เนื้อหาการวิจัย

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรของพืชสมุนไพรที่มีความหลากหลายของพันธุ์พืช และได้มีการนำพืชชนิดต่างๆมาใช้ในการบำบัดรักษาอาการและโรคต่างๆตามองค์ความรู้และประสบการณ์ที่สืบทอดกันมายาวนาน การศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในทางการแพทย์ยังมีคงมีอยู่ต่อเนื่อง หญ้าดอกขาวเป็นพืชล้มลุกที่สามารถเจริญเติบโตพบได้ทั่วไปในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชีย มีชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นอื่นๆ อาทิ หญ้าละออง, หญ้าสามวัน, หญ้าหมอน้อย, ก้านธูป และชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Vernonia cinerea* Less. หญ้าดอกขาวถูกนำใช้เป็นส่วนประกอบในตำรายาต่างๆในประเทศจีนและอินเดียมาช้านาน ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย อาทิ ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ต้านมาเลเรียและหนอนพยาธิ ต้านการอักเสบ ลดไข้ ลดปวด และขับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังมีการนำหญ้าดอกขาวมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง รวมทั้งการนำหญ้าดอกขาวมาใช้ในการเลิกบุหรี่ โดยพัฒนาเป็นชาชงเพื่อลดอาการถอนยา (withdrawal syndromes) จากการติดนิโคตินในบุหรี่ หญ้าดอกขาวจึงเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรท้องถิ่นของไทยที่มีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อเป็นยาสมุนไพรมาตราฐาน หรือพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในทางคลินิกในโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา กลไกการออกฤทธิ์และความเป็นพิษของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว

โรคตับเป็นสาเหตุสำคัญลำดับต้นๆของการเสียชีวิตในคนไทย โรคตับอักเสบ(hepatitis) เป็นหนึ่งในโรคที่มีความรุนแรงและมีแนวโน้มของอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นในประชากรไทย สาเหตุของโรคตับอักเสบมีหลายประการ ที่พบบ่อยในคนไทยเกิดจากการดื่มสุราในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานานและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี และการติดเชื้อมาเลเรีย โรคตับอักเสบเกิดจากเซลล์ตับบางส่วนถูกทำลาย เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เกิดกระบวนการอักเสบอย่างต่อเนื่องจากการทำลายเซลล์ตับจากสารพิษ เช่น แอลกอฮอล์หรือการติดเชื้อ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ตับ เกิดเป็นพังผืด (fibrosis) ทำให้ตับไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ และมีผลต่อระบบอื่นๆในร่างกาย ในระยะแรกอาจไม่มีผลต่อการดำเนินชีวิต เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้นเรื่อยๆจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนได้จนกระทั่งการทำงานของตับล้มเหลวและมีผลถึงชีวิตในที่สุด ปัจจุบันการรักษาภาวะตับอักเสบ คือการชะลอความรุนแรงของโรค โดยการป้องกันไม่ให้เซลล์ตับดีที่เหลืออยู่เกิดการอักเสบและตายไป สำหรับการรักษาทางยานั้นยังไม่มียาที่สามารถใช้รักษาภาวะตับอักเสบในทางคลินิก และมีความพยายามที่จะหายาสามารถช่วยป้องกันหรือลดการทำลายเซลล์ตับจากภาวะอักเสบ (hepatoprotective agent) กลไกในการเกิดภาวะเซลล์ตับอักเสบที่สำคัญคือ เซลล์ตับเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระจำนวนมาก โดยเฉพาะกาซไนตริก ออกไซด์ ที่เกิดจากการกระตุ้นการสร้างด้วยสารก่อการอักเสบทั้งหลาย ไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide, NO) และอนุพันธ์ต่างๆของ NO มีความแรงในการทำลายเซลล์ตับ ฉะนั้นการลดการสร้าง NO ที่เกิดขึ้นในกระบวนการอักเสบ น่าจะเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์
ที่จะช่วยลดการทำลายเซลล์ตับดี

หญ้าดอกขาวและสารสกัดจากหญ้าดอกขาว จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนานำไปสู่การใช้ในทางคลินิก

