เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Chea, A., Hout, S., Long, C., Marcourt, L., Faure, R., Azas, N., and Elias, R. (2006). Antimalarial activitiy of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. *54*, 1437-1439.

Cirino, G., Fiorucci, S., and Sessa, W.C. (2003). Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? Trends in Pharmacological Sciences *24*, 91-95.

Colasanti, M., and Suzuki, H. (2000). The dual personality of NO. Trends in Pharmacological Sciences *21*, 249-252.

Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. International Immunopharmacology *1*, 1397-1406.

Deng, X.-s., and Deitrich, R.A. (2007). Ethanol metabolism and effects: Nitric oxide and its interaction. Curr Clin Pharmacol *2*, 145-153.

Gramenzi, A., Caputo, F., Biselli, M., Kuria, F., Loggi, E., Andreone, P., and Bernardi, M. (2006). Review article: alcoholic liver disease; pathophysiological aspects and risk factors. Alimentary Pharmacology & Therapeutics *24*, 1151-1161.

Gupta, M., Mazumder, U.K., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P.K., and Roy, S. (2003a). Evaluation of antipyretic potential of Vernonia cinerea extract in rats. Phytotherapy Research *17*, 804-806.

Gupta, M., Mazumder, U.K., Manikandan, L., Haldar, P.K., Bhattacharya, S., and Kandar, C.C. (2003b). Antibacterial activity of Vernonia cinerea. Fitoterapia *74*, 148-150.

Heidelbaugh J, B.M. (2006). Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. AFP *74*, 756-762.

Itoh, T., Hamada, N., Terazawa, R., Ito, M., Ohno, K., Ichihara, M., Nozawa, Y., and Ito, M. (2011). Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon [gamma]-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications *In Press, Uncorrected Proof*.

Iwalewa, E.O., Iwalewa, O.J., and Adeboye, J.O. (2003). Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of Vernonia cinerea less leaf. Journal of Ethnopharmacology *86*, 229-234.

Kirtikar K.R., B.B.D. (1975). Indian Medicinal Plants.

Kondo, T., Kobayashi, K., and Murohara, T. (2005). Nitric oxide signaling during myocardial angiogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry *264*, 25-34.

Kuttan, P.P.K.a.G. (2009). *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. Immunopharmacology and Immunotoxicology *31*, 94–102.

Latha, R.M., Geetha, T., and Varalakshmi, P. (1998). Effect of Vernonia cinerea Less Flower Extract in Adjuvant-Induced Arthritis. General Pharmacology *31*, 601-606.

Leoni S, P.F., Righini R, Bolondi L. (2006). Management of small hepatocellular carcinoma. Acta Gastroenterol Belg. *69(2)*, 230-235.

Li, C.-Q., and Wogan, G.N. (2005). Nitric oxide as a modulator of apoptosis. Cancer Letters *226*, 1-15.

Mazumder, U.K., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P.K., and Roy, S. (2003). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. Phytomedicine *10*, 185-188.

Mishra T.N., S.R.S., Upadhyay J., Srivastava R. (1984). Chemical constituents of *Vernonia cinerea*. Part I. Isolation and spectral studies of triterpenes. J. Natural. Prod. *47*, 368-372.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol. Rev. *87*, 315-424.

Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide *23*, 75-93.

Pratheeshkumar, P., and Kuttan, G. (2010). Ameliorative action of *Vernonia cinerea* L. on cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress in mice. nflammopharmacol.

Simone Mocellin, V.B.D.N. (2007). Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: Searching for therapeutic opportunities. Medicinal Research Reviews *27*, 317-352.

Thapa, B., and Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. Indian Journal of Pediatrics *74*, 663-671.

Wang, S., Wang, X., Yan, J., Xie, X., Fan, F., Zhou, X., Han, L., and Chen, J. (2007). Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts: Correlated with NO-cGMP signaling pathway. European Journal of Pharmacology *567*, 26-35.

