharide-activated murine macrophage cell line

Nuttiya Werawattanachai^a, Rawiwun Kaewamatawong^a, Timothy J Maher^b, Hiromi Sato^c, Koichi Ueno^c, Jintana Junlatat^d, Bung-orn Sripanidkulchai^d

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190 Thailand

^b Department of Pharmaceutical Sciences, Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, 179 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 USA

^c Department of Geriatric Pharmacology and Therapeutics, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba, 260-8675, JAPAN

^d Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center for Research and Development of Herbal Health Products, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

* Corresponding author, e-mail: phnuttwe@mail2.ubu.ac.th

ABSTRACT: The anti-inflammatory effects of the ethanolic extracts obtained from the bulbs of shallot (*Allium ascalonicum* L.) and garlic (*Allium sativa* L.) were evaluated *in vitro*. The effects of shallot and garlic extract on lipopolysaccharide (LPS) induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in the murine macrophage cell line RAW 264.7 were examined. The gene expressions were tested using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results indicated that the expression of iNOS, TNF- α , IL-1 β and IL-6 at the mRNA level were inhibited by both shallot and garlic extracts in a concentration-dependent manner (125 and 250 μ g/ml). The garlic extract caused reduction in LPS-induced COX-2 and COX-1 mRNA expression. The shallot extract at concentration of 62.5, 125 and 250 μ g/ml suppressed production of mRNA for COX-1, while did not significantly affect COX-2. These results suggest that the anti-inflammatory properties of shallot and garlic extracts may be due to the inhibitory effects on iNOS, cyclooxygenase enzymes and pro-inflammatory cytokines. This study supports the traditional use of shallot and garlic for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory disorder.

KEYWORDS: *Allium ascalonicum*, *Allium sativum*, pro-inflammatory cytokines, iNOS, COX-2

INTRODUCTION

Inflammation is a normal protective response to tissue injury caused by any noxious stimulus to destroy the invading organisms, remove irritants and set the stage for tissue repair. It is triggered by the release of different cellular and humoral mediators from the injured tissues and migrating cells. Macrophages are the main pro-inflammatory cells responsible for invading pathogens by releasing inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) produced

by inducible NO synthase (iNOS), prostaglandins (PG) by cyclooxygenase-2 (COX-2; prostaglandin H₂ synthase), and pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6. Recent evidence has indicated that cytokines are involved in the pathophysiology of many inflammatory diseases, including sepsis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and asthma. These pathological states appear to be an imbalance of the cytokine network and to be excessive recruitment of leukocytes to the inflammatory sites as well as uncontrolled and prolonged inflammatory reactions. Various compounds of plant origins show anti-inflammatory activity by inhibition of nitric oxide synthase, cyclooxygenases or modulating the expression level of inflammation-associated genes¹.

Shallot (*Allium ascalonicum*) and garlic (*Allium sativa*) belong to the family Alliaceae. Both shallot and garlic are an important part of the diet of many populations and are widely beneficial to health. To date, there are reports about the pharmacological properties of shallot and garlic. The biological activities of shallot are anti-fungal^{2,3}, antibacterial⁴, anti-oxidant⁵, hypoglycemic effect in rats with fructose-induced insulin resistance⁶, protective potential against cyclosporin-induced nephrotoxicity⁷, anti-angiogenic⁸, anticancer and anti-inflammatory activities⁹. Garlic has been shown to exert anti-lipidemic, anti-hypertensive, anti-platelet aggregation, anti-coagulant, fibrinolytic¹⁰, antibacterial¹¹, anti-oxidant^{5,12}, hypoglycemic¹³, anticancer^{14,15}, and anti-inflammatory effects^{16,17}.

A number of chemical constituents such as saponins, sapogenins, sulphur containing compounds, flavonoids and poly-phenolic derivatives have been identified in shallot and garlic¹⁸. In folk remedies, shallot has been used in the treatment of several ailments including, jaundice, gonorrhea, cholera, atherosclerosis, essential hypertension, chest pain, asthma, and for wound healing¹⁹. The traditional uses of garlic include tuberculosis, bronchitis, sinusitis, paralysis, loss of memory, ulcer, fever, colic pains, atherosclerosis, diabetes, rheumatism, and inflammation²⁰.