ต่อไป ฉะนั้นการศึกษาด้านกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญและความปลอดภัยทางพิษวิทยาจึงเป็นข้อมูลที่จำเป็นและต้องมีการศึกษาอย่างลึกซึ้ง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่มุ่งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาวในการลดการสร้าง NO ในภาวะเซลล์ตับอักเสบ เพื่อให้เกิดความเข้าใจในเชิงลึกและนำไปสู่การพัฒนาการนำสารกัดหญ้าดอกขาวไปใช้เป็นยารักษาภาวะตับอักเสบต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) ในภาวะตับอักเสบ

1. ศึกษาผลของสารก่อการอักเสบ (inflammatory mediators) ต่อกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ และปริมาณของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเซลล์ตับ human hepatocyte cell line (HepG2)
2. ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้างไนตริก ออกไซด์ และปริมาณของเอมไซม์ nitric oxide synthase ในเซลล์ตับ HepG2 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับเซลล์ (*in vitro*) ซึ่งเป็นการศึกษาแรกที่มีการนำเซลล์ตับกลายพันธุ์ของมนุษย์ (hepatocyte cell line, HepG2) เป็นต้นแบบการศึกษา เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบชนิดต่างๆ ทำให้เกิดภาวะเซลล์ตับอักเสบ โดยวัดการสร้างไนตริก ออกไซด์ และปริมาณของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase และศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less) ในขนาดต่างๆ ต่อการเกิดภาวะตับอักเสบ

การทบทวนวรรณกรรม

ตับ (liver) เป็นอวัยวะที่มีหน้าที่หลากหลาย อาทิ สร้างและขับน้ำดี เผาผลาญและสร้างเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตและไขมัน เฝ้าระวัง สารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย เปลี่ยนแปลงวิตามิน ยาต่างๆ และฮอร์โมน (Thapa and Walia, 2007) ตับจึงเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญมากต่อการทำงานปกติของร่างกาย เมื่อตับได้รับอันตรายโดยเฉพาะกรณีที่ตับได้รับพิษติดต่อกันนานๆ เซลล์ตับเกิดภาวะอักเสบ ต่อเนื่อง เซลล์บางส่วนถูกทำลายกลายเป็นพังผืด (fibrosis) และเกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) เซลล์ตับส่วนนั้นจะไม่สามารถกลับมาทำงานได้สูญเสียการทำงานกระทั่งร่างกายไม่สามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ และสุดท้ายผู้ป่วยจะทำให้เสียชีวิต (Heidelbaugh J, 2006) ตับอักเสบ (hepatitis) เป็นหนึ่งในโรคที่พบบ่อยในประเทศไทยและมีแนวโน้มจะมีอุบัติการณ์เกิดโรคมากขึ้น เกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ การได้รับยาบางชนิดติดต่อกันเป็นเวลานานและตับอักเสบจากการบริโภคแอลกอฮอล์ ผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรังจะมีการพัฒนาของโรคไปสู่ภาวะตับแข็ง (cirrhosis) มะเร็ง (hepatocellular carcinoma) และการเสียชีวิตของผู้ป่วยในที่สุด การรักษาทางคลินิกของผู้ป่วยตับอักเสบในปัจจุบันจะเป็นการรักษาตามอาการและให้การดูแลทางด้านโภชนาการเป็นหลักเท่านั้น การรักษาที่ดีที่สุดคือการผ่าตัดเปลี่ยนตับซึ่งมีข้อจำกัดและราคาแพงมาก (Leoni S, 2006) สำหรับการรักษาภาวะตับอักเสบด้วยยานั้นยังไม่มียาที่ใช้รักษาโรคโดยตรง การนำสารสกัด

สมุนไพรที่คาดว่ามีฤทธิ์ชะลอภาวะอักเสบเรื้อรังได้ดีอาจจะสามารถป้องกันและชะลอการทำลายเซลล์ตับ