ผลสำเร็จที่ได้จากโครงการ

ผลสำเร็จเบื้องต้น จากการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าพืชสมุนไพรท้องถิ่นของไทย หญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในภาวะเซลล์ตับอักเสบจากการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบหลายชนิด

ผลสำเร็จกึ่งกลาง การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยน้ำ (water crude extract) มีฤทธิ์ลดการสร้างอนุมูลอิสระ nitric oxide และเอนไซม์ inducible nitric oxide ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบซึ่งคล้ายกับการตอบสนองในร่างกายในภาวะตับอักเสบ ถือว่าเป็นองค์ความรู้เบื้องต้นสำหรับการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์ และความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าดอกขาวในสัตว์ทดลอง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาสมุนไพรมาตรฐานสำหรับโรคตับอักเสบต่อไป

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

การนำเสนอผลการวิจัย ในรูปแบบโปสเตอร์และมีการตีพิมพ์บทความบน Proceeding ในการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 33 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย (33rd Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting) ระหว่างวันที่ 17-19 มีนาคม 2554 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ภาคผนวก

Thai Journal of Pharmacology

www.thaipharmacol.org

Official Publication of
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Proceeding of

33rd Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting

17-19 March 2011

Vol.33, Suppl. 1, 2011 ISSN 0125-3832

P67

ฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ ในภาวะตับอักเสบ

สรินยา คำปัญญา[1*], พัทธชัย ปิ่นนาค[1], สกลวรรณ ประพฤติบัติ[2]

[1]หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์, [2]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

* ผู้แสดงผลงาน

โรคตับเป็นหนึ่งในโรคที่เป็นสาเหตุการตายของประชากรไทยและยังไม่สามารถรักษาให้หายขาด ได้เกิดได้จากหลายสาเหตุ เมื่อเซลล์ตับเกิดการอักเสบจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระรวมถึง ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ในปริมาณที่มากกว่าปกติส่งผลให้เซลล์เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรไทยมาใช้รักษาโรคต่าง ๆมากมาย หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการศึกษาว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ดี การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง NO และปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในภาวะตับอักเสบโดยให้สารก่อการอักเสบ lipopolysaccharide (LPS)1.0 μg/m, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 400 ng/ml, interleukin-1 beta (IL-1β) 400 ng/ml ร่วมกับสารสกัดหญ้าดอกขาวในเซลล์ตับ HepG2 ที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการสร้าง NO ด้วยสารเรืองแสง diaminofluorescein -2 diacetate และตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ด้วยวิธี immuno blot พบว่า HepG2 ที่ได้รับสารก่อการอักเสบมีการเพิ่มการสร้าง NO และปริมาณเอนไซม์ iNOS เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในเซลล์ตับที่เกิดภาวะอักเสบพบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มที่จะผลลดการสร้าง NO และปริมาณเอนไซม์ iNOS เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด อย่างไรก็ตามผลการทดลองไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษาแสดงในเบื้องต้น สารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มที่จะลดปริมาณและการสร้าง NO ของเซลล์ตับ HepG2 ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้

คำสำคัญ: Nitric oxide, Anti-inflammation, *Vernonia cinerea* Less., Hepatitis

ฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ในภาวะตับอักเสบ

สรินยา คำปัญญา[1*], พัทธชัย ปิ่นนาค[1], สกลวรรณ ประพฤติบัติ[2]

[1]หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[2]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

* ผู้แสดงผลงาน

บทคัดย่อ

โรคตับเป็นหนึ่งในโรคที่เป็นสาเหตุการตายของประชากรไทยและยังไม่สามารถรักษาให้หายขาด ได้เกิดได้จากหลายสาเหตุ อาทิการติดเชื้อไวรัส การดื่มสุราในปริมาณมาก เมื่อเซลล์ตับเกิดการอักเสบจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระรวมถึง ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ในปริมาณที่มากกว่าปกติ ส่งผลให้เซลล์เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรไทยมาใช้รักษาโรคต่างมากมาย หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการศึกษาว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ดี