Shallot and garlic were reported to exert anti-inflammatory activities *in vitro*²¹⁻²⁴. The *in vivo* anti-inflammatory activity of shallot has also been conducted. Animal studies demonstrated that shallot extract significantly exhibited dose-dependent inhibition of albumin-induced paw edema in rats (at 3 hours post treatment) and significantly reduced both the early and the late phases of formalin-induced paw licking in rats¹⁹. The aqueous extract of shallot also demonstrated a significant anti-inflammatory activity in acetic acid-induced vascular permeability assay *in vivo*⁹. However, there is scant work regarding the detailed mechanisms associated with anti-inflammatory actions of shallot and garlic extracts. It is likely that shallot and garlic alleviate the inflammatory pain by inhibiting the iNOS, COX enzymes and/or the expression of pro-inflammatory cytokines.

Thus, in the present study we examined whether the ethanolic extracts of shallot and garlic affect iNOS, COX-2, COX-1 and the expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 267.4 cells.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials: The plant materials were purchased from local market in Sri Saket Province, Thailand, and were identified by Dr. Rawiwun Kaewammatawong, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

Extraction: The plant materials were cut into small pieces and were macerated in ethanol for 3 days and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure until dryness and then were lyophilized.

Drugs and chemicals:

The chemicals and reagents used in this study included: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen, UK), fetal bovine serum (FBS)(Invitrogen, UK), 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetra-zolium bromide (Invitrogen, USA), *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), RNA extraction kit (GE Healthcare, UK), molecular biology agarose (Bio-Rad, Spain), 1kb DNA ladder (Promega, U.S.A.), Blue/Orange 6X loading dye (Promega, U.S.A.), primer iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, COX-1, β -actin (Eurofins MWG Operon, Germany), tris base, glacial acetic acid, EDTA (Ajax/Australia), RNA extraction kit (GE Healthcare, UK), RNase free DNase Set (QIAGEN, Germany), Omiscript reverse transcriptase kit (QIAGEN, Germany), TopTaq MasterMix kit (QIAGEN, Germany), Novel Juice (GeneDirex), PCR Thermal Cycler (AB Applied Biosystems Gene Amp® PCR system 2400, Perkin-Elmer, Roche, NJ, USA), Gel Documentation Analysis system (InGenius® L, Bio-Rod Lab, Hercules, CA, USA).

Macrophage cell culture:

The murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells, was purchased from PromoCell, Germany. The cells were cultured in DMEM medium, containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin and incubated at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ /95% air.

Cell viability assay:

The viability of cells was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in which MTT is reduced to formazan in viable cells²⁵. In brief, RAW 264.7 cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 10⁴ cells per well and incubated at 37°C for 24 h. The cells were then treated with the indicated concentrations of extract (0.0625-0.25 mg/ml). After 24 h incubation, 100 μ l of the 0.25 mg/ml MTT solution was added to the wells. Cultures were incubated in a 5% CO₂ incubator at 37 °C for 1 h and the culture medium in each well was aspirated off without disturbing the formazan precipitate. Then 200 μ l of DMSO was added to each well to solubilize the formazan crystals. The absorbance in each well was measured using microplate reader at a wavelength of 570 nm. The cellular reduction of MTT which represents metabolic activity and viability was expressed as the percentage of inhibition.

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{570_{\text{control}}} - A_{570_{\text{treated}}}) / A_{570_{\text{control}}}] \times 100$$

Detection of mRNA expression of iNOS, COX-2, COX-1 and pro-inflammatory cytokines by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

RAW 264.7 cells were cultured at a density of 10^6 cells/well in 12-well plate overnight. The cells were pretreated with different concentration of shallot extract (62.5, 125 and 250 $\mu\text{g/ml}$), garlic extract (62.5, 125 and 250 $\mu\text{g/ml}$), and positive control including indomethacin (125 $\mu\text{g/ml}$) and aminoguanidine (125 $\mu\text{g/ml}$). After incubation at 37°C in the humidified atmosphere with 5% CO_2 for 22 h, the *Escherichia coli* LPS was added to a final concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ and then further incubated for 2 h. After washing with PBS twice, total RNA was purified from the cells using the RNA extraction kit according to the manufacturer's directions. RNA purity was confirmed with the spectrophotometric absorbance ratio at 260/280 and RNA quantity was determined by the absorbance at 260 nm. Total RNAs (40 ng) of the cells treated with each compound were converted into cDNA using Omniscript reverse transcriptase kit. RT-generated cDNAs encoding iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and β -actin were amplified by PCR using specific primers (Table 1). PCR was performed by incubating each cDNA sample with 3 μl of the primers and Taq polymerase. Amplification was completed for 27 cycles by using a PCR Thermal Cycler and the cycle conditions for amplification are as shown in Table 2.