ในภาวะที่เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบ เซลล์ที่ถูกทำลายและระบบภูมิคุ้มกันจะมีการหลั่งสารก่อการอักเสบออกมา (inflammatory mediators) ได้แก่ cytokines, interleukins, tumor necrosis factors ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ให้สร้างโปรตีนและโมเลกุลต่างๆที่ทำให้เกิดภาวะอักเสบ อาทิ prostaglandins, substance P, free radicals และ nitric oxide (NO) จากการรายงานการศึกษามากมายแสดงให้เห็นว่า NO เป็นโมเลกุลที่สำคัญมากในระบบการทำงานของร่างกายทั้งสภาวะปกติและในสภาวะที่เกิดพยาธิสภาพ NO เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของระบบหัวใจหลอดเลือด ระบบสืบพันธุ์ ระบบประสาท ระบบภูมิคุ้มกัน และมีบทบาทในกระบวนการเกิดโรคต่างๆ อาทิ ความดันโลหิต การติดเชื้อ ภาวะโรคที่เกิดการอักเสบต่อเนื่อง และการเกิดมะเร็ง (Coleman, 2001; Cirino *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2005; Li and Wogan, 2005) โมเลกุล NO เป็นกาซที่สร้างจากสารตั้งต้น amino acid L-arginine และถูกเปลี่ยนด้วยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) (Simone Mocellin, 2007) ได้เป็นกาซ NO และโมเลกุล L-citrulline ในสภาวะปกติเซลล์ต่างๆสามารถสร้าง NO ในประมาณน้อยๆในระดับ nanomoles ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่ในภาวะที่เกิดการอักเสบ ร่างกายจะมีการสร้าง NO ในปริมาณมากกว่าภาวะปกติหลายเท่าอย่างต่อเนื่องอยู่ในระดับ micromoles และ NO ในปริมาณสูงที่ถูกสร้างขึ้นรวมทั้งอนุพันธ์ของ NO ที่เกิดจากการทำปฏิกริยากับโมเลกุลออกซิเจน (oxygen species เช่น hydroxyl, oxygen peroxide) จะได้เป็นที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) และทำให้เกิดเป็นพิษ อาทิ peroxynitrite สามารถทำลายเซลล์ดีและทำให้เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องทำให้พยาธิสภาพของโรคแย่ลง (Pacher *et al.*, 2007) การสร้าง NO ปริมาณสูงในเซลล์ที่เกิดการอักเสบ สารก่อการอักเสบสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างเอนไซม์ inducible nitric synthase (iNOS) เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์มีปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น จึงเกิดการสร้าง NO เพิ่มขึ้น และส่งผลทำลายเซลล์ดี (Pautz *et al.*, 2010) ในที่สุดทำให้อวัยวะไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ หลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าการลดการสร้าง NO ในภาวะอักเสบโดยควบคุมการสร้าง iNOS มีผลลดภาวะอักเสบได้ดี (Pacher *et al.*, 2007; Simone Mocellin, 2007; Wang *et al.*, 2007)

หญ้าดอกขาว (ชื่ออื่นๆ อาทิ หญ้าละออง, หญ้าสามวัน, หญ้าหมอน้อย, ก้านธูป) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vernonia cinerea* Less. พืชในตระกูล Asteracea มีลักษณะเป็นพืชล้มลุกประเภทหญ้าสามารถเจริญเติบโตได้ทุกพื้นที่ในประเทศไทย เป็นพืชที่มีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรประกอบในตำรายาต่างๆในแถบเอเชีย อินเดีย จีน รวมทั้งในประเทศไทยมานาน พบว่ามีสรรพคุณที่หลากหลายอาทิ ลำต้นมีฤทธิ์แก้ปวดท้อง รักษาแผลสด รักษากลากเกลื่อน รักษาดีซ่าน (Kirtikar K.R., 1975; Mishra T.N., 1984) รายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดจากหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ การศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบหญ้าดอกขาวพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดไข้ และลดปวดในหนูได้ดีใกล้เคียงกับยาต้านการอักเสบแอสไพริน (Gupta *et al.*, 2003a; Iwalewa *et al.*, 2003) ในหนูที่ถูกกระตุ้นเป็นข้ออักเสบรูมาตอยด์ อาทรัยติส (rheumatoid arthritis) เมื่อได้รับสารสกัดจากดอกหญ้าดอกขาวสามารถลดอาการอักเสบ โดยลดอาการข้อบวมและลดระดับเอนไซม์ในพลาสมาที่สูงขึ้นจากภาวะอักเสบได้ดี (Latha *et al.*, 1998) สารสกัดหญ้าดอกขาวยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อมาเลเรีย (Gupta *et al.*, 2003b; Chea *et al.*, 2006) ในปัจจุบันได้มีการนำหญ้าดอกขาวมาทำเป็นชาชงใช้สำหรับเลิกบุหรี่ การศึกษาเบื้องต้นพบว่าหญ้าดอกขาว

สามารถช่วยลดอาการถอนยาจากการติดนิโคตินของผู้ติดบุหรี่ได้ดี โดยสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยน้ำซึ่งเลียนแบบชาชงสามารถลดอาการถอนยาในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้ติดนิโคตินได้ดีและไม่พบความเป็นพิษ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์และสารสำคัญของสารสำคัญในหญ้าดอกขาวยังไม่ชัดเจนและยังคงต้องมีการศึกษาอย่างต่อไป