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง NO และปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในภาวะตับอักเสบโดยให้สารก่อการอักเสบ lipopolysaccharide (LPS) 1 microgram/milliliter (μg/ml), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 400 nanogram/milliliter (ng/ml), interleukin-1 beta (IL-1β) 400 nanogram/milliliter (ng/ml) ร่วมกับสารสกัดหญ้าดอกขาวในเซลล์ตับ HepG2 ที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการสร้าง NO ด้วยสารเรืองแสง diaminofluorescein –2 diacetate และตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ด้วยวิธี immuno blot พบว่า HepG2 ที่ได้รับสารก่อการอักเสบเพิ่มการสร้าง NO เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและสารสกัดหญ้าดอกขาวมีผลลดการสร้าง NO และปริมาณเอนไซม์ iNOS ในเซลล์เมื่อเกิดภาวะอักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดอย่างไรก็ตามผลการทดลองไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษาแสดงให้ในเบื้องต้นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มที่ลดปริมาณและการสร้าง NO ของเซลล์ตับ HepG2 ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้

คำสำคัญ : Nitric oxide, Anti-inflammation, *Vernonia cinerea* Less., Hepatitis

บทนำ

โรคตับอักเสบเกิดจากภาวะที่มีการอักเสบและทำลายเซลล์ตับส่งผลให้ตับมีการทำงานผิดปกติ และเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย มีสาเหตุหลายประการที่พบได้บ่อย คือ การติดเชื้อไวรัสและการดื่มสุราในปริมาณมาก โรคตับอักเสบยังไม่มียาที่รักษาโรคได้โดยตรงและหายขาด วิธีการรักษาในปัจจุบันคือ ชะลอการอักเสบของเซลล์ตับ ผ่าตัดเปลี่ยนตับ ใช้ยาเคมีบำบัด (1) เมื่อเซลล์ตับอยู่ในภาวะการอักเสบจะส่งผลให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระต่าง ๆในปริมาณที่มากกว่าปกติ โดยเฉพาะ NO ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม reactive nitrogen species (RNS) สร้างจากเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) อย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะถูกสร้างขึ้นและตอบสนองต่อการ

อักเสบเป็นสำคัญที่พบได้ในเซลล์เกือบทุกชนิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบ เช่น LPS, TNF- α, IL-1β, Interferon-gamma (IFN-γ) เป็นต้น (2) ดังนั้นการลดการอักเสบของเซลล์ตับเป็นกลไกหนึ่งที่ช่วยชะลอภาวะโรคตับอักเสบ ปัจจุบันพบว่า พืชสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ดีและมีผลข้างเคียงน้อย จึงเป็นที่น่าสนใจค้นคว้าและพัฒนายาจากสมุนไพรในท้องถิ่น หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ขึ้นกระจายทั่วไปในประเทศไทยมีสรรพคุณใช้เป็นยารักษาอาการหรือโรคต่าง ๆ มากมาย มีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดเมทานอลจากหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในหนูที่ชักนำให้เกิดการบวมของอุ้งเท้า (paw edema) และลดไข้ในหนูขาว (3, 4)รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย(4) และปัจจุบันมีการนำหญ้าดอกขาวในรูปชาชงมาใช้ในทางคลินิกเพื่อบำบัดภาวะติดบุหรี่ในทางคลินิก (5)อย่างแพร่หลาย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายหลักในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวจากน้ำ (water extract) ต่อการสร้าง NO และ ปริมาณเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ตับ HepG2 ที่ให้สารก่อการอักเสบ เพื่อที่จะได้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์และนำไปใช้พัฒนายารักษาโรคตับต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดหญ้าดอกขาว