The RT-PCR products were separated with 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with Novel Juice and visualized under UV light. The density of target bands were measured by Gel Documentation and System Analysis device. Results are expressed as relative ratios of band intensity between the mRNA of the individual inflammatory-related gene expression and β -actin mRNA.

Table 1: Nucleotide sequences of the primers and expected sizes of PCR products used in RT-PCR analysis.

Genes	Primer	Sequences	Expected sizes (bp)	References
iNOS	Forward Reverse	AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT GCTGTGTGTACAGAAAGTCTCGAACTC	454	Ref. 26
COX-2	Forward Reverse	GGAGAGACTATCAAGATAGT ATGGTCAGTAGACTTTTACA	861	Ref. 26
COX-1	Forward Reverse	AGTGCGGTCCAACCTTATCC CCGCAGGTGATACTGTCGTT	382	Ref. 26
TNF- α	Forward Reverse	ATGAGCACAGAAAGCATGATC TACAGGCTTGTCACCTCGAATT	276	Ref. 26
IL-1 β	Forward Reverse	CAGGATGAGGACATGAGCACC CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC	447	Ref. 27
IL-6	Forward Reverse	CATCCAGTTGCCTTCTTGGA GCATTGGAAATTGGGGTAGGAAG	463	Ref. 27
β -actin	Forward Reverse	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG	285	Ref. 26

154 **Table 2:** Cycle conditions for amplification of cDNA used in RT-PCR analysis

Genes	Denaturation / RT Inactivation	For Cycles			Final Extension	Hold
		Denaturation	Annealing	Extension		
iNOS	95°C, 2 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1.5 min	72°C, 10 min	4°C
COX-2	95°C, 2 min	94°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min		
COX-1	95°C, 2 min	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1 min		
TNF- α	94°C, 2 min	94°C, 15 sec	60°C, 1 min	72°C, 1 min		
IL-1 β	94°C, 2 min	94 °C, 45 sec	60°C, 45 sec	72°C, 1 min		
IL-6	94°C, 2 min	94 °C, 15 sec	60°C, 1 min	72°C, 1 min		
β -actin	95°C, 2 min	94 °C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min		

155 **Statistical analysis**

156 All data are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SE) obtained from three independent
 157 experiments. Statistical analysis was performed on SPSS software. One way ANOVA
 158 followed by Least Significant Difference (LSD) *post hoc* testing was used to determine the
 159 statistical significance. *P*-value < 0.05 was considered as statistically significance.
 160
 161