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อภาวะเซลล์ตับอักเสบ ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้างไนตริก ออกไซด์ และการแสดงออกของเอนไซม์ nitric oxide synthase ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางวิทยาศาสตร์สำหรับการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับลึกต่อไป เพื่อสนับสนุนและส่งเสริมให้มีการนำหญ้าดอกขาว พืชสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ในภาวะตับอักเสบ

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สารสกัดหญ้าดอกขาว

ผงแห้งหญ้าดอกขาว (โรงพยาบาลบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก) มาจากส่วนลำต้นและดอกของหญ้าดอกขาวถูกนำมาทำให้สะอาด อบให้แห้งและย่อยมีขนาดเล็ก ผงแห้งหญ้าดอกขาวนำมาสกัดด้วยน้ำ (water extract) โดยใช้เครื่องสกัดสารแบบซอกเล็ท (Soxhlet extraction) โดยหมักไว้ระยะเวลา 16 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำสองครั้ง เก็บรวบรวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดนำมากรองและทำให้แห้งในภาวะเยือกแข็งแห้ง (freeze dry) สารสกัดแห้ง (crude extract) ที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{o}C เพื่อใช้การทดสอบต่อไป

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับมนุษย์ (human hepatocyte cell lines, HepG2)

เซลล์ตับ HepG2 (American Type Culture Collection, Virginia USA) ถูกเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum (FBS) 10 % และ penicillin – streptomycin 1%ในถาดเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37^{o}C และมีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนเซลล์แบ่งตัวหนาแน่นเต็มที่ หลังจากนี้เซลล์จะถูกเปลี่ยนมาเพาะเลี้ยงในถาดหลุม (24-well หรือ 96-well plates) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การกระตุ้นเซลล์ด้วยสารก่อการอักเสบ /สารสกัดหญ้าดอกขาว

เซลล์ตับ HepG2 เพาะเลี้ยงในถาดหลุม (96-well plate) ที่ความหนาแน่น 3x10^{4} เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่ปราศจาก FBS และเติมสารก่อการอักเสบ lipopolysacccharide (LPS), interleukin-1β (IL-1β), intereron-γ (INF-γ) หรือ tumor necrosis factor-α (TNF-α) ในขนาดต่างๆ (dose dependent response) โดยใช้สารก่อการอักเสบกระตุ้นเดี่ยวหรือใช้ร่วมกันหลายชนิด ในระยะเวลาต่างๆ (time dependent response) ที่ 0, 2, 4, 8, 16, 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นเซลล์ตับเกิดการอักเสบ และเพิ่มการสร้าง nitric oxide และปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide (iNOS)

สารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยน้ำ (water crude extracts) ละลายใน phosphate buffered saline (PBS) ได้สารละลายเข้มข้นเริ่มต้น (1 mg/ml stock solution) เพื่อนำไปเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ให้ได้ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/ml นำไปบ่มร่วมกับเซลล์ตับเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หรือบ่มเซลล์ตับร่วมกับสารสกัดหญ้าดอกขาวเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงก่อนให้สารก่อการอักเสบต่างๆ ต่อในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเซลล์ตับ HepG2 ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการสร้าง nitric oxide และปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide ด้วย diaminofluorescein (DAF)

การวิเคราะห์หาปริมาณNO ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ และการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้าง NO เซลล์ตับเลี้ยงใน 96-well plate เติมด้วยสาร diaminofluorescein 2- diacetate (DAF-2D) ใน PBS ที่ความเข้มข้น 5 uM ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที ในที่มืด สาร DAF-2D จะผ่านเข้าเซลล์ตับและถูกเปลี่ยนด้วยเอนไซม์ esteras ภายในเซลล์ได้สาร diaminofluorescein (DAF) ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับ NO ที่ถูกสร้างขึ้นมาภายในเซลล์และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารเรืองแสงในอัตราส่วน 1:1 และนำมาวัดการเรืองแสง ที่ excitation 485 nm และ emission 535 nm 515 nm ความเข้มของสารเรืองแสงที่เกิดขึ้น (fluorescent units) เทียบกับปริมาณโปรตีน (% mg. protein) เป็นตัวแทนของปริมาณ NO ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์เทียบ

