

242333

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



242333



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

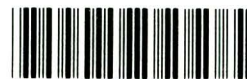
โครงการฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.)
ต่อการสร้างไนตริก ออกไซด์ ในภาวะตับอักเสบ

Effects of *Vernonia cinerea* Less extract on inducible nitric
oxide production in hepatitis

โดย

ผศ.ดร. สกลวรรณ ประพฤติบัติ (หัวหน้าโครงการวิจัย)

มิถุนายน 2554



242333

สัญญาเลขที่ RX-AR-047/2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



โครงการฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.)

ต่อการสร้างไนตริก ออกไซด์ ในภาวะตับอักเสบ

Effects of *Vernonia cinerea* Less extract on inducible nitric
oxide production in hepatitis

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร. สกลวรรณ ประพฤติบัติ

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัยนี้ จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และหน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการไปได้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

โรคตับอักเสบเป็นหนึ่งในสาเหตุลำดับต้นของการเสียชีวิตของคนไทย ส่วนใหญ่เกิดจากการได้รับสารพิษ แอลกอฮอล์ หรือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ พยาธิภาพของโรคตับอักเสบคือเซลล์ตับมีการสร้างสารอนุมูลอิสระจำนวนมาก รวมทั้งการสร้างไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide, NO) ส่งผลให้เซลล์ตับถูกทำลายทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนและตับทำงานล้มเหลว การรักษาภาวะตับอักเสบในปัจจุบันคือการชะลอความรุนแรงของโรค หน่อดอกขาว หรือ *Vernonia cinerea* (VE) Less เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหน่อดอกขาวต่อการสร้าง NO และปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) การทดสอบโดยเซลล์ตับ HepG2 ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ lipopolysaccharide 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, tumor necrosis factor - α 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ interleukin-1 β 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดการสร้าง NO ด้วยสารเรืองแสง diaminofluoresceine -2 diacetate และตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ด้วยวิธี immunoblotting พบว่า สารก่อการอักเสบ 3 ชนิดรวมกัน มีผลเพิ่มการสร้าง NO รวมทั้งเพิ่มปริมาณเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ตับอักเสบ เมื่อทดสอบสารสกัดหน่อดอกขาวที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเซลล์ตับที่ได้รับสารก่อการอักเสบ พบว่า สารสกัดหน่อดอกขาวมีผลลดการสร้าง NO ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีแนวโน้มลดปริมาณเอนไซม์ iNOS จากการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก que แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหน่อดอกขาวมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ตับอักเสบโดยมีผลลดการสร้างอนุมูลอิสระ NO และมีความเป็นไปได้ในการสามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ตับในโรคตับอักเสบ

Abstract

Hepatitis is one of the major causes of morbidity and mortality in Thailand. Mostly it is resulted from prolong exposure to toxic substances, alcohol as well as viral infections. Pathophysiology of continuous inflammatory processes in the hepatic cells generate a large amount of various free radicals including nitric oxide (NO) and that results in hepatic cells damage, tissue complications and finally, hepatic failure. Recently, one effective treatment option for hepatitis is to delay and prevent the progression of inflammatory response. *Vernonia cinerea* (VE) is one local herbal in Thailand that has several reported of an anti-inflammatory property. This study aims to investigate the effect of the VE extract on NO production and expression of an inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme. The human hepatic cell lines, HepG2 were stimulated with a combination of inflammatory mediators: lipopolysaccharide 1 $\mu\text{g/ml}$, tumor necrosis factor- α 400 ng/ml and interleukin-1 β 400 ng/ml for 24 hours. The NO production was measured using a fluorescent dye; diaminofluoresceine -2 diacetate. The protein expression of iNOS enzyme was measured by immunoblotting. The results showed that the combination of the inflammatory mediators increase NO production as well as the expression of iNOS enzyme in the hepatic cells. The effects of VE extracts at 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ concentrations were tested in the HepG2 treated with the inflammatory mediator combination. The extract at 500 $\mu\text{g/ml}$ diminished the increase of NO production significantly and decreased iNOS expression in the hepatitis cells. This study was the first time to demonstrate that the VE extracts possess an anti-inflammatory effect reducing the free radical NO in the human hepatitis cells therefore it is one potential compound to develop as an hepatoprotective agent in hepatitis.