นำส่วนลำต้นและดอกของหญ้าดอกขาวแห้งมาสกัดด้วยวิธีการหมักโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิประมาณ 60 °C ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง จากนั้นกรองและหมักซ้ำ สารที่ได้จากการกรองนำมาสกัดแห้งด้วยเครื่องทำให้แห้งด้วยวิธีเยือกแข็ง (freeze dry) เป็นเวลา 3 วัน สารสกัดแห้งที่ได้จะเก็บใส่ขวดที่ปิดสนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line)

เซลล์ตับ HepG2 จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum(FBS) 10%, penicillin/streptomycin 1% เซลล์จะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C โดยจะเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3 วัน เมื่อเซลล์เจริญหนาแน่นแล้วจะถ่ายเลี้ยง (subculture) เพื่อใช้ทดลองต่อไป

การศึกษาผลของสารก่อการอักเสบและสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง NO

เซลล์ตับ HepG2 เพาะเลี้ยงในถาดหลุม (96-well-plate) ที่ความหนาแน่น $3x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่ปราศจากซีรัมและเติมสารก่อการอักเสบ LPS 1.0 μg/ml, TNF-α 400 ng/ml, IL-1β 400 ng/ml และสารสกัดหญ้าดอกขาว 62.5, 125, 250 และ 500 μg/ml เลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง

การวัดปริมาณ NO โดยเติมสาร DAF-2DA นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ 30 นาที จากนั้นดูดสาร DAF-2DA ออกเติมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) นำไปวัดค่าเรืองแสงที่เกิดจาก NO ทำปฏิกิริยากับสาร DAF-2DA ในอัตราส่วน 1:1 ได้เป็นสารเรืองแสงในระยะเวลา 30 นาทีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตรปริมาณ NO แสดงในรูป fluorescence เซลล์ตับ HepG2 นำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเบรดฟอร์ด (Bradford assay) ผลการศึกษานำเสนอในรูปของ % NO

การศึกษาผลของสารก่อการอักเสบและสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อปริมาณเอนไซม์ iNOS

เซลล์ตับ HepG2 ที่ทดสอบด้วยสารก่อการอักเสบเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์และขูดเซลล์ในสารละลาย PBS แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับแยกโปรตีนแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นเสียง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (cell lysate) ที่อุณหภูมิ -20 °C

นำ cell lysate ที่เตรียมได้ในปริมาณ 75 µg/well ไปแยกโปรตีนด้วย electrophoresis และถ่ายโปรตีนลงบน PVDF ( ) membrane นำบ่มกับ primary antibody (polyclonal Rabbit anti-iNOS) อัตราส่วน 1: 200 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงและบ่มกับ secondary antibody (polyclonal goat anti-rabbit) อัตราส่วน 1:10,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจวัดโปรตีนด้วย chemiluminescence reagent ได้เป็นแถบโปรตีนบนแผ่นฟิล์ม แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากแถบบนฟิล์มด้วยโปรแกรม Quantity One®

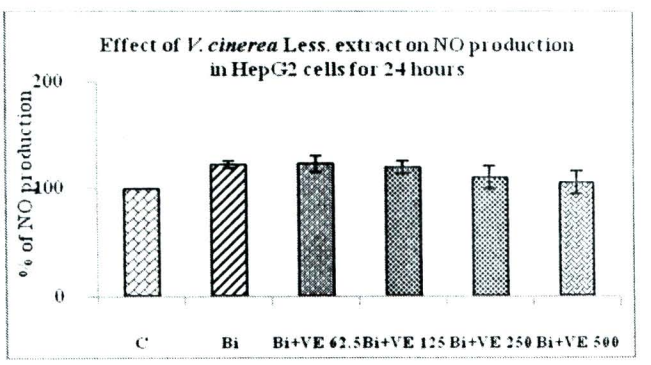
การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งแสดงผลเป็น mean ± SEM และวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ one way ANOVA ($p< 0.05$)