การหาปริมาณโปรตีน

เซลล์ตับถูกล้างและขูดเซลล์ในสารละลาย PBS แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งเติมบัฟเฟอร์สำหรับแยกโปรตีน (0.01M Tris-HCL, 0.05M EDTA, 10% w/v SDS, 10 % w/v DOC, PMSF, 0.5 M sodium pyrophosphate, 0.1 M sodium orthovanadate, 10% v/vTriton x-100, 5M NaCl, 1M NaF, 1% v/v Protease inhibitor cocktail) แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นเสียง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสจะถูกรวบรวมและนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Micro BCA protein assay™, Pierce, Illinois USA) นำสารละลายไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (microplate spectrophotometer) การคำนวณหาปริมาณโปรตีนใช้ standard curve จากโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน

การหาปริมาณเอมไซม์ inducible nitric oxide synthase ด้วย immunblotting

เซลล์ตับ HepG2 เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ (100 mm dish culture) โดยใช้ปริมาณเซลล์ 2 ml ($2x10^6$ cell/ml) เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่ปราศจาก FBS และเติมสารกระตุ้นการอักเสบ LPS 1.0 μg/ml, TNF-a 400 ng/ml, IL-1b 400 ng/ml และสารสกัดหญ้าดอกขาว 125, 250 และ 500 μg/ml บ่มนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรวบรวมเซลล์ตับทั้งหมดนำไปหาปริมาณและแยกโปรตีนต่อไป

การแยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ immunoblotting ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ iNOS โดยนำ samples ในบัฟเฟอร์สำหรับแยกโปรตีนไปผสมกับ elelctrophoresis marker และนำตัวอย่างไปต้มให้เดือดเพื่อสลายโครงสร้างโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างที่พร้อมแล้วไปทำการแยกโปรตีนโมเลกุลด้วย SDS-PAGE และส่งโปรตีนที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลไว้บนแผ่น polyvinylidine fluoride (PVDF) นำแผ่น VPDF ที่ได้ไปแช่ใน สารละลาย 5% nonfat dried milk เพื่อกัน non-specific binding แล้วนำไปทดสอบใน

บัฟเฟอร์ที่มี polyclonal antibody ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ iNOS อัตรส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง แล้วนำ PVDF ไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 10 นาที ล้าง 3 ครั้ง และนำไปแช่ใน secondary goat anti-rabbit antibody จับกับ horseradish peroxiase อัตราส่วน 1: 10,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างอีก 3 ครั้ง แสดงผลระดับโปรตีนด้วยสาร chemiluninescent reagent (ECL blotting reagent, GE Healthcare Bio-Science, Bangkok, Thailand) และบันทึกแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นฟิล์ม การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากแถบที่ปรากฏในแผ่นฟิล์ม โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการคำนวณ Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

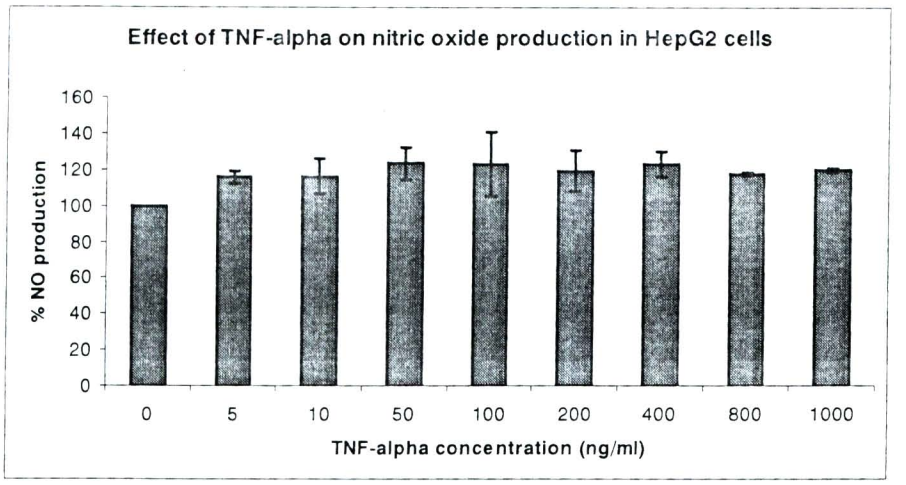
ข้อมูลจาการทดลอง โดยการนำผลการทดลองทุกตัวอย่างทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ได้รับผลจากการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) เปรียบเทียบค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้ student t-test ($P < 0.05$) ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบกลุ่มทดสอบหลายกลุ่มกับกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้ ANOVA