Exclusive Summery

โรคตับเป็นสาเหตุสำคัญลำดับต้นๆของการเสียชีวิตในคนไทย โรคตับอักเสบ (hepatitis) เป็นหนึ่งในโรคที่มีความรุนแรงและมีแนวโน้มของอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย สาเหตุของโรคตับอักเสบมีหลายประการ ที่พบบ่อยในคนไทยเกิดจากการดื่มสุราในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานาน และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ โรคตับอักเสบมีผลทำให้เซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้นเรื่อยๆจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจนกระทั่งการทำงานของตับล้มเหลวและมีผลถึงชีวิตในที่สุด ปัจจุบันในทางคลินิกยังไม่มียาใดที่สามารถรักษาโรคตับอักเสบให้หายขาดได้ การรักษาภาวะตับอักเสบ คือการชะลอความรุนแรงของโรคโดยการป้องกันไม่ให้เซลล์ตับดีที่เหลือยู่เกิดการอักเสบและตายไป จึงมีความพยายามที่จะหาหาสามารถช่วยป้องกันหรือลดการทำลายเซลล์ตับจากภาวะอักเสบ (hepatoprotective agent)

กลไกในการเกิดภาวะเซลล์ตับอักเสบที่สำคัญคือ เซลล์ตับเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระจำนวนมาก โดยเฉพาะก๊าซไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide, NO) ที่เกิดจากการกระตุ้นการสร้างด้วยสารก่อการอักเสบทั้งหลายในกระบวนการอักเสบ NO และอนุพันธ์ต่างๆของ NO มีบทบาทในการทำลายเซลล์ตับ ฉะนั้นการลดการสร้าง NO และเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มมากขึ้นในกระบวนการอักเสบ น่าจะเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ที่จะช่วยลดการทำลายเซลล์ตับดี

หญ้าดอกขาวเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นในแถบเอเชียและประเทศไทย เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนานำไปสู่การใช้ในทางคลินิก ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Vernonia cinerea* Less. หญ้าดอกขาวถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในตำรายาต่างๆในประเทศจีนและอินเดียมาช้านาน จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย อาทิ ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ด้านมาเลเรียและหนองพยาธิ ด้านการอักเสบ ลดไข้ ลดปวด ขับปัสสาวะ และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ในทางคลินิกมีการนำหญ้าดอกขาวในรูปชาขงมาใช้บรรเทาอาการนอนยาในผู้ป่วยติดบุหรี่ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่มุ่งศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดหญ้าดอกขาวมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในภาวะเซลล์ตับอักเสบ โดยศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาวในการลดการสร้างสารอนุมูลอิสระ NO ในภาวะเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ เพื่อให้เกิดความเข้าใจในเชิงลึกและนำไปสู่การพัฒนาการนำสารสกัดหญ้าดอกขาวไปใช้เป็นยาสมุนไพรมาตรฐานในการรักษาภาวะตับอักเสบต่อไป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง NO และเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ตับมนุษย์ HepG2 ในภาวะอักเสบโดยการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ cytokines หลายชนิด จากการศึกษาพบว่าเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ cytokines ร่วมกัน 3 ชนิดคือ lipopolysaccharide, interleukin-1 β และ tumor necrosis factor - α จะเพิ่มการสร้าง NO และเพิ่มปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ iNOS มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ตับกลุ่มไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ และเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยน้ำ (water crude extract) ในขนาดต่างๆ พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีสามารถลดการสร้าง NO และปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ที่เพิ่มมากขึ้นในภาวะอักเสบได้ดี

องค์ความรู้จากการศึกษานี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในระดับสูง การศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่ชัดเจน ความเป็นพิษ รวมทั้งเภสัชจลนพลศาสตร์ของสารสกัดเห็ดดอกขาวในสัตว์ทดลองต่อไป และผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับระดับชาติ ซึ่งจะเป็นหลักฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ และจะช่วยส่งเสริมการพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นเห็ดดอกขาวเพื่อก้าวเป็นสมุนไพรมาตรฐานเพื่อใช้ในภาวะดับอีกเสบ