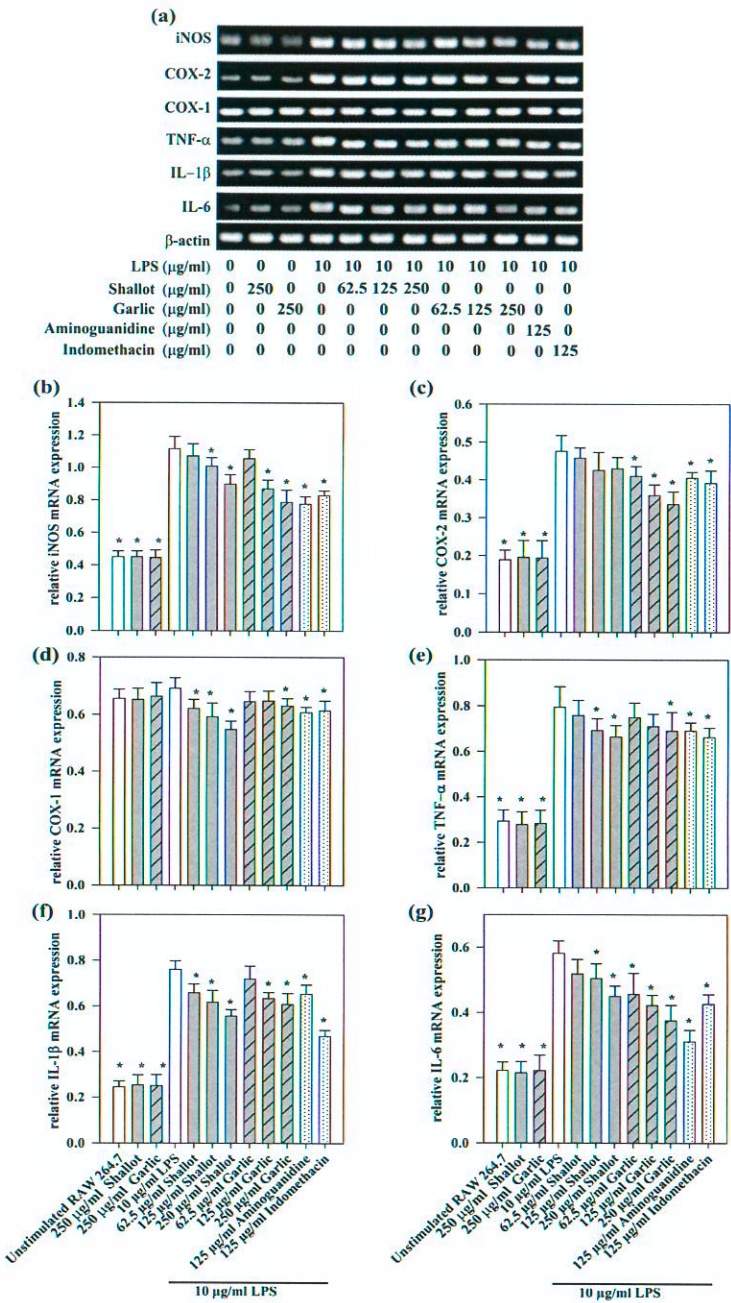


Fig. 1: Inhibitory effects of shallot and garlic extracts on mRNA expression of iNOS, COX-2, COX-1, TNF-α, IL-1 β , and IL-6 (Fig. 1(a)). The relative mRNA expression of iNOS (Fig. 1(b)), COX-2 (Fig. 1(c)), COX-1 (Fig. 1(d)), TNF-α (Fig. 1(e)), IL-1β (Fig. 1(f)), and IL-6 (Fig. 1(g)) compared with β-actin mRNA expression. Data are expressed as mean ± SE from three independent experiments. **P* value < 0.05 indicates significant difference from the LPS treatment alone.

RESULTS

1. Effects of shallot and garlic extracts on cell viability

RAW 264.7 macrophage cell viability in the presence of shallot and garlic extracts were assessed using a MTT assay. The cell survival values are expressed as a percentage of the control treated cells. After 24 h incubation, no significant inhibitory effects on cell survival were observed with shallot or garlic extract at the concentration between 62.5-250 µg/ml. However, higher doses of shallot and garlic extracts decreased cell survival. Shallot extract and garlic extract at a concentration of 500 µg/ml significantly decreased cell viability to 86% and 60%, respectively ($P < 0.05$). Therefore, cells were treated with the concentration of shallot or garlic extracts ranging from 62.5 to 250 µg/ml in the subsequent experiments.

2. Effects of shallot and garlic extracts on LPS-activated RAW 264.7 cells

Stimulation of RAW 264.7 with LPS (10 µg/ml) induced a significant increase in the mRNA expression of iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 compared to control cells without LPS (Fig. 1(a)). Expression of β -actin, the internal control, was not significantly affected by treatment with LPS, the shallot extract or garlic extract (Fig. 1(a)). To investigate the inhibitory activity on pro-inflammatory cytokine expression, the LPS only treated group was used as a control group. Indomethacin 125 µg/kg and aminoguanidine 125 µg/kg, positive controls, inhibited iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA expressions. Shallot extract at concentrations of 125 and 250 µg/ml significantly inhibited mRNA expression of iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in a concentration-dependent manner (Figs. 1(b), 1(e), 1(f), 1(g), respectively). The expression of COX-2 was not significantly inhibited by shallot extract (Fig. 1(c), but this extract inhibited COX-1 expression in a concentration-dependent manner (62.5, 125, and 250 µg/ml) (Fig. 1(d)).