ผลการศึกษาวิจัย

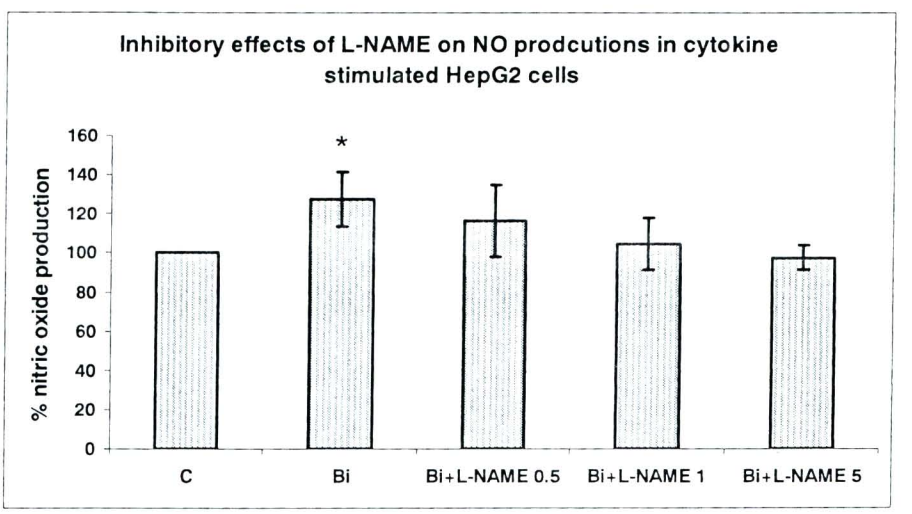
การกระตุ้นเซลล์ตับ HepG2 เพิ่มการสร้าง nitric oxide ด้วยสารก่อการอักเสบ

เซลล์ตับ HepG2 ถูกกระตุ้นดวยสารก่อการอักเสบ lipopolysacccharide (LPS), interleukin-1β (IL-1β), intereron-γ (INF-γ) หรือ tumor necrosis factor-α (TNF-α) ในขนาดต่างๆ เพื่อเพิ่มการสร้าง NO และวัดด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) diaminofluorescein (DAF) จากการทดสอบเบื้องต้น เมื่อกระตุ้น HepG2 ด้วยสารก่อการอักเสบเดี่ยว ทีละชนิด โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือ ณ เวลาต่างๆ 4, 8, 16, 24 และ 32 ชั่วโมง พบว่า สารก่อการอักเสบเพียงชนิดเดียวที่ใช้ทดสอบเพิ่มการสร้าง NO ได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับ HepG2 กลุ่มควบคุม (เซลล์ตับที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ) ดังแสดงตัวอย่างการกระตุ้นเซลล์ตับด้วยสารก่อการอักเสบ TNF-α ชนิดเดียวในขนาดต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1)

เมื่อทดสอบโดยการนำสารก่อการอักเสบตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป (combination of inflammatory mediators) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ตับ HepG2 เกิดภาวะอักเสบและเพิ่มการสร้าง NO พบว่าการใช้สารก่อการอักเสบสามชนิดร่วมกันคือ LPS 1μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml สามารถเพิ่มการสร้าง NO ได้ 24.70 $\pm$ 3.65 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย student t-test พบว่าปริมาณ NO ที่เซลล์ตับในภาวะอักเสบสร้างเพิ่มขึ้นมีนัยสำคัญ ($p < 0.5$) (รูปที่ 2) เทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทดสอบด้วยสาร L-NAME (L-N^G nitroarginine methyl ester) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ได้อย่างเฉพาะเจาะจง พบว่า L-NAME สามารถลดปริมาณการสร้าง NO ในเซลล์ที่ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบร่วมกันได้อย่างชัดเจน การลดลงของปริมาณ NO ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร L-NAME ที่ได้รับ (dose dependent response) โดยสารยับยั้งการทำงานของ NOS ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถลดการสร้าง NO .ให้ลงมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1. การกระตุ้นการสร้าง nitric oxide (NO) ในเซลล์ตับ HepG2 ด้วยสารก่อการอักเสบ tumor necrosis factor -α (TNF-α) ในเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นต่างๆ (0, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 ng/ml) โดยการวัดด้วย diaminofluorescein ผลการศึกษาแสดงร้อยละการสร้าง nitric oxide เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 4 ครั้ง (n=4)