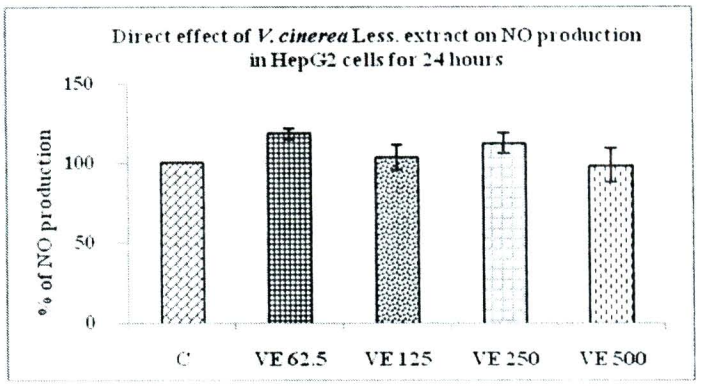
ผลการทดลอง

ผลของสารก่อการอักเสบและสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อการสร้าง NO

จากการทดสอบสารก่อการอักเสบ LPS, IL-1β และTNF-α และสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 µg/ml ต่อการสร้าง NO ของเซลล์ HepG2 พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารก่อการอักเสบมีการสร้าง NO เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้การเกิดเซลล์ตับอักเสบและเมื่อเซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว พบว่าการสร้าง NO มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้น อย่างไรก็ตามผลไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1) ส่วนเซลล์ HepG2 ที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวโดยตรง พบว่า มีการสร้าง NO เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)



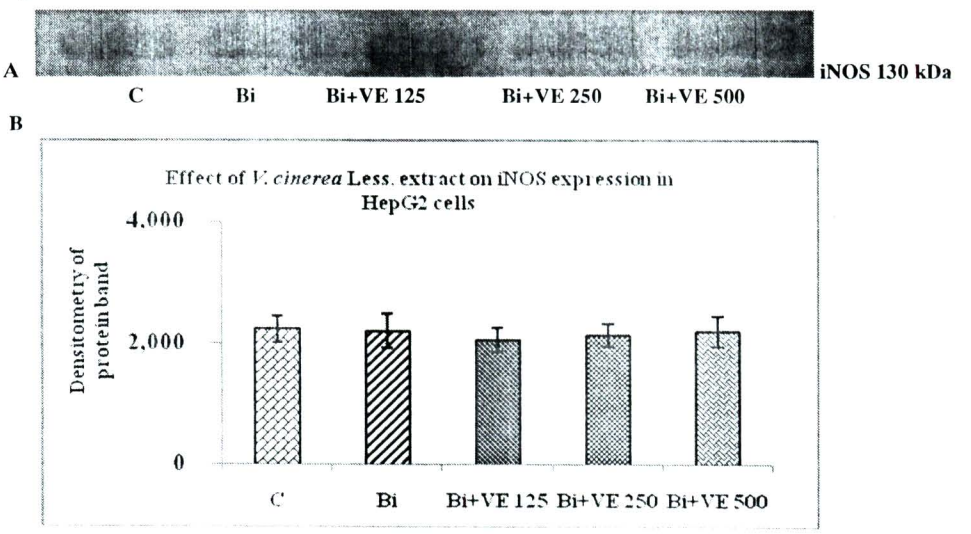
รูปที่ 1 กราฟแสดงร้อยละการสร้าง NO ของเซลล์ตับ HepG2 ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า Mean±SEM, C คือ เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบ, Bi+VE 62.5 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 62.5 µg/ml, Bi+VE 125 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 125 µg/ml, Bi+VE 250 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 250 µg/ml, Bi+VE 500 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 500 µg/ml



รูปที่ 2 กราฟแสดงร้อยละการสร้าง NO ของเซลล์ตับ HepG2 ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า Mean±SEM, C คือ เซลล์กลุ่มควบคุม, VE 62.5 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 62.5 μg/ml, VE 125 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 125 μg/ml, VE 250 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 250 μg/ml, VE 500 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 500 μg/ml