Garlic extract at concentrations of 125 and 250 µg/ml significantly decreased iNOS, COX-2, IL-1 β , and IL-6 mRNA levels in a dose-dependent manner (Figs. 1(b), 1(c), 1(f), 1(g), respectively). The expression of COX-1 and TNF- α were also significantly inhibited by garlic extract at a concentration of 250 µg/ml (Figs. 1(d), 1(e), respectively).

DISCUSSION

The anti-inflammatory activity of the shallot and garlic ethanolic extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 cells were evaluated. The nontoxic concentrations (62.5, 125, and 250 µg/ml) of shallot and garlic extracts were used for all experiments. Our data demonstrated the inhibitory effects of shallot and garlic extracts (125, 250 µg/ml) on iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. There have been reports that diallyl sulfide, diallyl trisulfide, s-allyl cysteine, and allicin from garlic could inhibit nitric oxide (NO) production through the suppression of iNOS mRNA and protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells^{23, 28-30}. iNOS, mainly responsible for the production of large amounts of NO, can elicit cellular toxicity and tissue damage which contribute to the pathophysiology of a number of disease states. The iNOS inhibitors have been investigated for the treatment of iNOS-mediated diseases and conditions including septic shock, arthritis, atherosclerosis, asthma, inflammatory diseases and carcinogenesis³¹. Based on these findings, shallot and garlic could be possible

candidates to be considered in the treatment of various inflammatory diseases by inhibiting iNOS.

Cyclooxygenase, which converts arachidonic acid to prostaglandins and other eicosanoids, exists in two isoforms, COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed in many tissues and mainly involved in housekeeping functions such as maintaining gastric mucosal integrity, initiating platelet aggregation, regulating renal blood flow and glomerular filtration. COX-2 is an inducible enzyme primarily expressed by cells that mediate inflammation such as macrophages, monocytes and neutrophils. Inhibition of COX-1 reduces basal production of cytoprotective prostaglandins and causes ulceration, while inhibition of COX-2 inhibits inflammation³². All the classic non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit both COX-1 and COX-2 at standard anti-inflammatory doses. The beneficial anti-inflammatory and analgesic effects are based on the inhibition of COX-2. Inhibition of COX-1, linked to the gastrointestinal adverse effects of NSAIDs in the upper gastrointestinal tract include esophagitis, peptic ulcer and its complications, and an increased morbidity and mortality³³. In this study, shallot extract did not significantly inhibit COX-2 mRNA expression while garlic extract did in a concentration-dependent fashion. These results suggest that the anti-inflammatory activities of shallot extract might not directly through inhibiting COX-2 activities. The expression of COX-2 is stimulated by growth factors, pro-inflammatory cytokines, tumor promoters, and carcinogens, implying a role for COX-2 in both inflammation and control of cell growth. In addition, PGE₂ is a major COX product at inflammatory sites where it contributes to an increase in local blood flow, edema, and pain sensitization. Thus, the compounds that inhibit the expression of COX-2 might be an important target for anti-inflammation or cancer chemoprevention¹⁶. In the presence of garlic extract, COX-2 mRNA levels declined in a dose-dependent manner. As observed in the present studies, the anti-inflammatory action of garlic extract may involved the inhibitory effect on the synthesis of COX-2 enzyme at the transcription level. The modulatory influence of garlic and the isolated sulfur compounds such as diallyl sulfides, ajoene, thiocresmonone on COX-2 activity in cancer cells has been reported³⁴⁻³⁸.

In LPS-treated RAW 264.7 cells, shallot extract (62.5, 125, and 250 µg/ml) significantly inhibited COX-1 expression in a concentration-dependent manner, while garlic extract significantly inhibited LPS-induced COX-1 expression at 250 µg/ml, the highest concentration employed in this study. Aspirin and the currently available non-aspirin NSAIDs are nonselective-cyclooxygenase inhibitors, with varying relative potencies which explains their anti-inflammatory effects as well as their most common side effects, including gastrointestinal toxicity, renal dysfunction, and enhanced bleeding tendency³⁹. From the roles of COX-1 and COX-2, it is possible that shallot and garlic extracts at the doses that exhibit anti-inflammatory actions, might concurrently inhibit COX-1 functions and provoke some unwanted adverse effects.