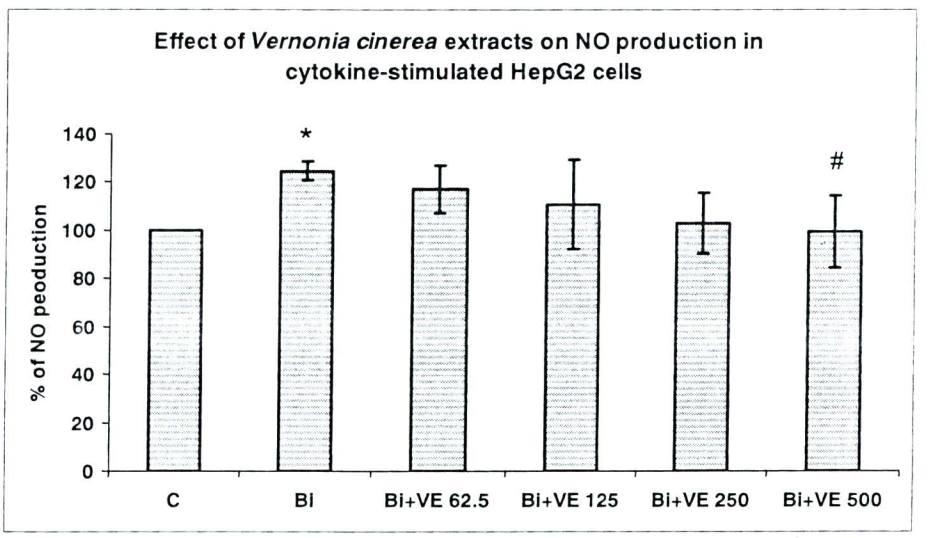
รูปที่ 2. ผลการยับยั้งของ L-N^G nitroarginine metyle ester (L-NAME) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 mM ต่อการสร้าง nitric oxide (NO) ในเซลล์ตับ HepG2 เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ cytokines 3 ชนิด บ่มในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย diaminofluorescein ผลการศึกษาแสดงร้อยละการสร้าง NO เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย student t-test ($p < 0.5$), C : เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi : เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml, L-NAME 0.5, 1, 5 : เซลล์ได้รับ L-NAME ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5 mM

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ตับ HepG2 ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ

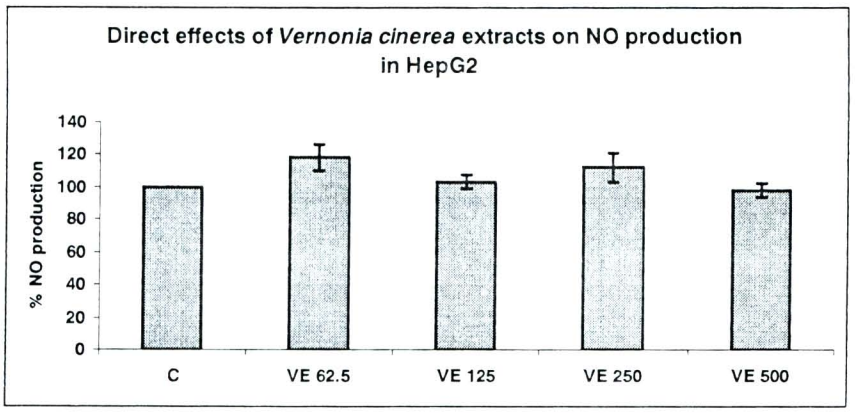
สารสกัดหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less, VE) ด้วยน้ำ ถูกนำมาทำให้แห้งด้วยการทำเยือกแข็ง (freeze dry) นำผงสกัดแห้งมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำมาทดสอบในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ LPS 1μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml ทำให้เซลล์ตับเกิดภาวะอักเสบและเพิ่มการสร้าง NO ใน 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 350, 500 μg/ml พบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้าง NO ในเซลล์ตับถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบได้ ซึ่งมีแนวโน้มการลดการสร้าง NO ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดหญ้าดอกขาว (dose dependent response) ความเข้มข้นของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ 500μg/ml สามารถลดการสร้าง NO ในเซลล์ตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ ดังแสดงรูปที่ 3.

เมื่อทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวโดยตรงต่อเซลล์ตับ HepG2 ที่ไม่รับสารก่อการอักเสบพบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ มีแนวโน้มที่จะเพิ่มการสร้าง NO ได้บ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.)