ผลของสารก่อการอักเสบและสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อปริมาณเอนไซม์ iNOS

จากการทดสอบสารก่อการอักเสบและสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 μg/ml ต่อปริมาณเอนไซม์ iNOS ของเซลล์ตับ HepG2 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ iNOS ของเซลล์กลุ่มที่ให้สารก่อการอักเสบและกลุ่มควบคุมพบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและเมื่อกลุ่มเซลล์ที่ให้สารก่อการอักเสบแล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดต่าง ๆมีปริมาณเอนไซม์ iNOS ลดลงโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 125 μg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มให้สารก่อการอักเสบ อย่างไรก็ตามผลไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 A แถบโปรตีนเอนไซม์ iNOS, B กราฟแสดงปริมาณเอนไซม์ iNOS ของเซลล์ตับ HepG2 ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า Mean±SEM, C คือ เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบ, Bi+VE 125 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 125 μg/ml, Bi+VE 250 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 250 μg/ml, Bi+VE 500 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 500 μg/ml

อภิปรายผลการทดลอง

ในภาวะเซลล์ตับอักเสบซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบหลายชนิดที่มาจากการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระรวมทั้ง NO (2) ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นยืนยันว่า เซลล์ HepG2 จะเพิ่มการสร้าง NO และมีปริมาณเอนไซม์ iNOS เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์ได้รับสารก่อการอักเสบหลายชนิดร่วมกันจากการศึกษาเบื้องต้นเราพบว่า การใช้สารก่อการอักเสบเพียงชนิดเดียวมีผลน้อยมากต่อการกระตุ้นการสร้าง NO (ไม่รายงานผล) การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทดลองใช้สารสกัดหญ้าดอกขาวมาจากการสกัดด้วยน้ำคล้ายกับชาชงหญ้าดอกขาวในทางคลินิก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากหญ้าดอกขาว พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดภาวะ oxidative stress โดยสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระ superoxide, hydroxyl radical, NO ใน serum ของหนูขนาดเล็ก ร่วมถึงยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ catalase, superoxide, dismutase, glutathione, glutathione peroxidase และ glutathione-S transferase ในเลือดและตับของหนู mice (6, 7) ร่วมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบจากการให้ carrageenin ที่ชักนำให้เกิดการบวมของอุ้งเท้าของหนู (paw edema) โดยไปลดระดับสารก่อการอักเสบ TNF-α, IL-1β, IL-6 (6, 8) และจากการให้ cyclophosphamide (CTX) ทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างรุนแรงต่อเซลล์ สารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดสารก่อการอักเสบ TNF-α, IFN-γ, IL-2 และลดความเสียหายของเซลล์ลำไส้เล็กในหนูที่ให้ CTX (7) จากการศึกษาผลของสารสกัดหญ้าดอกจากการสกัดน้ำมีแนวโน้มที่จะสามารถลดการอักเสบของเซลล์ตับได้ในเบื้องต้นอย่างไรก็ตามผลการศึกษาไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ฉะนั้นจำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อ ๆไปถึงผลการต้านการอักเสบในภาวะตับอักเสบในสัตว์ทดลองร่วมทั้งความเป็นพิษของหญ้าดอกขาว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2552 (วช) มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับการดำเนินงานในโครงการวิจัยนี้ รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Whang-Peng J, Cheng A-L, Hsu C, Chen C-M. Clinical Development and Future Direction for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. Journal of Experimental & Clinical Medicine. 2010;2(3):93-103.
2. Diesen DL, Kuo PC. Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part I. General Considerations and Redox Biology in Hepatitis. Journal of Surgical Research. 2010;162(1):95-109.
3. Iwalewa EO, Iwalewa OJ, Adeboye JO. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. Journal of Ethnopharmacology. 2003;86(2-3):229-34.
4. Gupta M, Mazumder UK, Manikandan L, Haldar PK, Bhattacharya S, Kandar CC. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. Fitoterapia. 2003;74(1-2):148-50.
5. Donrawee Leelarungrayub SP, Prapas Pothongsunun, Thanyaluck Sriboonreung, Araya Yankai and Richard J Bloomer. *Vernonia cinerea* Less. supplementation and strenuous exercise reduce smoking rate: relation to oxidative stress status and beta-endorphin