Cytokines, regulatory polypeptides that are produced by virtually all cells, are not constitutively produced. However, in the presence of appropriate stimuli, for example LPS from gram negative bacteria, increased gene expression and production of the cytokines will occur, leading to the initiation of an inflammatory response. The major cytokine involved in the initiation of inflammation are TNF-α. This cytokine mediates early-stage responses of

inflammation by regulating production of other cytokines, including IL-1 β , and IL-6. It is believed that TNF- α , IL-1 β , and IL-6 are primary cytokines involved in the progression of chronic joint inflammation and the concomitant erosive changes in cartilage and bone⁴⁰. In LPS-stimulated RAW 264.7 cells, the shallot extract effectively down-regulated the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in a concentration-dependent manner, while the garlic extract suppressed TNF- α expression at a concentration of 250 μ g/ml. The inhibitory effects on TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA by the shallot and garlic extracts suggest that shallot and garlic extracts should be investigated for their potential beneficial role in treating various inflammatory diseases.

Phytochemical analysis of the polar extracts from bulbs of shallot led to the isolation of two furostanol saponins, ascalonicoside A1/A2 and ascalonicoside B, respectively. Shallot is rich in flavone and polyphenolic derivatives such as isoliquiritigenin, quercetin and their glycosides¹⁸. Phenolic compounds have multiple biological properties and have been used as nutritional supplements for their anti-inflammatory and anti-oxidant properties. The anti-inflammatory effects of shallot extract in our study may be related to these components. However, it is still necessary to conduct detailed phytochemical studies of the ethanolic extracts of shallot and garlic to determine which active compounds might account for these effects. These results suggest that shallot and garlic extract have anti-inflammatory effects, and thus could be used to prevent or treat some inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

In conclusion, our study has demonstrated that the ethanolic extracts of shallot and garlic are able to inhibit mRNA expression of pro-inflammatory cytokines including iNOS, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The garlic extract also caused a reduction in LPS-induced COX-2 mRNA expression while the shallot extract was without effect on COX-2. Thus, the extracts of shallot and garlic may provide a beneficial effect for inflammatory-mediated diseases. In our study, the shallot extract at the lowest concentration also suppressed production of COX-1 mRNA expression which may be cause for concern regarding gastrointestinal bleeding, renal dysfunction and increase bleeding tendency. Further investigations are required to determine the active compounds responsible for the potent anti-inflammatory activity of the ethanolic extracts of shallot and garlic.

Acknowledgements: This study was financially supported by National Research Council of Thailand (NRCT) and National Research Council of Thailand-Japan Society for the Promotion of Science (NRCT-JSPS) Joint Research Program.

REFERENCES

1. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR (2004) Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* **70**, 93-103.
2. Yin MC, Tsao SM (1999) Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *Int J Food Microbiol* **49**, 49-56.

3. Wang HX, Ng TB (2002) Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs. *Peptides* **23**, 1025-1029.
4. Amin M, Kapadnis BP (2005) Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi. *Indian J Exp Biol* **43**, 751-754.
5. Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki JM (2006) Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition* **22**, 266-274.
6. Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB (2007) Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr* **41**, 218-223.
7. Wongmekiat O, Leelarugrayub N, Thamprasert K (2008) Beneficial effect of shallot (*Allium ascalonicum* L.) extract on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* **46**, 1844-1850.
8. Seyfi P, Mostafaie A, Mansouri K, Arshadi D, Mohammadi-Motlagh HR, Kiani A (2010) In vitro and in vivo anti-angiogenesis effect of shallot (*Allium ascalonicum*): a heat-stable and flavonoid-rich fraction of shallot extract potently inhibits angiogenesis. *Toxicol In Vitro* **24**, 1655-1661.
9. Mohammadi-Motlagh HR, Mostafaie A, Mansouri K (2011) Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Arch Med Sci* **7**, 38-44.
10. Kendler BS (1987) Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med* **16**, 670-685.
11. Lee YL, Cesario T, Wang Y, Shanbrom E, Thrupp L (2003) Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition* **19**, 994-996.
12. Shobana S, Naidu KA (2000) Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **62**, 107-110.
13. Eidi A, Eidi M, Esmacili E (2006) Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* **13**, 624-629.
14. Thomson M, Ali M (2003) Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug Targets* **3**, 67-81.
15. Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K (2011) Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem* **11**, 249-253.
16. Dirsch VM, Vollmar AM (2001) Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochem Pharmacol* **61**, 587-593.
17. Park HJ, Jeon BT, Kim HC, Roh GS, Shin JH, Sung NJ, Han J, Kang D (2012) Aged red garlic extract reduces lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and acute pulmonary inflammation through haeme oxygenase-1 induction. *Acta Physiol (Oxf)* **205**, 61-70.
18. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O (2002) Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *J Agric Food Chem* **50**, 5686-5690.
19. Owoyele BV, Abioye AIR, Afinowi NO, Jimoh SA, Soladoye AO (2006) Analgesic and anti-inflammatory effects of *Allium ascalonicum*. *Trop J Health Sci* **13**, 28-32.