รูปที่ 3. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาว (VE) ต่อการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ตับ HepG2 ด้วยสารก่อการอักเสบในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย diaminofluorescein, ผลการศึกษาแสดงร้อยละการสร้าง nitric oxide เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 4 ครั้ง (n=4), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ ด้วย student t-test ($p < 0.05$), C : เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi : เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml, VE 62.5, 125, 250. 500 : เซลล์ตับได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 62.5, 125, 250, 500 μg/ml

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ก.ค. 2554
เลขทะเบียน 242333
เลขเรียกหนังสือ

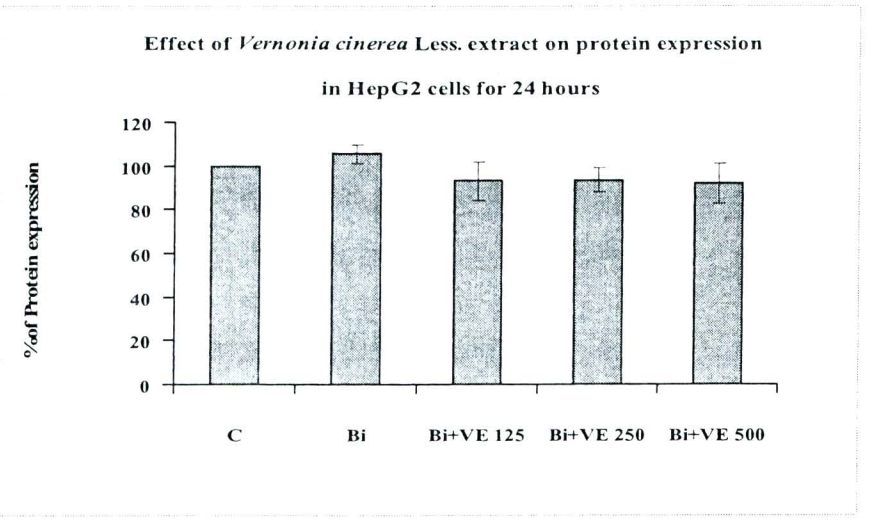


รูปที่ 4. ผลโดยตรงของสารสกัดหญ้าดอกขาว (VE) ต่อการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย diaminofluorescein, ผลการศึกษาแสดงร้อยละการสร้าง nitric oxide เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=-3), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย student t-test ($p < 0.05$), C : เซลล์ตับกลุ่มควบคุม, VE 62.5, 125, 250. 500 : เซลล์ตับได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 62.5, 125, 250, 500 μg/ml

ผลของสารก่อการอักเสบ และสกัดหญ้าดอกขาวต่อปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเซลล์ตับ

การทดสอบสารก่อการอักเสบ cytokines กระตุ้นเซลล์ตับ HepG2 ต่อปริมาณเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้าง NO ปริมาณสูงในภาวะอักเสบ โดยการวัดหาปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ด้วยวิธี immunoblotting เมื่อกระตุ้นเซลล์ตับด้วยสารก่อการอักเสบร่วมกัน 3 ชนิด LPS 1 μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตับ HepG2 มีปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ iNOS เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ตับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ที่เพิ่มขึ้นพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5. และ รูปที่ 6.) เมื่อทำการทดสอบสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500 μg/ml) ต่อปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบร่วมกัน พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้น ที่ความเข้มข้น 125 μg/ml สามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงรูปที่ 5. และ 6.

รูปที่ 5. ปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย immunoblotting, แสดงแทบโปรตีนของเอนไซม์ iNOS ที่มีขนาดประมาณ 130 kDa, ตัวอย่างจากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=-3), C : เซลล์ตับกลุ่มควบคุม, Bi : เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml, VE 125, 250. 500 : เซลล์ตับได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 125, 250, 500 μg/ml ตามลำดับ



รูปที่ 6. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาว (VE) ต่อการปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย immunoblotting, ผลการศึกษาแสดงร้อยละการแสดงออกของโปรตีนเทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=-3), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย student t-test ($p < 0.05$), C : เซลล์ตับกลุ่มควบคุม, Bi : เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 μg/ml, TNF-α 400 ng/ml และ Il-1β 400 ng/ml, VE 125, 250. 500 : เซลล์ตับได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 125, 250, 500 μg/ml ตามลำดับ