release in active smokers. Journal of the International Society of Sports Nutrition 2010. 2010;7:21.
6. Kuttan PPKaG. *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2009;31(1):94–102.
7. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Ameliorative action of *Vernonia cinerea* L. on cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress in mice. nflammopharmacol. 2010.
8. Mazumder UK, Gupta M, Manikandan L, Bhattacharya S, Haldar PK, Roy S. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. Phytomedicine. 2003;10(2-3):185-8.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ในภาวะตับอักเสบ

สรินยา คำปัญญา[1*], พัทธชัย ปิ่นนาค[1], สกลวรรณ ประพฤติบัติ[2]
[1]หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 65000
[2]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 65000
* ผู้แสดงผลงาน

บทนำ

โรคตับอักเสบเกิดจากภาวะที่มีการอักเสบและทำลายเซลล์ตับส่งผลให้ตับมีการทำงานผิดปกติจัดเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยและยังไม่มียาที่รักษาโรคได้โดยตรงและหายขาด วิธีการรักษาในปัจจุบันคือ ชะลอการอักเสบของเซลล์ตับ

เมื่อเซลล์ตับอยู่ในภาวะอักเสบจะส่งผลให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระต่าง ๆในปริมาณที่มากกว่าปกติโดยเฉพาะไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ที่สร้างจากเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) อย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะเอนไซม์inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะถูกสร้างขึ้นและตอบสนองต่อการอักเสบเป็นสำคัญที่พบได้ในเซลล์เกือบทุกชนิด ดังนั้นการลดการอักเสบของเซลล์ตับจึงเป็นกลไกหนึ่งที่ช่วยชะลอภาวะโรคตับอักเสบ

ปัจจุบันมีการค้นคว้าและพัฒนาพืชสมุนไพรในท้องถิ่นหลายชนิดนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆซึ่งมีผลข้างเคียงน้อยและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ขึ้นกระจายทั่วไปในประเทศไทย จากรายงานผลการศึกษาต่าง ๆ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ดี

การวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายหลักในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวจากน้ำ (water extract) ต่อการสร้าง NO และ ปริมาณเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ตับ HepG2 ที่ให้สารก่อการอักเสบ เพื่อที่จะได้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์และนำไปใช้พัฒนายารักษาโรคตับต่อไป

วิธีการทดลอง

เตรียมสารสกัดหญ้าดอกขาวโดยการหมักด้วยน้ำและสกัดแห้ง

⇩

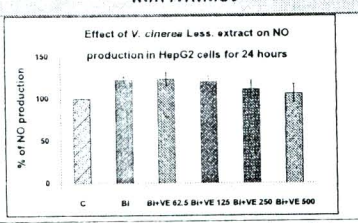
เพาะเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) ในอาหาร DMEM/F12,10% FBS1% Pen/Strep,37 ˚C และ subculture ทุก 3-4 วัน

⇩

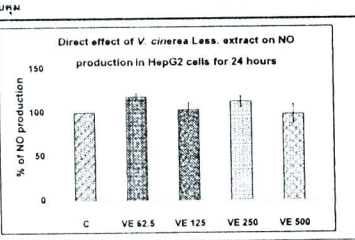
วัดปริมาณ NO โดยเติมสาร diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA) และวัด fluorescence ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร นำเซลล์ตับ HepG2 นำไปหาปริมาณโปรตีน (Bradford assay)