20. Kunnumakkara AB, et al (2009) Traditional uses of spices: an overview. In: Aggarwal BB and Kunnumakkara AB (ed) *Molecular targets and therapeutic uses of spices-modern uses of ancient medicine*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, pp 1-24.
21. Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Vollmar AM (2003) Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr* **133**, 2171-2175.
22. Lee EN, et al (2011) Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF-alpha-induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF-kappaB activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res* **25**, 92-100.
23. Shin JH, Ryu JH, Kang MJ, Hwang CR, Han J, Kang D (2013) Short-term heating reduces the anti-inflammatory effects of fresh raw garlic extracts on the LPS-induced production of NO and pro-inflammatory cytokines by downregulating allicin activity in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* **58**, 545-551.
24. Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Srichairatanakool S, Channarat , Gebicki JM (2004) Anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects of Thai shallot (*Allium ascalonicum* L.) extracts in human monocytic (U937) cells. *Niigata J Health Welfare* **4**, 11-21.
25. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
26. Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT (2006) Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *Br J Pharmacol* **148**, 216-225.
27. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S (2003) Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J Med Microbiol* **52**, 29-34.
28. Chang HP, Huang SY, Chen YH (2005) Modulation of cytokine secretion by garlic oil derivatives is associated with suppressed nitric oxide production in stimulated acrophages. *J Agric Food Chem* **53**, 2530-2534.
29. Liu KL, Chen HW, Wang RY, Lei YP, Sheen LY, Lii CK (2006) DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* **54**, 3472-3478.
30. Kim KM, et al (2001) Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med* **30**, 747-756.
31. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* **6**, 347-373.
32. de Leval X, Delarge J, Somers F, de Tullio P, Henrotin Y, Pirotte B, Dogne JM (2000) Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Curr Med Chem* **7**, 1041-1062.
33. Lanas A, Sopena F (2009) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications. *Gastroenterol Clin North Am* **38**, 333-352.

34. Sengupta A, Ghosh S, Das S (2004) Modulatory influence of garlic and tomato on cyclooxygenase-2 activity, cell proliferation and apoptosis during azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Lett* **208**, 127-136.
35. Elango EM, Asita H, Nidhi G, Seema P, Banerji A, Kuriakose MA (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 by diallyl sulfides (DAS) in HEK 293T cells. *J Appl Genet* **45**, 469-471.
36. Ban JO, et al (2007) Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-kappaB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. *J Pharmacol Sci* **104**, 374-383.
37. Raman P, Dewitt DL, Nair MG (2008) Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytother Res* **22**, 204-212.
38. Lee da Y, Li H, Lim HJ, Lee HJ, Jeon R, Ryu JH (2012) Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. *J Med Food* **15**, 992-999.
39. Schafer AI (1999) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on platelets. *Am J Med* **106**, 25S-36S.
40. Zhao R, Zhou H, Su SB (2013) A critical role for interleukin-1beta in the progression of autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* **17**, 658-669.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Inhibitory effects of shallot and garlic extracts on mRNA expression of iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 (Fig. 1(a)). The relative mRNA expression of iNOS (Fig. 1(b)), COX-2 (Fig. 1(c)), COX-1 (Fig. 1(d)), TNF- α (Fig. 1(e)), IL-1 β (Fig. 1(f)), and IL-6 (Fig. 1(g)) compared with β -actin mRNA expression. Data are expressed as mean $\pm$ SE from three independent experiments. **P value* < 0.05 indicates significant difference from the LPS treatment alone.