ตรวจสอบการแสดงออกของของ iNOS ด้วยวิธี immuno blot โดยการแยกโปรตีนด้วย 7.5% SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนลง PVDF membrane แล้วนำบ่มกับ antibody ตรวจวัดโปรตีนด้วย chemiluminescence แสดงเป็นแถบโปรตีนบนแผ่นฟิล์ม วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากแถบบนฟิล์มด้วยโปรแกรม Quantity One®

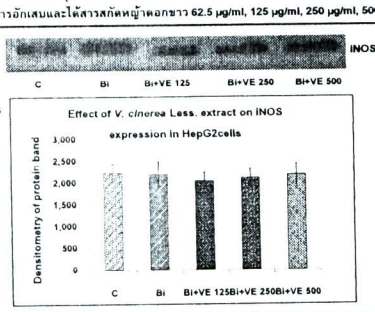
ผลการทดลอง



รูปที่ 1 กราฟแสดงร้อยละการสร้าง NO ของเซลล์ตับ HepG2 ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า Mean±SEM C คือ เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบ, Bi+VE 62.5, Bi+VE 125, Bi+VE 250, Bi+VE 500 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ตามลำดับ, * แสดงนัยสำคัญทางสถิติด้วย one way ANOVA, # แสดงนัยสำคัญทางสถิติด้วย student t-test ($p< 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2 กราฟแสดงร้อยละการสร้าง NO ของเซลล์ตับ HepG2 ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า Mean±SEM C คือ เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบ, Bi+VE 62.5, Bi+VE 125, Bi+VE 250, Bi+VE 500 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ตามลำดับ



รูปที่ 3 A แถบโปรตีนเอนไซม์ iNOS, B กราฟแสดงปริมาณเอนไซม์ iNOS ของเซลล์ตับ HepG2 ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า Mean±SEM C คือ เซลล์กลุ่มควบคุม, Bi คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบ, Bi+VE 125 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 125 µg/ml, Bi+VE 250 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 250 µg/ml, Bi+VE 500 คือ เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารก่อการอักเสบและได้สารสกัดหญ้าดอกขาว 500 µg/ml

วิจารณ์และสรุปผล

ภาวะเซลล์ตับอักเสบซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อการอักเสบหลายชนิดที่มาจากการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระรวมทั้ง NO ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์ HepG2ได้รับสารก่อการอักเสบหลายชนิดร่วมกัน (LPS 1.0 µg/ml, TNF-α 400 ng/ml, IL-1β 400 ng/ml) เซลล์จะเพิ่มการสร้าง NO และมีปริมาณเอนไซม์ iNOS เพิ่มขึ้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทดลองใช้สารสกัดหญ้าดอกขาวจากการสกัดด้วยน้ำคล้ายกับการใช้หญ้าดอกขาวในรูปแบบชาชงในทางคลินิก จากผลการศึกษาสารสกัดน้ำจากหญ้าดอกมีแนวโน้มที่จะสามารถลดการอักเสบของเซลล์ตับได้ในเบื้องต้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ฉะนั้นจำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อ ๆไปถึงผลการต้านการอักเสบในภาวะตับอักเสบในสัตว์ทดลองร่วมทั้งความเป็นพิษของหญ้าดอกขาว

เอกสารอ้างอิง

- Whang-Peng J, Cheng A-L, Hsu C, Chen C-M. Clinical Development and Future Direction for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. Journal of Experimental & Clinical Medicine. 2010;2(3):93-103.
- Diesen DL, Kuo PC. Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part I. General Considerations and Redox Biology in Hepatitis. Journal of Surgical Research. 2010;162(1):95-109.
- Iwalewa EO, Iwalewa OJ, Adeboye JO. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. Journal of Ethnopharmacology. 2003;86(2-3):229-34.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2552 (วช)
มหาวิทยาลัยนเรศวร