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ นางสาวนุตติยา นามสกุล วีระวัณชัย
Miss Nuttiya Werawattanachai
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสารและไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ
จังหวัดอุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353600, 353630
โทรสาร 045-288384
E-mail address: phnuttwe@mail2.ubu.ac.th, nuttiya_w@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2550	เอก	วท.ด.	เภสัชศาสตร์ชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2538	โท	ภ.ม.	เภสัชวิทยา	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2535	ตรี	พย.บ.	พยาบาลศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างวุฒิการศึกษา)

ประสาทเภสัชวิทยา (Neuropharmacology)

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ การทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละหัวข้อเสนอ การวิจัย

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

6.2.1 The screening of free radical scavenging, antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of Ubonratchathani medicinal plants

6.2.2 การสกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร flavonoids ในสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี วงศ์ Leguminosae

6.2.3 การจำแนกชนิด การสกัด แยกสารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

6.3.1 Bhatarabenjapol, S., Werawattanachai, N., and Suttipanta, N. (2004) Knowledge of drug utilization of people using services in drug-stores of Ubon Rajathanee province. *Journal of Ubon Rajathanee University*. Vol.1. 47-60.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

6.3.2 Suttipanta, N., Prasitpuripreecha, C., Werawattanachai, N., and Intaranongpai, J. (2004) The uses of Medicinal Plants in Ubon Rajathanee. *Journal of Ubon Rajathanee University*. Vol.2. 117-138.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

6.3.3 Werawattanachai N., Towiwat P., Unchern S., and Maher TJ. Neuropharmacological profile of tetrahydrofuran in mice. *Life Sciences*. 80(18) 2007: 1656-1663.

6.3.4 Werawattanachai, N, Kaewaamatawong, R. 2010. Chemical constituents from *Parinari anamense*. *Biochemical Systematics and Ecology*,

แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

6.3.5 นุตติยา วีระวัณชัย และ ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน (Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory activities of flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*). วารสาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม 2555.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ นางสาวระวีวรรณ นามสกุล แก้วอมตวงศ์
Miss Rawiwun Kaewamatawong
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสารและไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ
จังหวัดอุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353600, 353670
โทรสาร 045-288384
E-mail address: rawiwun@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2546	เอก	วท.ด.	เภสัชเคมีและ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2540	โท	ภ.ม.	เภสัชเวช	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2537	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยรังสิต	ไทย

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

Taxonomy of Thai medicinal plants

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละหัวข้อเสนอการวิจัย

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

6.2.1 The screening of free radical scavenging, antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of Ubonratchathani medicinal plants

6.2.2 การสกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร flavonoids ในสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี วงศ์ Leguminosae

6.2.3 การจำแนกชนิด การสกัด แยกสารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb.

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

6.3.1 Likhitwidayawuid, K., Kaewamatawong, R., Ruangrunsi. 2005. Mono- and biflavonoids from *Ochna integerrima*. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 527-536.

แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

6.3.2 ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์และทรงพร จิงมันคง. 2549. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPHและปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. วารสารวิชาการม.อบ., 8: 76-88.

แหล่งทุน: เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

6.3.3 Kaewamatawong, R., Likhitwidayawuid, K., Ruangrunsi, N. 2007. Chemical constituents of *Polyalthia parviflora*. Journal of Natural Medicines., 61: 349-350.

แหล่งทุน: กระทรวงศึกษาธิการ

6.3.4 Kaewamatawong, R., Kitajima, M., Kogure, N., Takayama, H. 2008. Flavonols from *Bauhinia malabarica*. Journal of Natural Medicines. 62: 364-365.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

6.3.5 Kaewamatawong, R., Boonchoog, P., Theerawatanasuk, N. 2009.

Diarylheptanoids from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry Letters*. 2: 19-21.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

6.3.6 Werawatanachai, N, Kaewaamatawong, R. 2010. Chemical constituents from *Parinari anamense*. *Biochemical Systematics and Ecology*,

แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

6.3.7 นุตติยา วีระวัณชัย และ ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง

ไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน (Free Radical Scavenging and Tyrosinase

Inhibitory activities of flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*). วารสาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม 2555.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน