บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

สารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเอทานอลและด้วยน้ำ

ส่วนเหนือดินของเพชรสังฆาตนำมาทำให้แห้งและสกัดด้วยเอทานอลและด้วยน้ำ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้เป็นน้ำกระสายยาในยาแผนไทย โดยทำการสกัดด้วยเอทานอล 95% ในอุปกรณ์ soxhlet นาน 7 และ 48 ชั่วโมงได้สารสกัด CQES7 และ CQES48 ตามลำดับ เมื่อใช้อุปกรณ์ reflux สกัดผงแห้งเพชรสังฆาตนาน 7 ชั่วโมงได้สารสกัด CQER7 ส่วนหนึ่งของผงแห้งเพชรสังฆาตนำมาต้มกับน้ำทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry ได้สารสกัด CQWF1 นอกจากนี้ยังได้ทำการคั้นน้ำจากเพชรสังฆาตสดและนำน้ำคั้นที่ได้มาเคี่ยวนาน 1 ชั่วโมง นำน้ำต้มที่ได้ไปทำให้แห้งวิธีพ่นแห้งหรือ spray dry ได้สารสกัด CQWS1 ปริมาณของสารสกัดที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ มีดังนี้ CQES7 (2.93%), CQES48 (3.48%), CQER7 (3.07%), CQWF1 (2.52%) และ CQWS1 (0.45%) (ตารางที่ 1)

ปริมาณสารสกัดที่ได้พบว่าเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ใช้ในการสกัด (ตารางที่ 1) ดังเช่น CQES48 ซึ่งใช้เวลาสกัดนานถึง 48 ชั่วโมงได้ปริมาณสารสกัดสูงกว่า CQES7 และเมื่อใช้เวลาสกัดเท่ากันแต่แตกต่างเพียงอุปกรณ์ที่ใช้สกัดระหว่าง reflux และ soxhlet พบว่า CQER7 ให้ปริมาณสารสกัดมากกว่า CQES7 อาจเป็นเพราะ CQER7 ได้จากเพชรสังฆาตแช่ในเอทานอลและสัมผัสกับความร้อนโดยตรงในอุปกรณ์ reflux ทำให้การละลายของสารสำคัญเพิ่มตามไปด้วย จึงได้ปริมาณสารสกัดมากกว่า แต่ก็มีข้อเสียคือโอกาสที่สารสำคัญสลายตัวย่อมสูงตามไปด้วยเนื่องจากสัมผัสกับความร้อนที่สูงโดยตรงนั่นเอง (Arias et al., 2009) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดน้ำด้วยกันเองพบว่า CQWF1 ได้ปริมาณมากกว่า CQWS1 เป็นเพราะ CQWF1 ได้จากการต้มผงแห้งเพชรสังฆาตกับน้ำนาน 1 ชั่วโมงโดยตรง ขณะที่ CQWS1 ได้จากน้ำคั้นจากเพชรสังฆาตสดและนำน้ำคั้นมาเคี่ยวให้เดือดอีก 1 ชั่วโมง จากข้อมูลการแพทย์แผนไทยได้ระบุให้รับประทานเพชรสังฆาตสดร่วมกับผลไม้อื่น เช่น กล้วย ทั้งนี้เพื่อลดการระคายเคืองจาก calcium oxalate ในเพชรสังฆาตสด และยังเป็นเหตุผลหนึ่งทำให้วิธีการสกัด CQWS1 ต้องเคี่ยวน้ำคั้นให้เดือดเพื่อทำลายผลึก calcium oxalate นอกจากนี้ CQWS1 ได้มาจากกระบวนการพ่นแห้ง spray dry ซึ่งต้องพ่นน้ำให้เป็นละอองและกลายเป็นไอโดยอาศัยความร้อนสูง คงเหลือแต่สารสกัดในภาชนะรองรับ จึงอาจเกิดการสูญเสียสารสกัดระหว่างกระบวนการพ่นแห้ง นอกจากนี้สารสำคัญบางตัวอาจสลายตัวเนื่องจากความร้อนสูงที่ใช้ ขณะที่สารสกัด CQWF1 ได้จากกระบวนการ freeze dry นำสารสกัดน้ำทำให้น้ำกลายเป็นน้ำแข็งและระเหิดกลายเป็นไอภายใต้ความดัน (Franks, 1998) คงเหลือแต่สารสกัดไว้ในภาชนะรองรับทำให้ปริมาณการสูญเสียของสารสกัดน้อยกว่า CQWS1 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ

สารสกัด	**% yield** (น้ำหนักสารสกัด : น้ำหนักพืชสด)
CQES7	2.93
CQES48	3.48
CQER7	3.07
CQWS1	0.45
CQWF1	2.52

การวิเคราะห์หาปริมาณ quercetin ในสารสกัดด้วยวิธี TLC densitometry

จากรายงานวิจัยพบว่ามีฟลาโวนอยด์ quercetin ในเพชรสังฆาต (Adesanya et al., 1999; Thakur et al., 2009) และเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ ECV304 จากภาวะเครียดของ homocysteine ได้ (Lin et al., 2007) ปริมาณ quercetin ในสารสกัดอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้แต่ละครั้งแปรปรวนตามไปด้วย

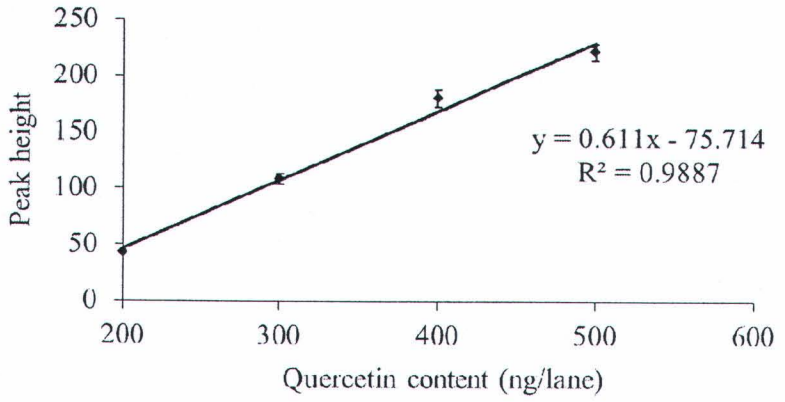
ดังนั้น การวิเคราะห์หาปริมาณเบื้องต้นจึงนำ quercetin มาใช้เป็นตัวติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด โดยวิเคราะห์หาปริมาณ quercetin ในสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเอทานอลเปรียบเทียบระหว่างวิธีสกัดด้วยอุปกรณ์ soxhlet (CQES7) และ reflux (CQER7) ด้วยวิธี TLC densitometry พบว่า R_f ของสารมาตรฐาน quercetin เท่ากับ 0.52 ในระบบตัวทำละลายผสม toluene : ethyl acetate : formic acid (6:4:1, v/v/v) เมื่อวัดที่ค่าดูดกลืนแสง 254 และ 365 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณ quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำมาจัดทำเป็นกราฟเส้นตรง ($y = 0.611x - 75.714$; $R^2 = 0.9887$) (ตารางที่ 2) และนำกราฟมาใช้คำนวณหาปริมาณ quercetin ในสารสกัดพบว่าปริมาณ quercetin ใน CQES7 จำนวน 1 มิลลิกรัมได้เท่ากับ 1.82 ± 0.09 ไมโครกรัม ซึ่งมากกว่าใน CQER7 (1.46 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด) (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่าถึงแม้ปริมาณสารสกัด CQER7 จะมากกว่า CQWS1 (ตารางที่ 1) แต่ปริมาณสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดกลับได้น้อยกว่าทั้งที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลและเวลาที่ใช้สกัดเหมือนกัน (ตารางที่ 2) อาจเนื่องมาจากการสลายตัวของ quercetin ที่ความร้อนสูงด้วยอุปกรณ์ reflux นั่นเอง (Arias et al., 2009) และยังสอดคล้องกับที่เคยมีรายงานว่าสาร chlorogenic acid ในพืช *Folium eucommiae* เมื่อสกัดด้วยอุปกรณ์ soxhlet ได้ปริมาณมากกว่าที่สกัดด้วยอุปกรณ์ reflux (Liu et al., 2010) ดังนั้น กรรมวิธีการสกัดที่แตกต่างกันจึงเป็นตัวแปรสำคัญที่มีอิทธิพลต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

จากรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพชรสังฆาตที่หมักด้วยเมทานอลนาน 48 ชั่วโมงเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ค่า EC_{50} 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและที่ความเข้มข้นนี้ยังกำจัดอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ (59.1%) และ $OH^{\cdot}$ (59.8%) (Jainu and Devi, 2005) และยังพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ quercetin, ascorbic acid และ resveratrol ซึ่งสกัดได้จากเพชรสังฆาต (Adesanya et al., 1999; Boots et al., 2008; Jainu and Mohan 2008) จึงทำการศึกษาว่าเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยวิธีใดจึงจะมีฤทธิ์

ตารางที่ 2. การวิเคราะห์หาปริมาณ quercetinในสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยวิธี TLC densitometry (การทดลอง 3 ครั้ง)



สารสกัด	ปริมาณ quercetin	
	นาโนกรัมต่อเลน	ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด
CQES7	362.38	1.82 ± 0.09
CQER7	291.09	1.46 ± 0.06

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดและมีความสัมพันธ์กับปริมาณ quercetin, ascorbic acid และ resveratrol ในสารสกัดหรือไม่ ?

ผลการทดลองวิธี DPPH พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด (ภาพที่ 1A) นำมาเรียงลำดับจากความแรงจากมากไปน้อย ดังนี้ CQES48 (EC_{50} 0.223 ± 0.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) > CQWS1 (EC_{50} 0.256 ± 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) > CQES7 (EC_{50} 0.333 ± 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) > CQER7 (EC_{50} 0.443 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 1B) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ quercetin, ascorbic acid และ resveratrol โดยนำมาเรียงลำดับความแรงจากมากไปน้อย ดังนี้ quercetin (EC_{50} 6.23 ± 0.10 ไมโครโมลาร์; 2.11 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) > ascorbic acid ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (EC_{50} 19.66 ± 0.13 ไมโครโมลาร์; 3.46 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) > resveratrol (EC_{50} 109.70 ± 2.27 ไมโครโมลาร์; 25.03 ± 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 1C) แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญ quercetin และ resveratrol อาจใช้เป็นตัวติดตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 สำหรับ CQWF1 ไม่สามารถหาค่า EC_{50} ได้เนื่องจากละลายได้สูงสุดอยู่ที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH เพียง 31.84%

จากรายงานของ Scherer และคณะ (2009) พบว่าความเข้มข้นของ DPPH ที่แตกต่างกันจะมีผลต่อค่า EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเพชรสังฆาตกับที่เคยมีรายงานวิจัยไว้ จึงต้องเทียบจากความเข้มข้น DPPH เท่ากันโดยคำนวณเป็นค่า AAI (Scherer and Godoy, 2009) โดยได้ค่า AAI ดังนี้ quercetin (AAI 14.7 ใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานใน Scherer and Godoy, 2009) ascorbic acid (AAI 8.96) resveratrol (AAI 1.12) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด CQES48 (EC_{50} 0.223 ± 0.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; AAI 0.14) พบว่าสูงกว่าที่เคยมีรายงานของสารสกัดเพชรสังฆาตที่หมักด้วยเมทานอลนาน 48 ชั่วโมง (EC_{50} 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; AAI 0.049) (Jainu and Devi, 2005) อาจเป็นเพราะกระบวนการสกัดด้วยอุปกรณ์ soxhlet ทำให้ได้ปริมาณ quercetin สูงกว่าที่ได้จากกระบวนการหมัก นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CQES7 มากกว่า CQER7 (ภาพที่ 1B) อาจเป็นเพราะด้วยอุปกรณ์ reflux ทำให้ quercetin เกิดการสลายตัวส่งผลให้ปริมาณ quercetin ลดลง (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ quercetin กับของสารสกัด CQES7 พบว่าค่า EC_{50} ของ quercetin เท่ากับ 6.23 ± 0.10 ไมโครโมลาร์หรือ 2.11 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1C) ขณะที่ค่า EC_{50} ของ CQES7 เท่ากับ 0.333 ± 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1B) เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณ quercetin โดยอาศัยข้อมูลในตารางที่ 2 พบว่า CQES7 จะมีปริมาณ quercetin อยู่

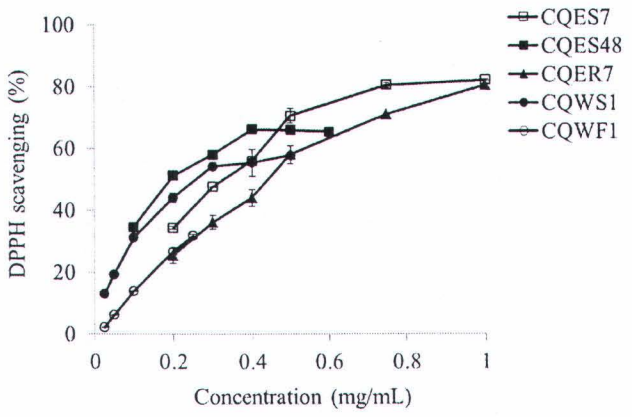
0.606 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.333 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร x 1.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด) ซึ่งน้อยกว่าค่า EC_{50} ของ quercetin (2.11 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงให้เห็นว่า quercetin ไม่ได้เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพียงตัวเดียวแต่มีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นในเพชรสังฆาตได้แก่ resveratrol และ ascorbic acid (Adesanya et al., 1999; Jainu and Mohan, 2008) โดยจากผลการทดลองค่า EC_{50} ของ resveratrol เท่ากับ 109.7 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 1C) ได้ใกล้เคียงกับเคยมีรายงานโดย Lee และคณะ (2004) เท่ากับ 123.3 ไมโครโมลาร์

สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยน้ำ CQWS1 ให้ค่า AAI = 0.12 (EC_{50} 0.256 ± 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อาจเนื่องมาจากสารสำคัญในเพชรสังฆาตได้แก่ quercitrin (quercetin-3-rhamnoside) และ iso-quercitrin (quercetin-3-glucoside) (Jainu and Devi, 2005; Jakikasem et al., 2000; Singh et al., 2007) ซึ่งมีรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับ quercetin (Lee et al., 2001, Peng et al., 2003)

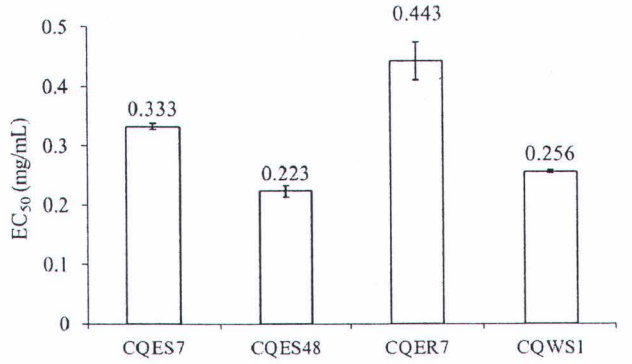
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$

วิธี DPPH นั้นเป็นวิธีการตรวจสอบอนุมูลอิสระทั่วไป ดังนั้น เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดใดในระดับเซลล์ จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 และ $OH^{\cdot}$ ซึ่งเป็น reactive oxygen species (ROS) จากผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ของสารสกัดเพชรสังฆาตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาพที่ 2A) พบว่า CQWS1 สามารถต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ (EC_{50} 0.068 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ได้ดีกว่า CQWF1 (EC_{50} 0.086 ± 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 2B) ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากสาร quercitrin และ iso-quercitrin ในเพชรสังฆาตสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่เคยมีรายงานไว้ (Jakikasem et al., 2000) และพบฤทธิ์ดังกล่าว (Lu and Yeap Foo, 2000; Robak and Gryglewski, 1988) สำหรับสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเอทานอลพบว่ามีปัญหาจากสีดำเข้มของสารสกัดที่ไปรบกวนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรทำให้ไม่สามารถหาค่า EC_{50}

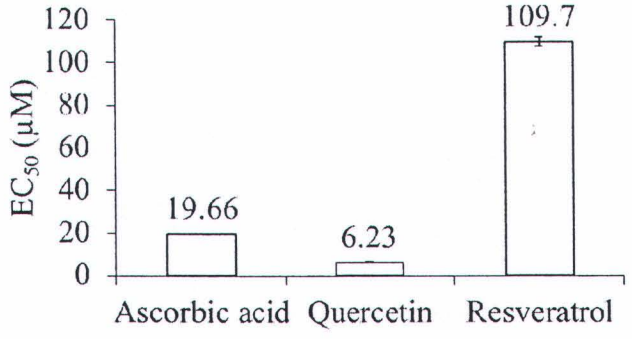
(A)



(B)



(C)



ภาพที่ 1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเพชรสังฆาต และ quercetin, ascorbic acid และ resveratrol ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

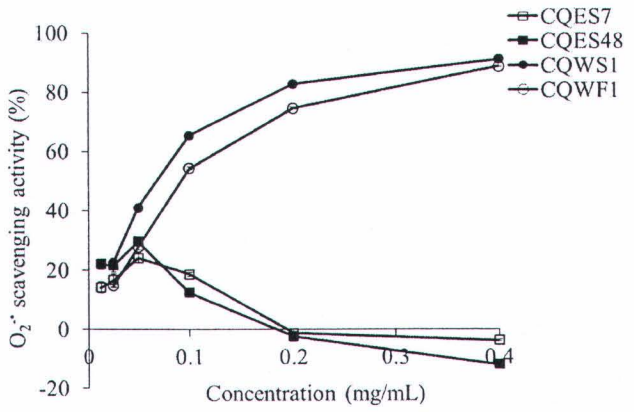
อย่างไรก็ตาม เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ของเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ จึงวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถเรียงลำดับความแรงได้ดังนี้ CQWS1 (40.97%) > CQES48 (29.57%) > CQWF1 (27.77%) > CQES7 (24.11%) (ภาพที่ 2C) โดยที่ CQES48 พบว่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่เคยมีรายงานไว้ว่าสารสกัดเพชรสังฆาตที่หมักด้วยเมทานอล นาน 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ได้ 29.5% (Jainu and Devi, 2005) ที่อาจเป็นผลมาจาก quercetin และ resveratrol ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า quercetin (EC_{50} 23.41 ± 0.62 ไมโครโมลาร์; 7.92 ± 0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ได้ดีกว่า resveratrol (EC_{50} 159.42 ± 5.97 ไมโครโมลาร์; 36.38 ± 1.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 3) จึงเป็นไปได้ว่า quercetin และ resveratrol อาจเป็นสารออกฤทธิ์ต้าน $O_2^{\cdot-}$ และจะใช้เป็นตัวติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48

ฤทธิ์ต้าน H_2O_2

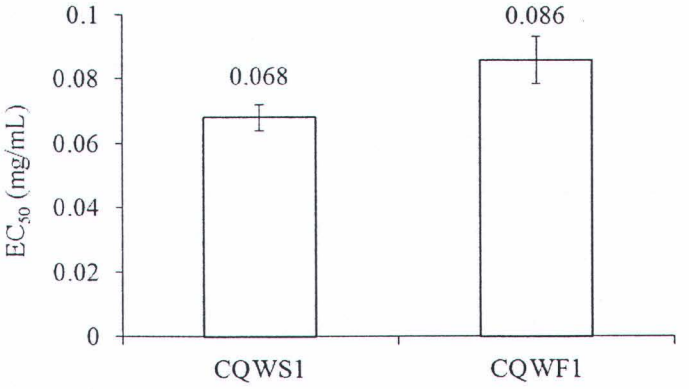
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน H_2O_2 พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดเพชรสังฆาตเพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้น (ภาพที่ 4A) โดยเรียงลำดับความแรงได้ดังนี้ CQWS1 (EC_{50} 0.488 ± 0.017 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) > CQWF1 (EC_{50} 0.587 ± 0.026 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) > CQES48 (EC_{50} 0.661 ± 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) > CQES7 (EC_{50} 0.805 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 4B) ขณะที่ quercetin (EC_{50} 46.34 ± 2.28 ไมโครโมลาร์) สามารถต้าน H_2O_2 ได้ดีกว่า ascorbic acid (EC_{50} 87.04 ± 4.91 ไมโครโมลาร์) และ resveratrol (ภาพที่ 5) ทั้งนี้ resveratrol ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ สามารถต้าน H_2O_2 ได้เพียง 45.97±1.13% โดยใช้ ascorbic acid ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกและใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้โดย Choi และคณะ (2007) ได้ค่า EC_{50} อยู่ที่ 46.3 ไมโครโมลาร์

เหตุที่สารสกัดเพชรสังฆาตด้วยน้ำ CQWS1 และ CQWF1 สามารถต้าน H_2O_2 ได้นั้นอาจเป็นผลมาจากสารสำคัญ quercitrin ซึ่งเคยมีรายงานว่า quercitrin สามารถกำจัด H_2O_2 (Wagner et al., 2006) โดยที่ฤทธิ์ของ CQES7 และ CQES48 อาจมาจาก quercetin, ascorbic acid และ resveratrol ที่เคยมีรายงานว่าสกัดได้จากเพชรสังฆาต (Adesanya et al., 1999; Jainu and Mohan, 2008; Singh et. al., 2007; Thakur et. al., 2009) นอกจากนี้ CQES48 สามารถต้าน H_2O_2 ได้ดีกว่า CQES7 อาจมาจากปริมาณ quercetin ที่มากกว่า

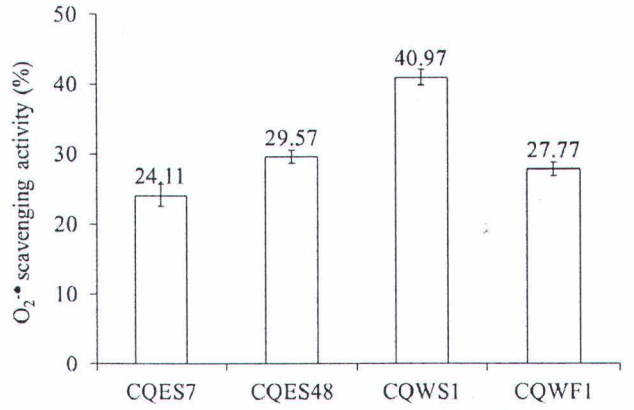
(A)



(B)

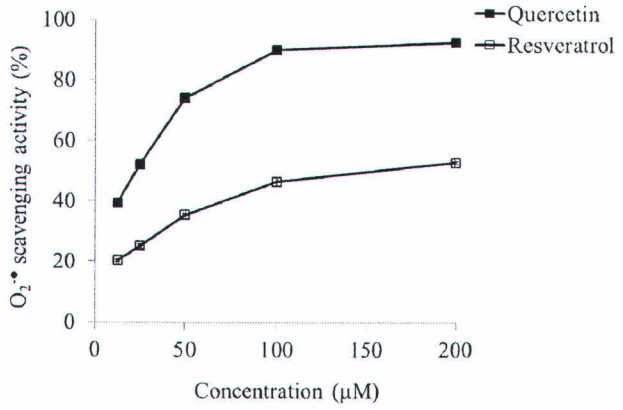


(C)

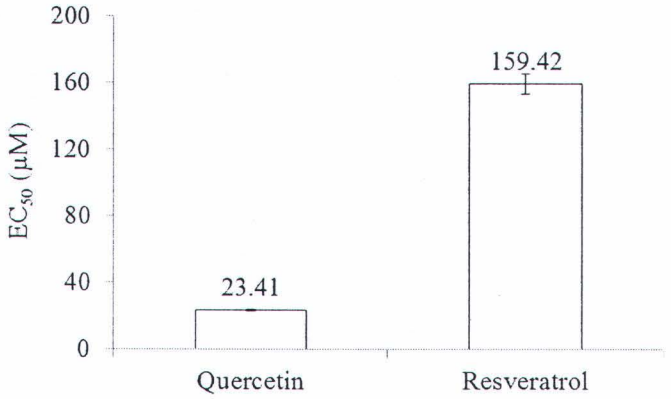


ภาพที่ 2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ของสารสกัดเพชรสังฆาต (A) ที่ความเข้มข้น 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) ค่า EC_{50} ของ CQWS1 และ CQWF1 และ (C) สารสกัดเพชรสังฆาตที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

(A)

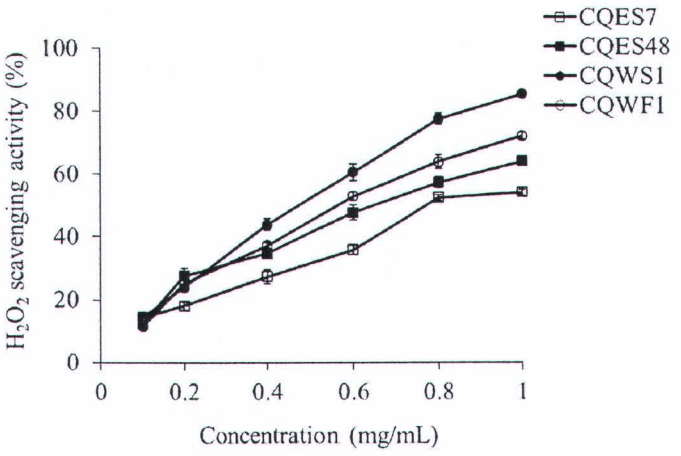


(B)

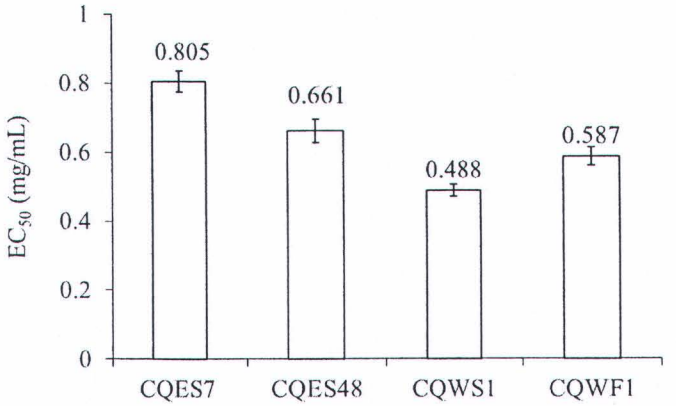


ภาพที่ 3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ของ quercetin และ resveratrol (A) ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ (B) ค่า EC_{50} ของ quercetin และ resveratrol ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

(A)

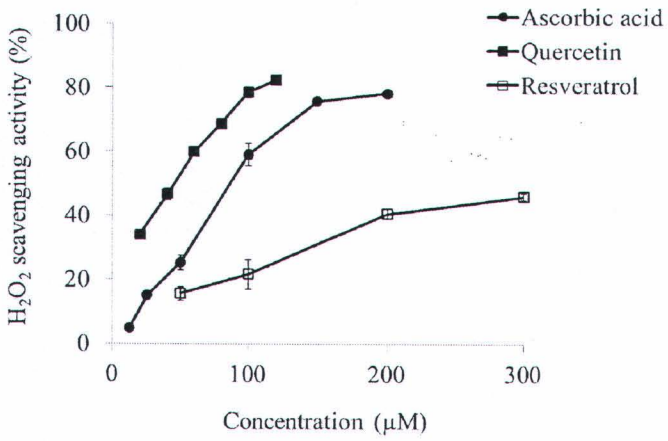


(B)

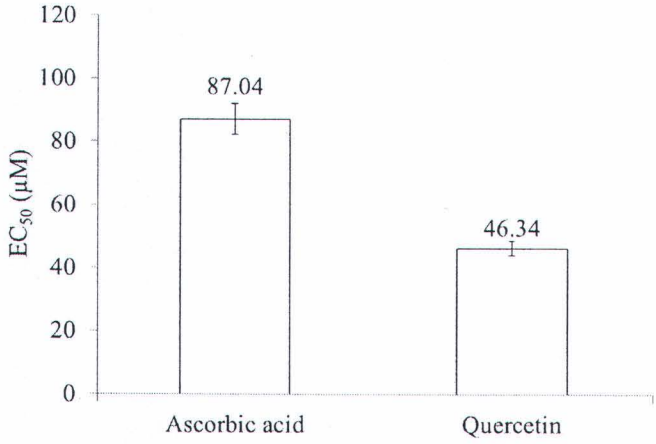


ภาพที่ 4. ฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ของสารสกัดเพชรสังฆาต (A) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) ค่า EC_{50} ของสารสกัดเพชรสังฆาต ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

(A)



(B)



ภาพที่ 5. ฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ของ quercetin และ resveratrol (A) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) ค่า EC_{50} ของ quercetin และใช้ ascorbic acid เป็นกลุ่มควบคุมบวก ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$

สารสกัดเพชรสังฆาตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 6A) โดยที่ CQWS1 (EC_{50} 0.329 ± 0.018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีความแรงมากกว่า CQWF1 (EC_{50} 0.460 ± 0.036 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 6B) โดยใช้ mannitol เป็นกลุ่มควบคุมบวกให้ค่า EC_{50} 3.354 ± 0.060 มิลลิโมลาร์ (0.611 ± 0.011 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้โดย Hazra และคณะ (2008) ได้เท่ากับ 0.571 ± 0.020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามไม่สามารถหาค่า EC_{50} ของสารสกัด CQES7 และ CQES48 เนื่องจากปัญหาการรบกวนสีของสารสกัดต่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ เรียงลำดับได้ดังนี้ CQWS1 (40.18%) > CQWF1 (33.38%) > CQES48 (29.98%) > CQES7 (20.28%) (ภาพที่ 6C)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ ของ CQES48 จะน้อยกว่าที่เคยมีรายงานไว้ว่าสารสกัดเพชรสังฆาตหมักด้วยเมทานอลนาน 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ ได้ถึง 47.6% (Jainu and Devi, 2005) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของระบบทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ หรือกรรมวิธีการสกัดที่ใช้ความร้อนอาจไปทำให้สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ ในสารสกัดเกิดการสลายตัว เป็นที่น่าสังเกตว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายเองก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้ (Bruck et al., 1999; Repine et al., 1979) ดังนั้น เพื่อลดการรบกวนของตัวทำละลาย จึงจำกัดความเข้มข้นของ DMSO ให้ไม่เกิน 0.5%

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$

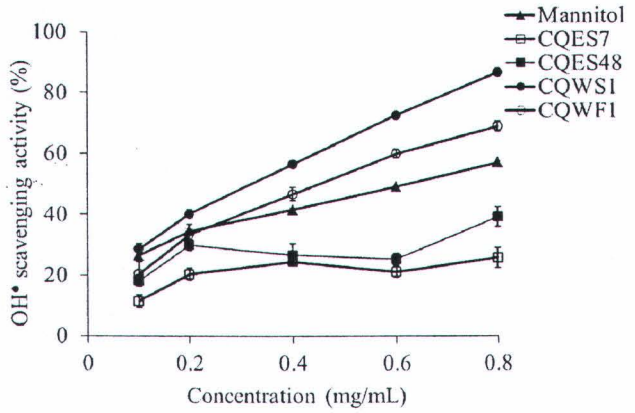
เซลล์บุผิวหลอดเลือดมีหน้าที่สำคัญในการสร้าง NO เพื่อขยายหลอดเลือด แต่ในภาวะเครียดออกซิเดชันจะมีการสร้าง NO มากเกินไปส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อระบบหลอดเลือด (Wink and Mitchell, 1998) จากผลการทดลองพบว่า CQWF1 สามารถต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ได้สูงสุด (EC_{50} 0.776 ± 0.027 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 7) เนื่องจากเกิดการรบกวนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ทดสอบของ CQES7 และ CQES48 ทำให้ไม่สามารถหาค่า EC_{50} อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถเรียงลำดับความแรงของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ได้ดังนี้ CQWF1 (41.93%) > CQES48 (34.25%) > CQES7 (32.90%) > CQWS1 (8.80%) (ภาพที่ 7B) ขณะที่ quercetin สามารถต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ได้ค่า EC_{50} 97.69 ± 14.46 ไมโครโมลาร์ (33.045 ± 4.891 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 7C) ซึ่งได้ใกล้เคียงกับที่มีรายงานโดย Choi และคณะ (2007) (EC_{50} 91.4 ไมโครโมลาร์) อย่างไรก็

ตาม ด้วยข้อจำกัดการละลายของ resveratrol ใน DMSO ทำให้ความเข้มข้นสูงสุดของ resveratrol ที่วัดได้คือ 200 ไมโครโมลาร์สามารถต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ได้เพียง 44.09 ± 1.30% (ภาพที่ 7C)

โดยสรุป สารสกัดเพชรสังฆาตที่มาจากวิธีสกัดแตกต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดที่ทดสอบในหลอดทดลองแตกต่างกันไป โดยที่สารสกัดด้วยเอทานอล CQES48 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดและยังมีฤทธิ์ต้าน H_2O_2 สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้ (Badami and Channabasavaraj, 2007, Jainu and Devi, 2005) สารสกัดด้วยน้ำ CQWS1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 และ $OH^{\cdot}$ ได้สูงสุด ขณะที่ CQWF1 สามารถต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ได้สูงสุด นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยังสัมพันธ์กับของ quercetin และ resveratrol อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า quercetin สามารถเกิด auto-oxidation โดยตัวมันเอง ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวถูกยับยั้งด้วย ascorbic acid (Lodi et al., 2008) ทั้ง quercetin และ resveratrol เคยมีรายงานว่าสกัดได้จากเพชรสังฆาต (Jainu and Mohan, 2008; Singh et al., 2007) จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CQES48 ยังคงอยู่ได้

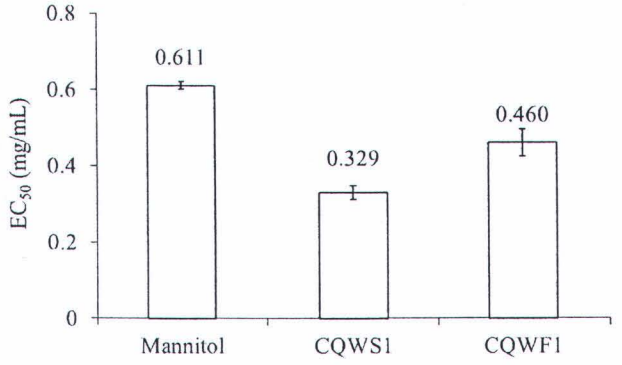
ยาผสมเพชรสังฆาตที่ระบุใน "บัญชียาจากสมุนไพร" (ประกาศ คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2554) จัดเป็นกลุ่มยาบรรเทาริดสีดวงทวารหนักและจากพยาธิสภาพของโรคริดสีดวงทวารนอกจากการอักเสบรอบทวารหนักแล้ว ยังมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระจากบริเวณเส้นเลือดฝอยรอบทวารหนักโป่งพอง (Glowinski and Glowinski, 2002; Wali et al., 2002) ดังนั้น งานวิจัยขั้นต่อไปจะทำการศึกษาฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระในเซลล์บุผิวหลอดเลือดของสารสกัดเพชรสังฆาตเปรียบเทียบกับ hesperidin และ diosmin ซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในยาแผนปัจจุบัน Daflon® สำหรับบรรเทาอาการริดสีดวงทวารเฉียบพลัน (Thanapongsathorn and Vajrabukka, 1992) ได้มีรายงานวิจัยว่า hesperidin สามารถลดอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ (EC_{50} 5.74 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) $OH^{\cdot}$ (EC_{50} 5.13 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ $NO^{\cdot}$ (EC_{50} 6.44 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในหลอดทดลอง (Kalpana et al., 2009) จึงเป็นไปได้ว่าเพชรสังฆาตซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin และ resveratrol อยู่อาจไปช่วยลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในภาวะเครียดออกซิเดชันได้

(A)

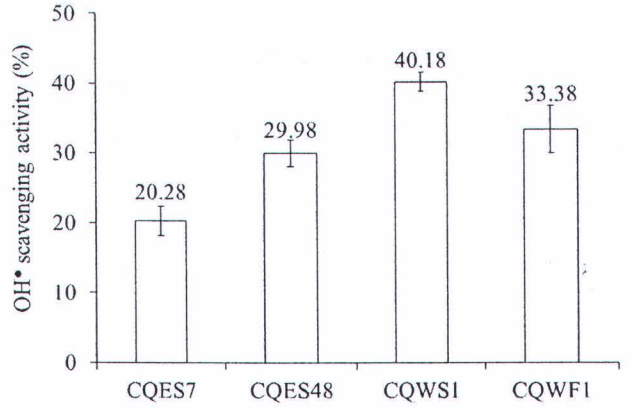


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

(B)

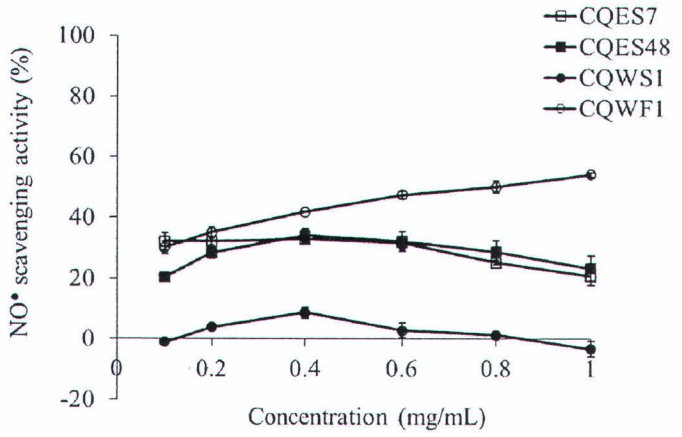


(C)

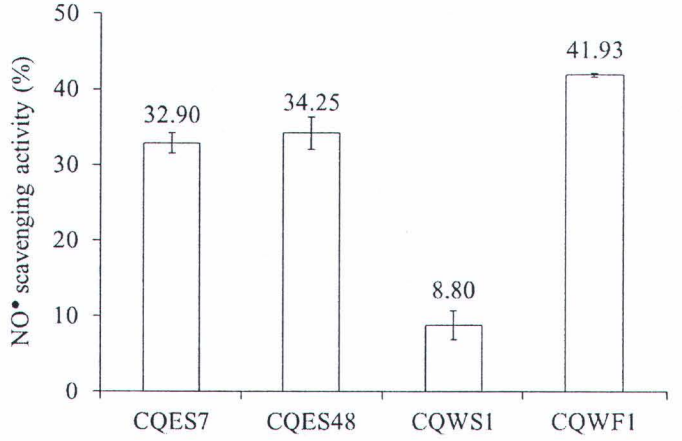


ภาพที่ 6. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ OH• ของสารสกัดเพชรสังฆาต (A) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) ค่า EC_{50} ของ CQWS1 และ CQWF1 (C) สารสกัดเพชรสังฆาตที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ mannitol เป็นกลุ่มควบคุมบวก ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

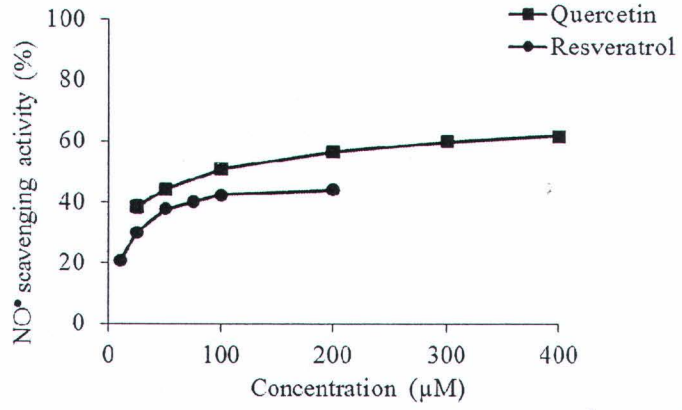
(A)



(B)



(C)



ภาพที่ 7. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO• ของสารสกัดเพชรสังฆาต (A) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และของ (C) quercetin และ resveratrol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

จากผลการทดลองพบว่าทั้ง CQES48 และ CQWS1 สามารถต้าน H_2O_2 (ภาพที่ 4) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จะคัดเลือกเฉพาะ CQES48 เป็นตัวแทนสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเอทานอล และ CQWS1 เป็นตัวแทนสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยน้ำ นำไปศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระในเซลล์บุผิวหลอดเลือด ECV304 ภายใต้ภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 เปรียบเทียบกับ quercetin และ resveratrol ซึ่งคาดว่าจะใช้เป็นตัวติดตามฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์บุผิวหลอดเลือดของสารสกัด

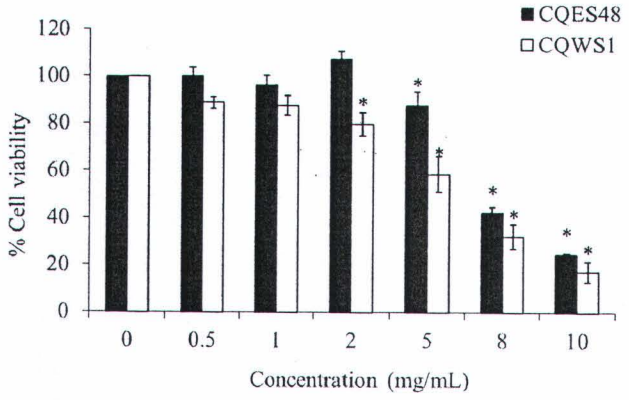
ความเป็นพิษต่อเซลล์บุผิวหลอดเลือดดำ ECV304 ด้วยวิธี MTT

ผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อการอยู่รอดของเซลล์

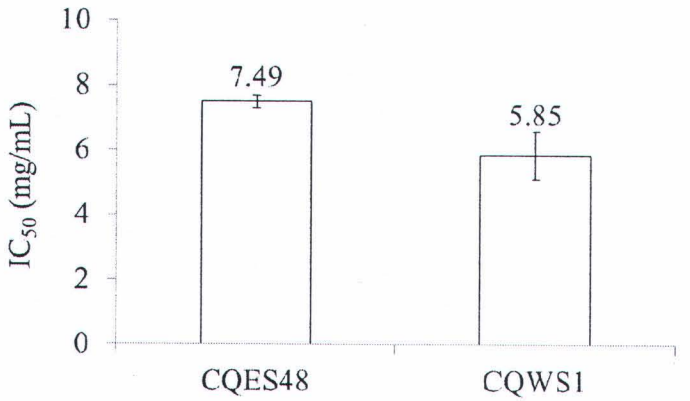
เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์บุผิวหลอดเลือดของสารสกัด จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์บุผิวหลอดเลือดดำ ECV304 จึงทำการเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง (ใกล้เคียงกับค่า doubling time 23.10 ชั่วโมง) ก่อนบ่มด้วย CQES48 หรือ CQWS1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันอีก 24 ชั่วโมง พบว่า CQWS1 และ CQES48 เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8A) โดยที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์อยู่รอด 50% (IC_{50}) เท่ากับ 5.85 ± 0.75 และ 7.49 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8B) จะเห็นได้ว่า CQWS1 เป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า CQES48 โดยที่ quercetin และ resveratrol เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 9A) ขณะที่ความเข้มข้นที่เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ของ hesperidin และ diosmin อยู่ที่ 50 และ 20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 9B) เรียงลำดับความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ดังนี้ diosmin > hesperidin > resveratrol (IC_{50} 246.37 ± 8.80 ไมโครโมลาร์) > quercetin (IC_{50} 333.16 ± 12.90 ไมโครโมลาร์) (ภาพที่ 9C) จะเห็นได้ว่า CQES48 และ CQWS1 เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ตั้งแต่ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ quercetin, resveratrol เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ตั้งแต่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์ โดยจะเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ภายใต้ภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2

นอกจากนี้ เคยมีรายงานว่าเมื่อบ่มเซลล์บุผิวหลอดเลือดแดงใหญ่ของวัวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วย quercetin ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Jackson and Venema, 2006) ขณะที่บ่มเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดฝอยของมนุษย์ด้วย resveratrol ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (Trapp et al., 2010) จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ quercetin และ resveratrol ที่เป็นพิษต่อเซลล์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์

(A)

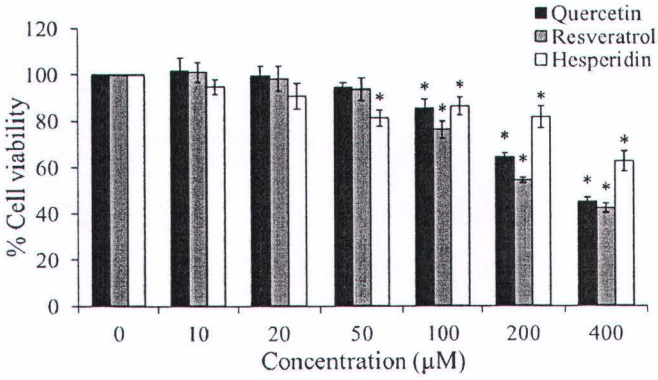


(B)

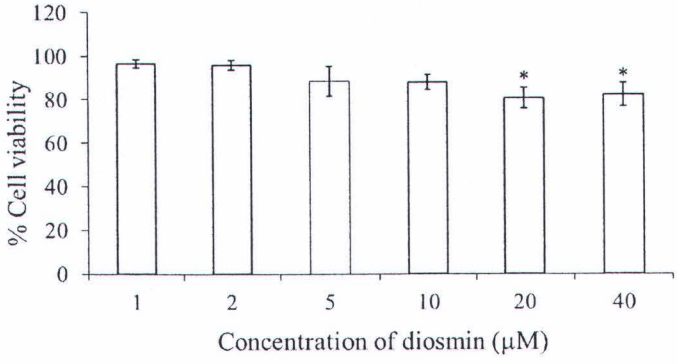


ภาพที่ 8. ความเป็นพิษของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT (A) บ่มด้วย CQES48 และ CQWS1 ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) ค่า IC_{50} ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ $*p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

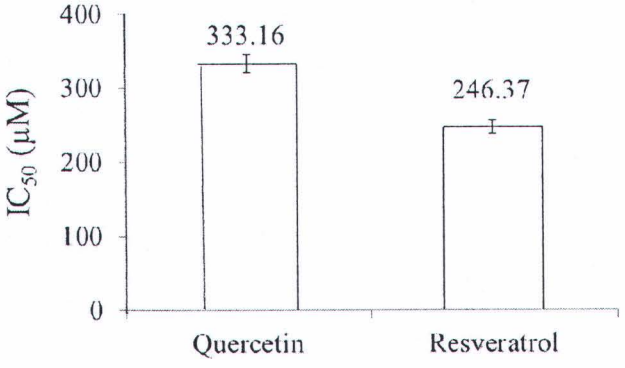
(A)



(B)



(C)



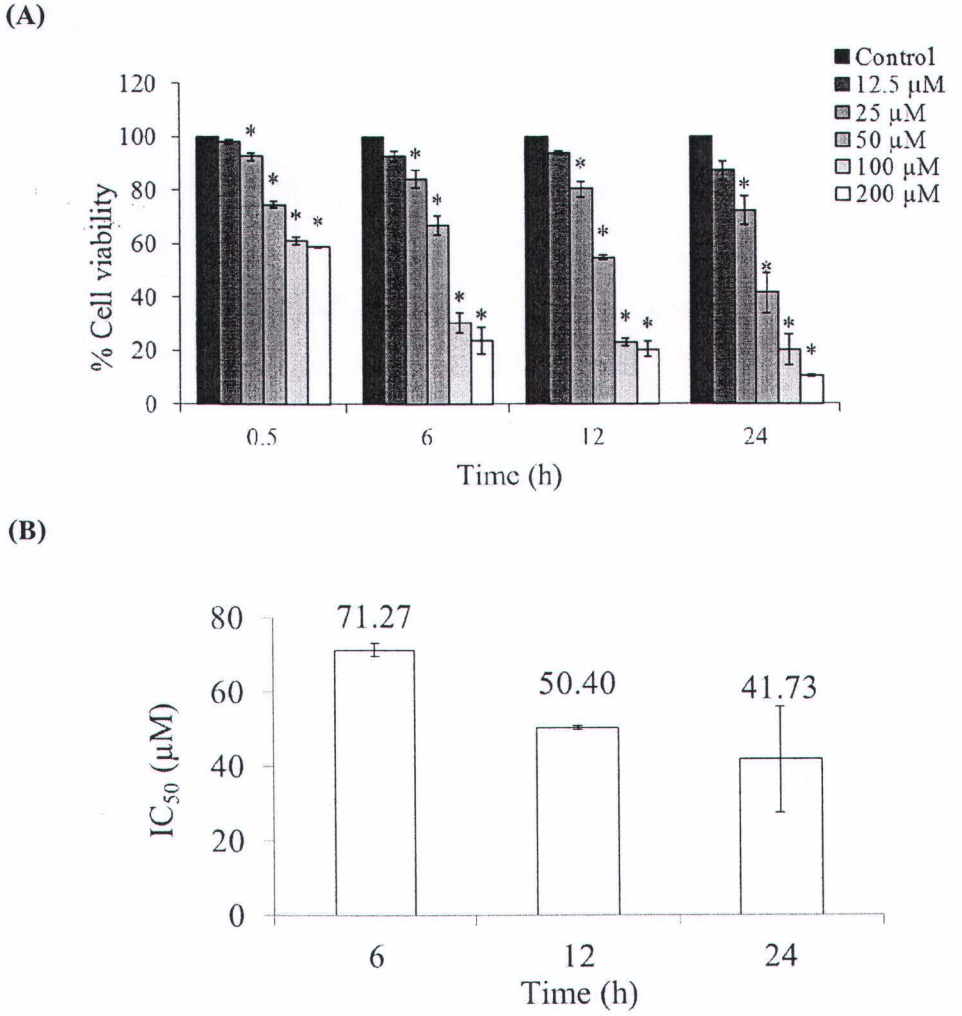
ภาพที่ 9. ความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT (A) quercetin, resveratrol และ hesperidin (B) diosmin โดยบ่มสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง (C) ค่า IC_{50} ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ *$p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลของ H_2O_2 ต่อการอยู่รอดของเซลล์

H_2O_2 จัดเป็นหนึ่งใน ROS ที่นิยมใช้ชักนำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันโดยจะใช้ความเข้มข้นและเวลาบ่มกับเซลล์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (Kosem et al., 2007; Liu et al., 2009; Wang and Huang, 2005) จากผลการทดลองพบว่าความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ ECV304 แปรผันตามความเข้มข้นและเวลาที่บ่มด้วย H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10A) โดยค่า IC_{50} เมื่อบ่มเซลล์ด้วย H_2O_2 ด้วยเวลาต่างกัน ดังนี้ เมื่อบ่มนาน 6 ชั่วโมงได้ค่า IC_{50} 71.27 ± 1.81 ไมโครโมลาร์ เมื่อบ่มนาน 12 ชั่วโมงได้ค่า IC_{50} 50.40 ± 0.53 ไมโครโมลาร์ และเมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมงได้ค่า IC_{50} 50.40 ± 0.53 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 10B) ทั้งนี้ ช่วงเวลาบ่มกับเซลล์ 0.5 ชั่วโมงไม่สามารถหาค่า IC_{50} และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีชีวิตรอด 61.15 ± 2.48 % ดังนั้น จึงใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ชักนำให้เซลล์อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันในการศึกษาต่อไป

จากรายงานวิจัยที่ศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ ECV304 พบว่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ บ่มนาน 6 ชั่วโมงทำให้เซลล์รอดชีวิต 49.7% (Kosem et al., 2007) ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ บ่มนาน 12 ชั่วโมง เซลล์รอดชีวิต 71.9% (Liu et al., 2009) และที่ความเข้มข้น 750 ไมโครโมลาร์ บ่มนาน 18 ชั่วโมง เซลล์รอดชีวิตเพียง 29.3% (Wang and Huang, 2005) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ พบว่าความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ECV304 น้อยกว่าที่ได้จากรายงานวิจัยข้างต้นอาจเป็นเพราะความหนาแน่นของเซลล์ที่เริ่มใช้เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยรายงานก่อนหน้านี้ใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเพาะเลี้ยงในเพลท 96 หลุมอยู่ที่ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่งานวิจัยนี้เริ่มต้นที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเพื่อให้เซลล์เจริญเกือบเต็มหลุม 80-90% ภายใน 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 10) จะเห็นได้ว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จำนวนเซลล์รอดชีวิตมีดังนี้ 61.15 ± 1.43% (บ่มนาน 0.5 ชั่วโมง) 30.44 ± 6.42% (บ่มนาน 6 ชั่วโมง) 23.01 ± 2.16% (บ่มนาน 12 ชั่วโมง) และ 20.30 ± 9.79% (บ่มนาน 24 ชั่วโมง) ดังนั้น H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์จะนำมาใช้ชักนำให้เซลล์อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันต่อไป

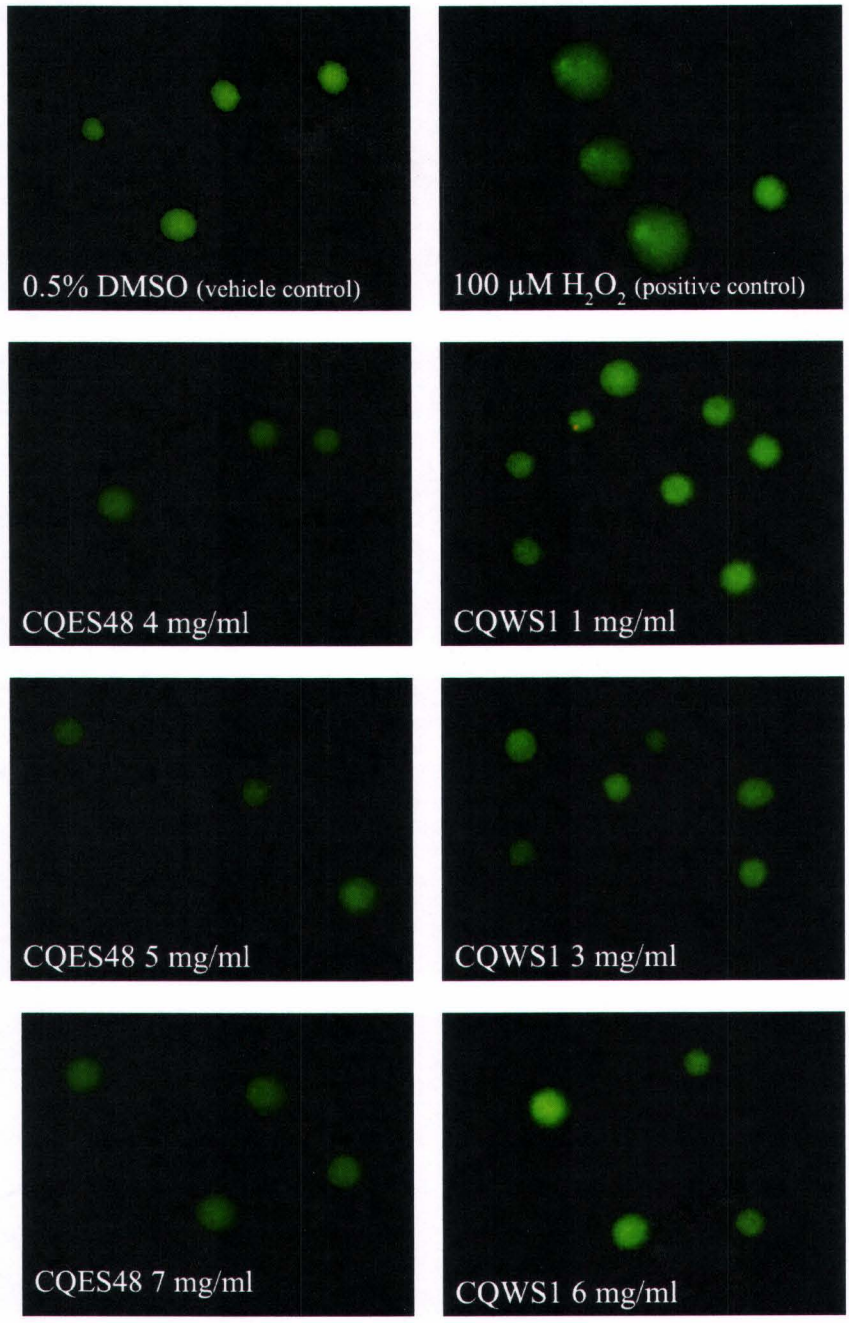


ภาพที่ 10. ความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT (A) เซลล์บ่มด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเวลาต่าง ๆ กัน (B) ค่า IC_{50} ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ $*p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อความเป็นพิษต่อยีนของเซลล์ ECV304

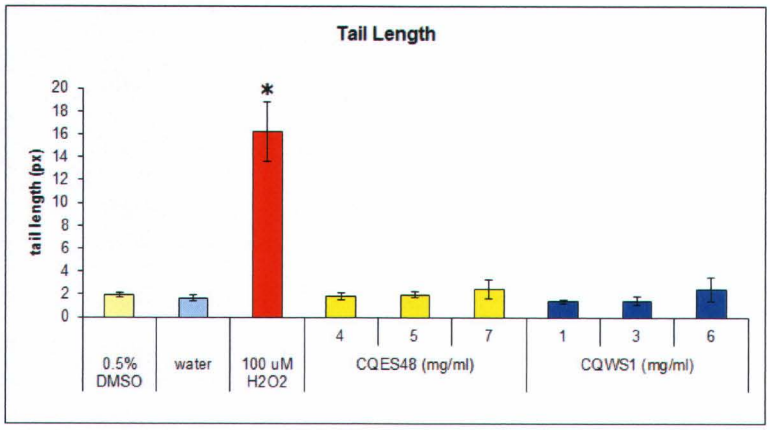
จากรายงานวิจัยที่ว่า quercetin ที่ความเข้มข้น 44 ไมโครโมลาร์ (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถทำลายดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่ CHO (Chinese hamster ovarian cells) เมื่อทดสอบด้วยวิธี chromosome aberration (Carver et al., 1983) และ quercetin เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในเพชรสังฆาต (Adesanya et al., 1999; Thakur et al., 2009) จึงได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อยีนในเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี comet ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเซลล์บ่มด้วย H_2O_2 (กลุ่มควบคุมบวก) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที สามารถสังเกตเห็น comet tail ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่แตกหักและย้อมติดสีเรืองแสง SYBR Green ฟุ้งกระจายคล้ายหางดาวหาง (ภาพที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ที่บ่มด้วย 0.5% DMSO ขณะที่สารสกัดที่ความเข้มข้นของ IC_{10}, IC_{25}, และ IC_{50} (ได้จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ภาพที่ 8) ไม่ค่อยพบหางดาวหาง หลังจากวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CometScore ได้ค่าพารามิเตอร์ที่บ่งถึงความเสียหายของดีเอ็นเอ ดังนี้ ค่า tail length เป็นความยาวของส่วนหางของ comet ค่า % DNA in tail เป็นค่าความเข้มของแสงที่ปล่อยออกมาจากดีเอ็นเอที่เสียหายตรงบริเวณ comet tail เปรียบเทียบกับความเข้มแสงของดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ และค่า tail moment เป็นผลคูณระหว่างค่า tail length และค่า % DNA in tail โดยเกณฑ์การตัดสินว่าเป็นพิษต่อยีนได้จากค่าพารามิเตอร์จะต้องแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Hastwell et al., 2006) จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่าพารามิเตอร์ tail length, % DNA in tail และ tail moment ของ CQES48 และ CQWS1 ที่ความเข้มข้น IC_{10}, IC_{25} และ IC_{50} ไม่ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12) โดยสรุป CQES48 และ CQWS1 ที่ความเข้มข้น IC_{50} ไม่มีผลกระทบต่อการเสียหายของยีนในเซลล์ ECV304

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้ กล่าวคือ เมื่อป้อนสารสกัดเพชรสังฆาตที่หมักด้วยเมทานอลนาน 48 ชั่วโมงในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาวซึ่งเป็นขนาดที่สามารถป้องกันกระเพาะอาหารอักเสบได้ พบว่าไม่มีการแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (Jainu and Devi, 2006)

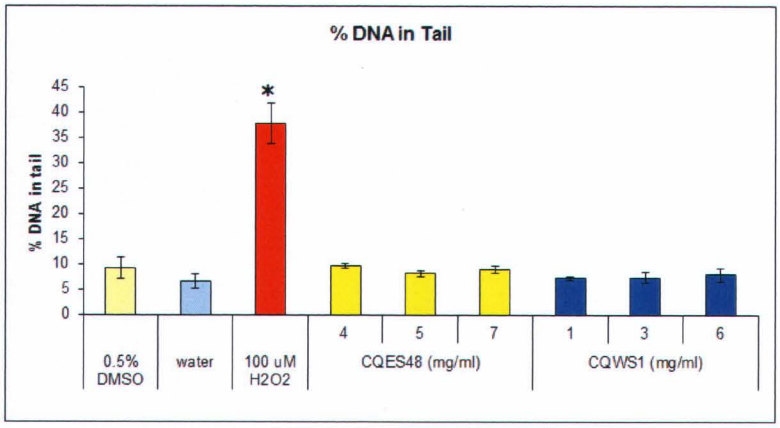


ภาพที่ 11. การทดสอบความเป็นพิษต่อยีนด้วยวิธี comet ในเซลล์ที่ได้รับ CQES48 และ CQWS1 ที่ความเข้มข้น IC_{10}, IC_{25} และ IC_{50} เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 0.5% DMSO (กลุ่มควบคุม) และ H_2O_2 (กลุ่มควบคุมบวก)

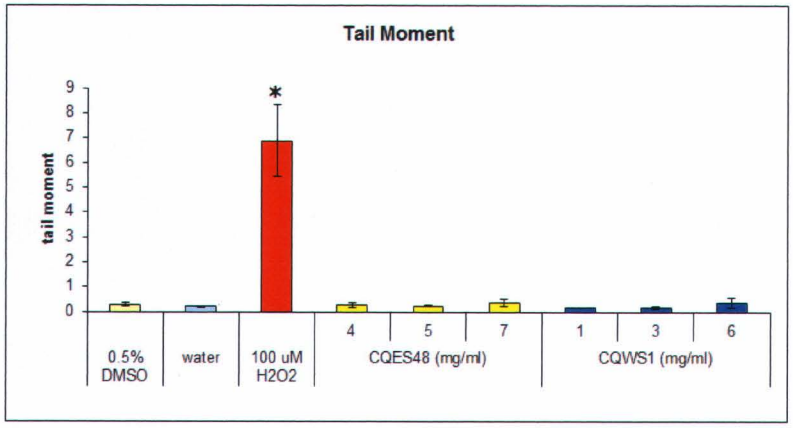
(A)



(B)



(C)



ภาพที่ 12. ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อยีนของ CQES48 และ CQWS1 ด้วยวิธี comet (A) tail length (B) % DNA in tail และ(C) tail moment ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ *$p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี DCFH-DA

ผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์

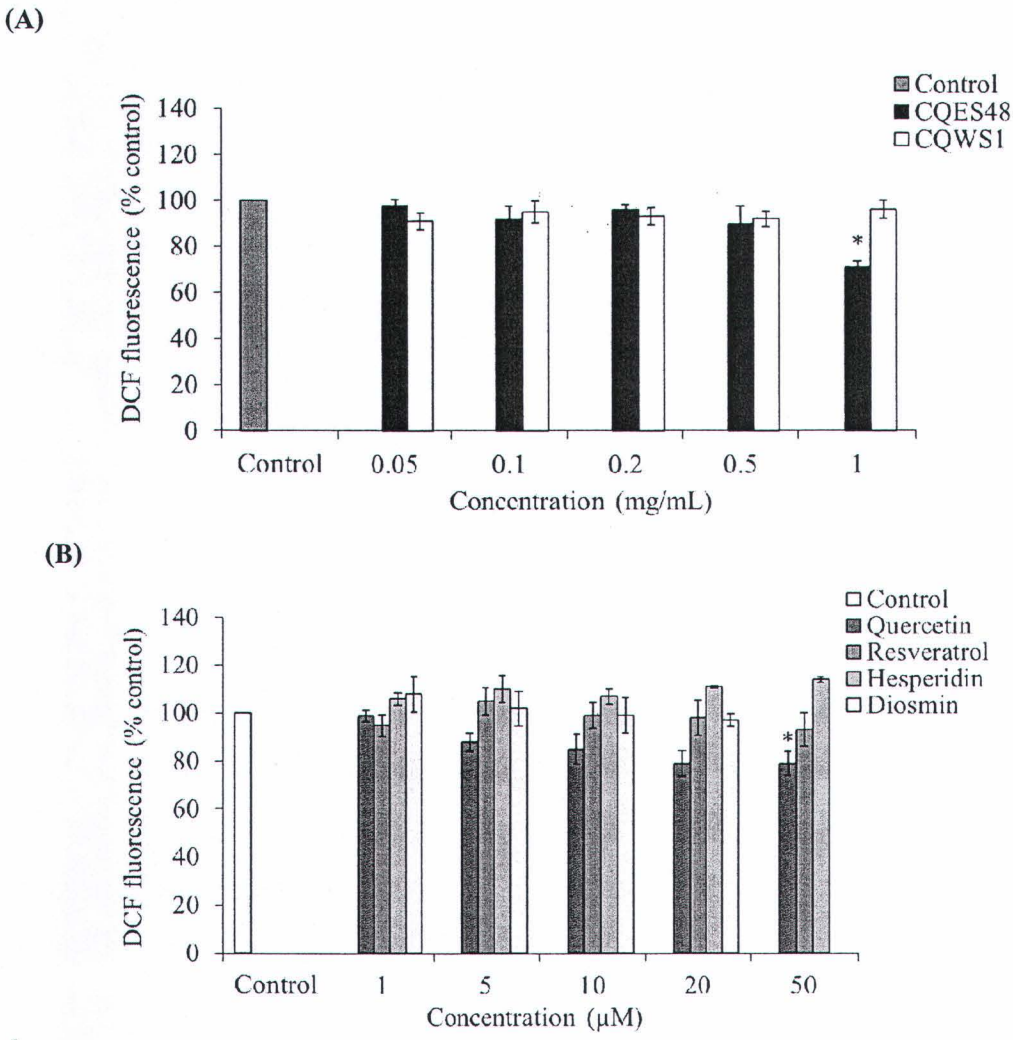
จากผลการทดลอง CQWS1 ซึ่งเป็นตัวแทนของสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยน้ำ และ CQES48 ซึ่งเป็นตัวแทนสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ได้สูงสุด ได้ค่า EC_{50} เท่ากับ 0.488 ± 0.017 และ 0.661 ± 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4B) ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวมาศึกษาว่าสามารถลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ถูกชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ได้หรือไม่ ?

จากผลทดลองวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดด้วยวิธี DCFH-DA เมื่อเซลล์ได้รับ CQES48 และ CQWS1 (ภาพที่ 13A) และ quercetin, resveratrol, hesperidin และ diosmin (ภาพที่ 13B) ในช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพที่ 8 และ 9) นาน 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์และไม่รบกวนสมดุลของเซลล์ ยกเว้น CQES48 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ quercetin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 13B)

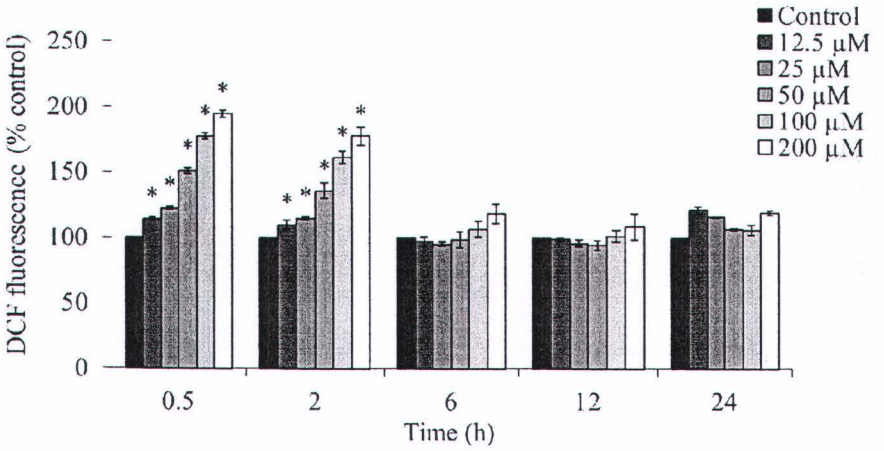
ขณะเดียวกันมีรายงานวิจัยว่าเมื่อเซลล์มะเร็งตับ HA22T/VGH และ HepG2 ได้รับ quercetin ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ นาน 72 ชั่วโมง กลับไปเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์มะเร็งตับและชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Chang et al., 2006) แสดงให้เห็นว่าความสามารถของ quercetin ในการปรับปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ โดย quercetin จะไปลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ปกติ ขณะที่ในเซลล์มะเร็ง quercetin ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและใช้เวลาบ่มมากขึ้นกลับไปเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ผลของ H_2O_2 ต่อปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์

เพื่อหาความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เซลล์อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน จึงบ่มเซลล์ด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์นาน 0.5 และ 2 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 14) ขณะที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงพบว่าปริมาณอนุมูลอิสระไม่ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากรายงานวิจัยพบว่าการเรืองแสงของสี DCF มี half-life ประมาณ 5.5 ชั่วโมง (Taguchi et al., 1996) ซึ่งขั้นตอนการทดลองในงานวิจัยของเราได้บ่มเซลล์ด้วยสีย้อมก่อนได้รับ H_2O_2 นานมากกว่า 6 ชั่วโมง จึงทำให้ไม่สามารถวัดการเรืองแสงของสีดังกล่าวได้



ภาพที่ 13. การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี DCFH-DA (A) เซลล์ได้รับ CQES48, CQWS1 (B) quercetin, resveratrol, hesperidin และ diosmin นาน 24 ชั่วโมง ตามด้วยบ่มกับสี DCFH-DA 5 ไมโครโมลาร์ นาน 30 นาที ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ *$p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 14. การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ H_2O_2 เซลล์บ่มกับสี DCFH-DA 5 ไมโครโมลาร์ นาน 30 นาที ตามด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ นาน 0.5, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ *$p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

โดยสรุป เมื่อบ่มเซลล์ด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์นาน 0.5 ชั่วโมง ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (ภาพที่ 14) และเซลล์รอดชีวิตประมาณ 61.15 ± 1.43 % (ภาพที่ 10A) ซึ่งจะนำมาใช้ในการชักนำให้เซลล์อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันต่อไป

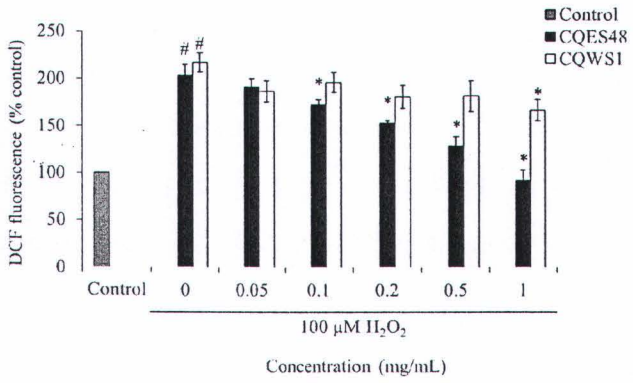
ผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2

จากผลการทดลองทั้ง CQES48 (EC_{50} 0.661 ± 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) CQWS1 (EC_{50} 0.488 ± 0.017 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ quercetin (EC_{50} 46.34 ± 2.28 ไมโครโมลาร์) มีฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ในหลอดทดลอง (ภาพที่ 4, 5) จึงศึกษาต่อไปว่าจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ถูกชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ได้หรือไม่? เมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนบ่มสีย้อมและตามด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 30 นาที พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเริ่มลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 15A) และได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 แต่เพียงอย่างเดียวเมื่อ CQES48 ใช้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ CQWS1 ต้องใช้ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปอร์เซ็นต์การลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ CQES48 เท่ากับ 112.02 ± 11.93% และ CQWS1 เท่ากับ 50.09 ± 3.42% (ภาพที่ 15B) แสดงให้เห็นว่า CQES48 ลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ได้ดีกว่า CQWS1

สำหรับ quercetin และ resveratrol (5 ไมโครโมลาร์) สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 15C) ขณะที่ diosmin ต้องใช้ความเข้มข้นถึง 10 ไมโครโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าทั้ง quercetin และ resveratrol สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ได้ดีกว่า diosmin ประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้ diosmin และ hesperidin ใช้เป็นยารักษาโรคริดสีดวงทวาร (Daflon® 500 มิลลิกรัมประกอบด้วย diosmin 450 มิลลิกรัมและ hesperidin 50 มิลลิกรัม) (Bouskela et al., 1997; Sarabia et al., 2001)

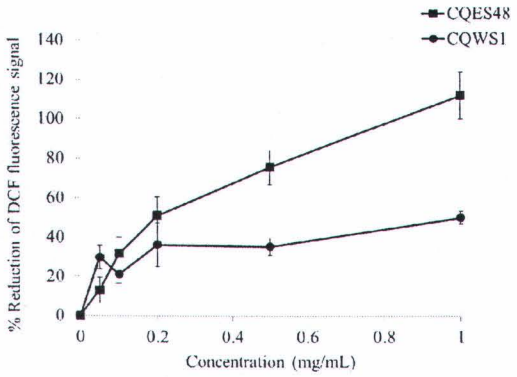
มีรายงานว่า quercetin (1 ไมโครโมลาร์) ไปลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ mouse fibroblast ที่ชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 เช่นกัน (Shirai et al., 2002) ขณะที่ resveratrol ต้องใช้ถึง 100 ไมโครโมลาร์ภายในเซลล์ HUVEC บ่มเพียง 1 ชั่วโมง (Liu et al., 2003) diosmin สามารถลดการสร้าง H_2O_2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Cypriani et al., 1993) และ hesperidin (10 ไมโครโมลาร์) สามารถลดอนุมูลอิสระในเซลล์ HUVEC (Chiou et al., 2008) และเซลล์ PC12 (Hwang and Yen, 2008) ที่ได้รับ H_2O_2 ขณะที่งานวิจัยนี้ hesperidin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวกลับไม่มีผลไปลดอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 แต่อย่างใด

(A)

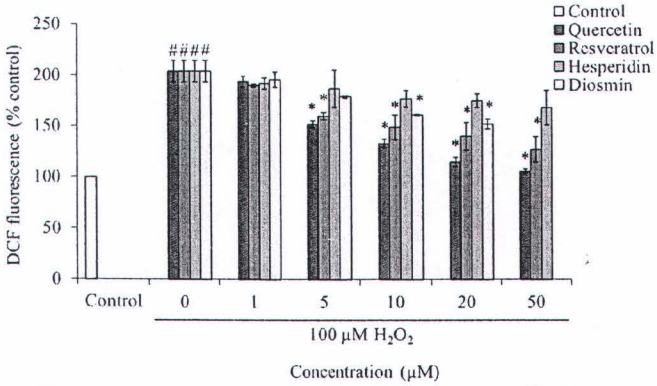


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

(B)



(C)



ภาพที่ 15. การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับสารทดสอบนาน 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับ H_2O_2 100 ไมโครโมลาร์ ตามด้วยสีย้อม DCFH-DA (A) สารสกัด CQES48 และ CQWS1 (B) เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (C) quercetin, resveratrol, hesperidin และ diosmin ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ $^{\#}$ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อวัดด้วยวิธี MTT (IC_{50}) และความสามารถในการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อวัดด้วยวิธี DCFH-DA (EC_{50}) โดยวิเคราะห์ค่า IC_{50} : EC_{50} พบว่า CQES48 ค่อนข้างปลอดภัยต่อเซลล์มากกว่า CQWS1 นอกจากนี้ quercetin และ resveratrol ซึ่งอาจเป็นสารสำคัญใน CQES48 นับว่าค่อนข้างปลอดภัยต่อเซลล์เช่นกัน (ตารางที่ 3)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของสารสกัดเพชรสังฆาต ดังนั้น การที่ CQES48 สามารถลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้ดีกว่า CQWS1 อาจเป็นเพราะใน CQES48 มี quercetin, resveratrol จึงแพร่เข้าเซลล์ ECV304 ได้ดีกว่า quercitrin และ iso-quercitrin ซึ่งเป็นไกลโคไซด์ใน CQWS1 (Murota and Terao, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าเพชรสังฆาตในยาสามัญประจำบ้านแผนโบราณสำหรับรักษาริดสีดวงทวารได้นั้น อาจเป็นผลมาจากสารสำคัญ quercetin และ resveratrol ดังนั้น จึงเลือกเฉพาะ CQES48 เป็นตัวแทนสารสกัดที่จะนำมาใช้ในการศึกษากลไกการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 โดยเน้นวิถีการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, catalase ที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ รวมทั้ง eNOS และ iNOS เพื่อรักษาสมดุลให้หลอดเลือดคลายตัว (Diaz et al., 1997; Nordberg and Arner, 2001; Østerud and Bjørklid, 2003)

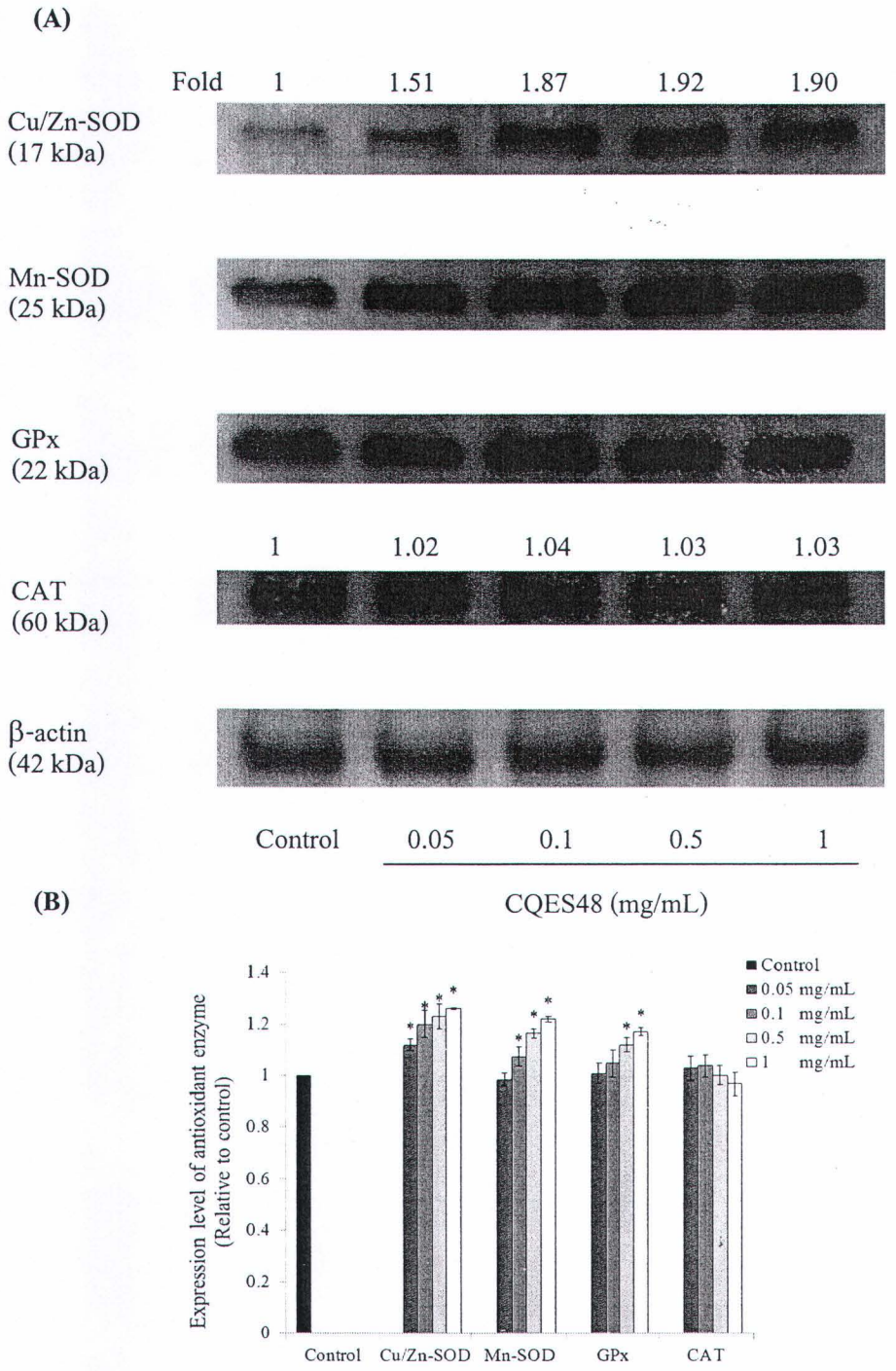
การศึกษากลไกการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี Western blotting

ผลของสารสกัดเพชรสังฆาต quercetin และ resveratrol ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blotting ในเซลล์ได้รับ CQES48 นาน 24 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD และ GPx เพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด (ภาพที่ 16) ส่งผลให้ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลงตามไปด้วย (ภาพที่ 13A) โดยสังเกตว่า CQES48 ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไปเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ Cu/Zn-SOD ในไซโตซอลและเมื่อความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยังไปเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ Mn-SOD ในไมโตคอนเดรียอีกด้วยและเมื่อความเข้มข้นเพิ่มเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ GPx ในไซโตซอลและไมโตคอนเดรีย ทั้งนี้ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ CAT ซึ่งอยู่ใน peroxisome แต่อย่างใด

ตารางที่ 3. การเปรียบเทียบระหว่างความเป็นพิษต่อเซลล์ ECV304 และความสามารถในการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของ CQES48, CQWS1, quercetin, resveratrol, hesperidin และ diosmin

สาร	IC_{50}	EC_{50}	$IC_{50} : EC_{50}$
CQES48 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	7.49 ± 0.20	0.23 ± 0.08	32.57
CQWS1 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	5.85 ± 0.75	> 1	> 5.85
Quercetin (ไมโครโมลาร์)	246.37 ± 8.80	4.87 ± 0.17	50.59
Resveratrol (ไมโครโมลาร์)	333.16 ± 12.90	8.04 ± 0.24	41.44
Hesperidin (ไมโครโมลาร์)	> 400	> 50	> 8
Diosmin (ไมโครโมลาร์)	> 40	> 20	> 2



ภาพที่ 16. การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย CQES48 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx และ CAT (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อบ่มเซลล์ด้วย quercetin ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเกือบเท่าค่า EC_{50} ของฤทธิ์ต้าน H_2O_2 scavenger (ภาพที่ 5B) หรือ resveratrol (5 ไมโครโมลาร์) นาน 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, CAT (ภาพที่ 17) ได้มากกว่า 20% โดยที่ H_2O_2 (100 ไมโครโมลาร์) บ่มนาน 6 ชั่วโมง ซึ่งชักนำให้เซลล์อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นไปลดการแสดงออกของ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD และ GPx ยกเว้น CAT (ภาพที่ 18B)

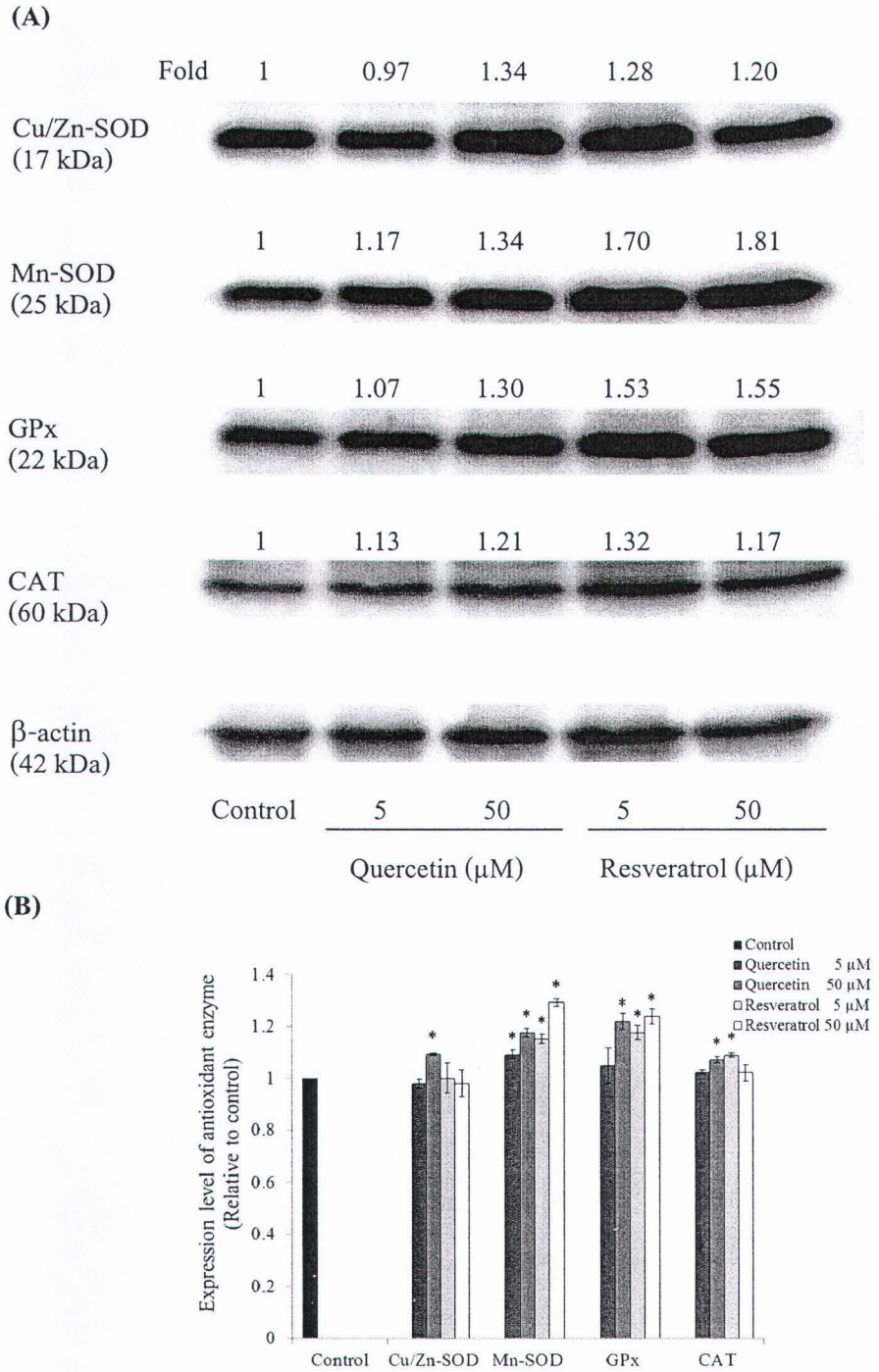
ผลของสารสกัดเพชรสังฆาต quercetin และ resveratrol ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2

เมื่อบ่มเซลล์ด้วย CQES48 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 นาน 6 ชั่วโมง พบว่า CQES48 (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำให้การแสดงออกของ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD และ GPx เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 เพียงลำพัง (ภาพที่ 18A) และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ปกติ (ภาพที่ 18B) จะเห็นได้ว่าใกล้เคียงกับค่า EC_{50} ของฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ที่ได้จากการทดสอบในหลอดทดลองเท่ากับ 0.661 ± 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4B)

ภาวะชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 กลับเข้าสู่ภาวะปกติได้ในเซลล์ที่ได้รับ quercetin และ resveratrol ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยวิเคราะห์จากการแสดงออกของ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD และ GPx ย้อนกลับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 และกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 19A)

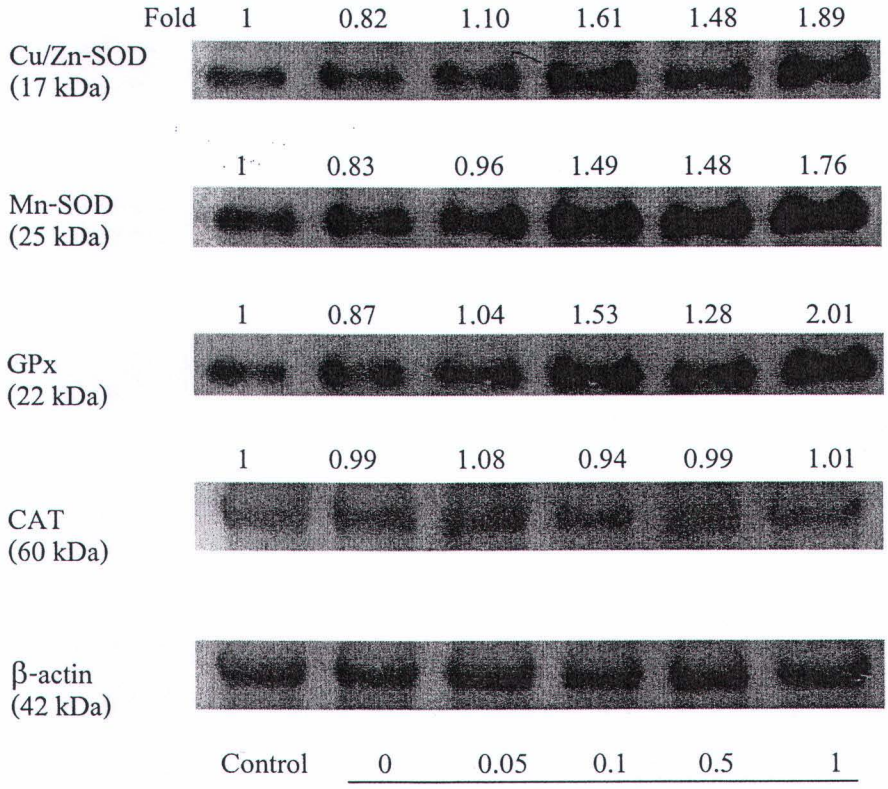
ทั้งกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ CQES48 ร่วมกับ H_2O_2 (ภาพที่ 18) หรือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol ร่วมกับ H_2O_2 (ภาพที่ 19) หรือกลุ่มเซลล์ได้รับ CQES48 ตามลำพัง (ภาพที่ 16A) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ CAT อาจเป็นเพราะเอนไซม์ CAT จะเข้ามากำจัดอนุมูลอิสระเมื่อปริมาณ GSH และ GPx ในเซลล์มีจำกัด (Wassmann et al., 2004) แต่จากผลการทดลองพบว่า CQES48, quercetin และ resveratrol สามารถไปเพิ่มการแสดงออกของ GPx ได้อยู่ จึงทำให้ CAT ยังไม่ได้เข้ามามีบทบาท

จึงเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระโดย CQES48 อาจเป็นผลมาจาก quercetin และ resveratrol ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 (Cheng et al., 2004; Yokomizo and Moriwaki, 2006) โดยไปเพิ่มการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Amália et al., 2007; Galisteo et al., 2004; Jackson et al., 2010; Lee et al., 2003; Lin et al., 2007; Spanier et al., 2009; Zhang et al., 2010)

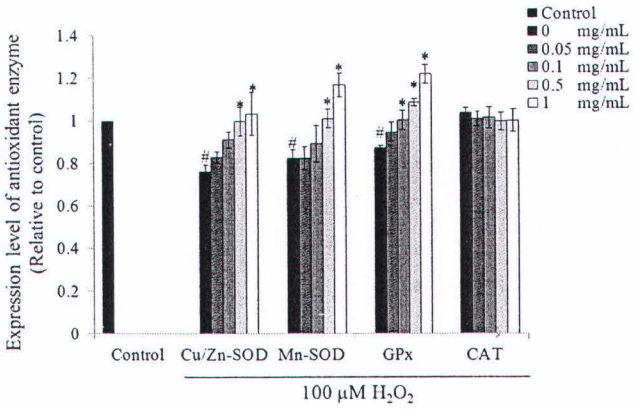


ภาพที่ 17. การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย quercetin หรือ resveratrol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx และ CAT (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

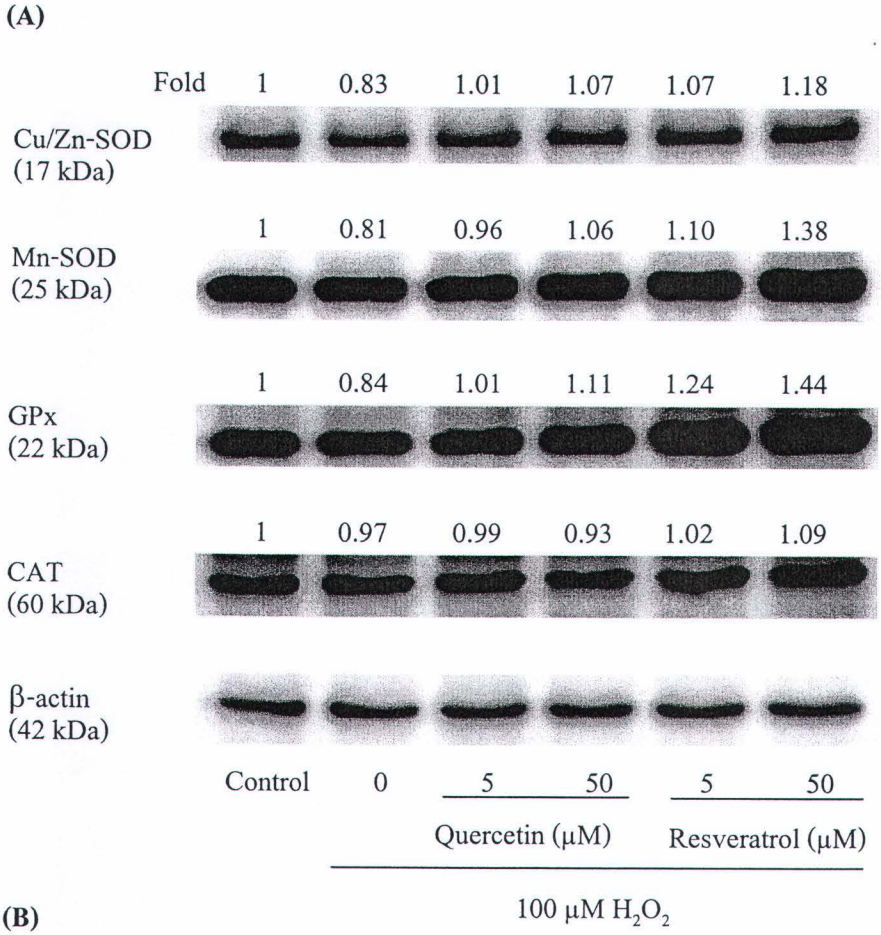
(A)



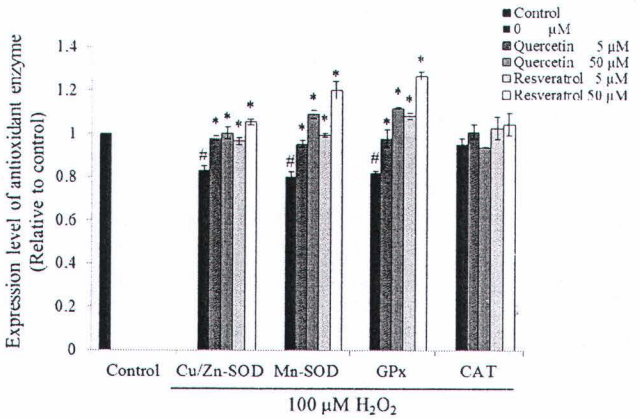
(B)



ภาพที่ 18. การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย CQES48 นาน 24 ชั่วโมงตามด้วย H_2O_2 100 ไมโครโมลาร์ อีก 6 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx และ CAT (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง $^{\#}$ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 เพียงลำพัง



(B)



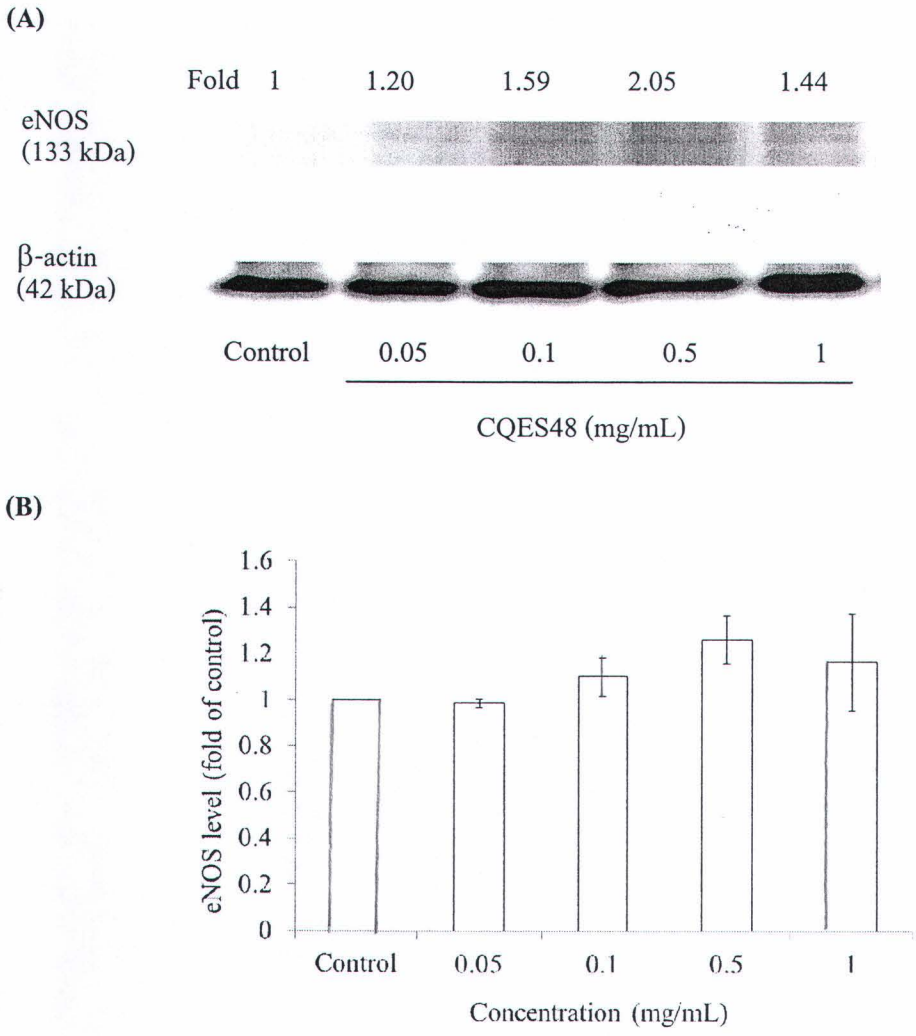
ภาพที่ 19. การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย quercetin หรือ resveratrol นาน 24 ชั่วโมงตามด้วย H_2O_2 100 ไมโครโมลาร์ อีก 6 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx และ CAT (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง $^{\#}$ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 เพียงลำพัง

ผลของสารสกัดเพชรสังฆาต quercetin และ resveratrol ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ NOS

เอนไซม์ eNOS จัดเป็น house-keeping enzyme ในเซลล์บุผิวหลอดเลือดมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสร้าง NO ซึ่งไปทำให้หลอดเลือดคลายตัวและช่วยต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Loscalzo, 2001) แต่การแสดงออก eNOS จะลดลงเมื่อเซลล์บุผิวหลอดเลือดอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน (Bao and Lou, 2006) ซึ่งในภาวะเครียดดังกล่าว iNOS จะเข้ามามีบทบาท (Chen et al., 2002; Gosgnach et al., 2000) นำไปสู่การสร้าง NO มากเกินไปจนมีการสะสมอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ จนเป็นพิษต่อเซลล์บุผิวหลอดเลือด (Achike and Kwan, 2003) จากผลทดลองพบว่า CQES48 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถต้าน $NO^{\cdot}$ ได้ 34.25 ± 2.14% (ภาพที่ 7B) ขณะที่ quercetin ให้ค่า EC_{50} 97.69 ± 14.46 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 7C) ดังนั้น จะได้ศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อการแสดงออกโปรตีนของ eNOS และ iNOS

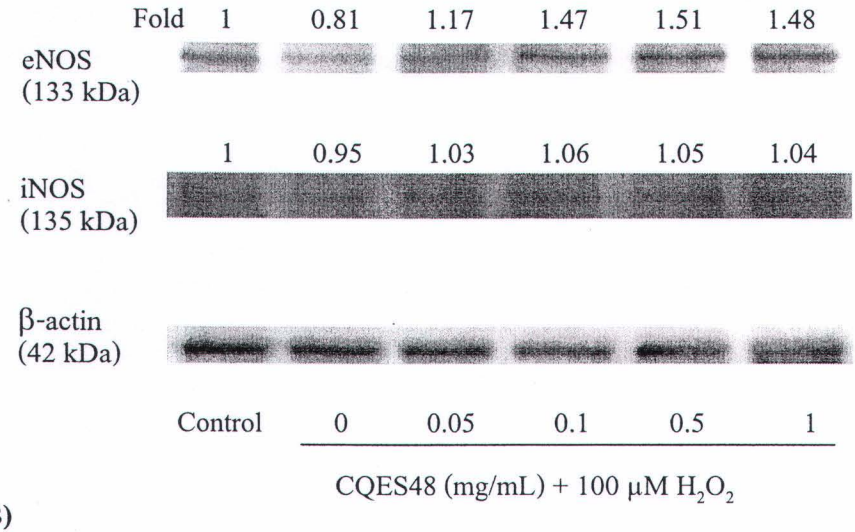
เมื่อบ่มเซลล์ด้วย CQES48 นาน 24 ชั่วโมงแทบไม่มีผลต่อการแสดงออกของ eNOS (ภาพที่ 20) แต่เมื่อเซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 จะทำให้การแสดงออกของ eNOS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 21B) และเมื่อให้เซลล์ได้รับ CQES48 นาน 24 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 นาน 6 ชั่วโมง พบว่า แม้ CQES48 ที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 มิลลิกรัมก็สามารถทำให้การแสดงออกของ eNOS กลับมาเป็นปกติได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ขณะที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์บุผิวหลอดเลือด ECV304 (ภาพที่ 21) และผลการทดลองของ CQES48 ยังสอดคล้องกับผลของ quercetin และ resveratrol ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ สามารถทำให้การแสดงออกของ eNOS กลับมาเป็นปกติได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 โดยไม่มีผลต่อ iNOS (ภาพที่ 22) เช่นกัน

การแสดงออกของ iNOS มักเข้ามีบทบาทในกระบวนการอักเสบที่ถูกชักนำด้วย interleukin-1β (Mendes et al., 2003) TNF-α (Xia et al., 2006) ซึ่งหลั่งออกจากเซลล์ macrophage และจะกลับเข้าสู่ระดับปกติเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น quercetin (Ciz et al., 2008) มีรายงานว่าสารสกัดเพชรสังฆาตด้วย ethyl acetate สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์ macrophage (RAW 264.7) ที่ชักนำด้วย LPS (Srisook et al., 2010) และสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS ในผนังกระเพาะอาหารหนูขาวที่ได้รับแอสไพริน (Jainu and Devi, 2006) จึงเป็นไปได้ว่าภาวะความเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ในเซลล์ ECV304 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ iNOS เมื่อเทียบกับ LPS

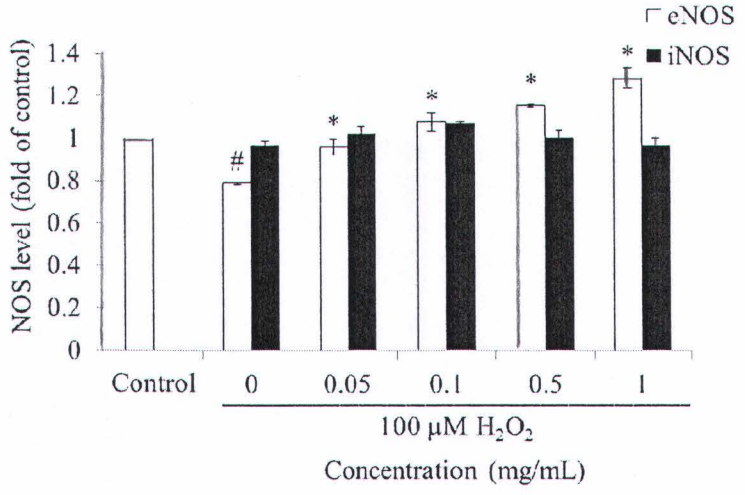


ภาพที่ 20. การแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย CQES48 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ eNOS (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง

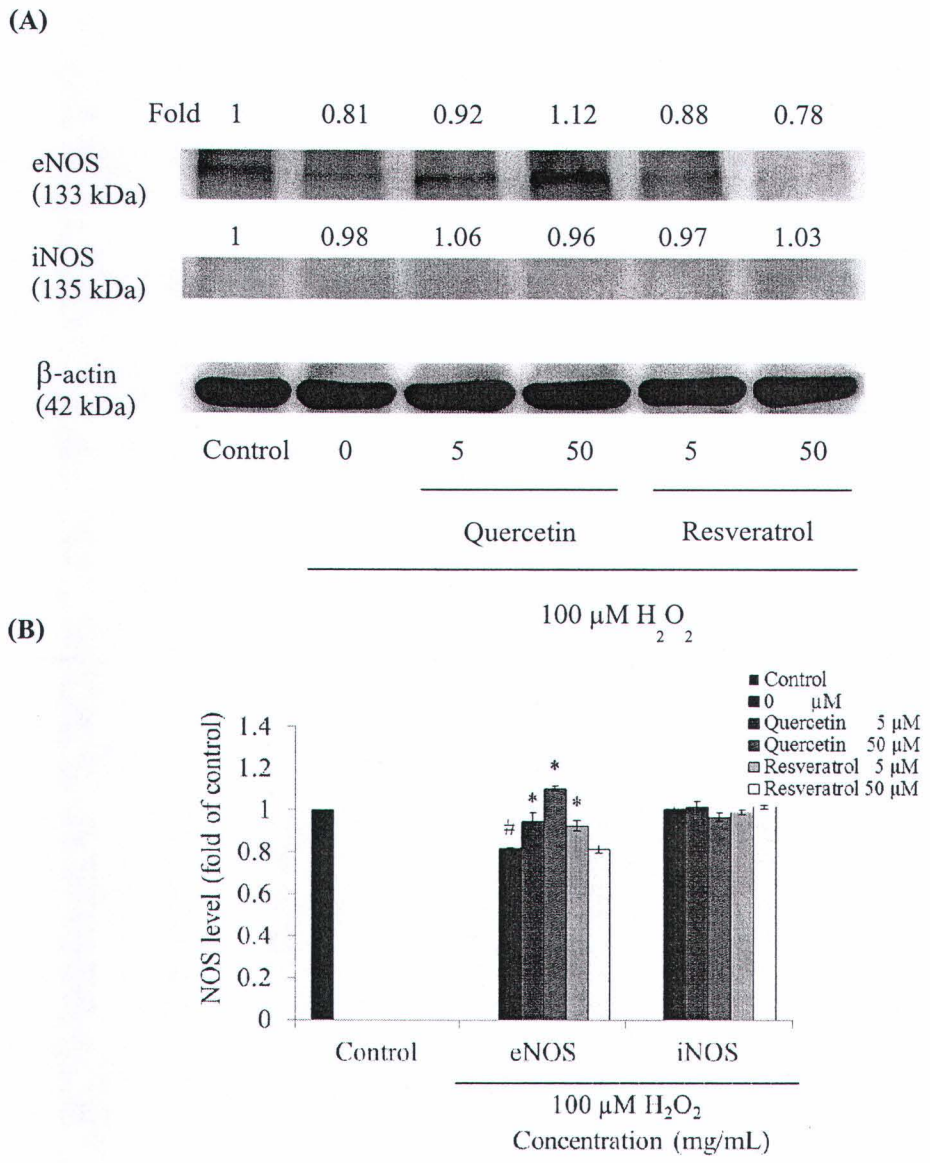
(A)



(B)



ภาพที่ 21. การแสดงออกของเอนไซม์ eNOS และ iNOS ในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย CQES48 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมงตามด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อีก 6 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ eNOS และ iNOS (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 เพียงลำพัง



ภาพที่ 22. การแสดงออกของเอนไซม์ eNOS และ iNOS ในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มเซลล์ด้วย quercetin หรือ resveratrol ที่ความเข้มข้น 5 และ 50 ไมโครโมลาร์นาน 24 ชั่วโมงตามด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อีก 6 ชั่วโมง (A) แถบเอนไซม์ eNOS และ iNOS (B) ความเข้มของแถบเอนไซม์เปรียบเทียบกับ β-actin โดยให้โปรตีนจากกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับ 1 ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 เพียงลำพัง

ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของสารสกัดเพชรสังฆาต

จากรายงานวิจัยว่า NO สามารถต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ (Loscalzo, 2001) อีกทั้งผลการทดลองพบว่า CQES48 ไปเพิ่มการแสดงออกของ eNOS ในเซลล์ปกติได้บ้าง (ภาพที่ 20A) และในเซลล์ที่อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 21B) ทำให้สร้าง NO เพิ่มขึ้นที่อาจส่งผลไปต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (Loscalzo, 2001) จึงเป็นไปได้ว่า CQES48 อาจไปมีผลต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเช่นกัน โดยการศึกษาฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด เริ่มแรกต้องหาความเข้มข้นของ ADP ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น agonist กระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดอาสาสมัครแต่ละรายซึ่งมักแตกต่างกัน (ภาพที่ 23) เมื่อได้ความเข้มข้น ADP ที่เหมาะสมสำหรับคัดกรองฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของสารสกัดเพชรสังฆาตที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มกับเกล็ดเลือด (PRP) นาน 5 นาทีก่อนกระตุ้นให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกันด้วย ADP โดยใช้แอสไพริน 500 ไมโครโมลาร์เป็นกลุ่มควบคุมบวก

ผลการทดสอบของสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP เพียงเล็กน้อย 2.65 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (ภาพที่ 24) อย่างไรก็ตามเพื่อไม่ให้เกิดเหตุการณ์ซ้ำรอยกับกรณีศึกษาพบปัญหาเลือดไหลไม่หยุดในผู้สูงอายุที่รับประทานผลิตภัณฑ์ใบแปะก๊วยอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ยังต้องทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อใช้ตัวกระตุ้นชนิดอื่นนอกเหนือจาก ADP เช่น arachidonic acid, collagen, thrombin และ epinephrine ต่อไป

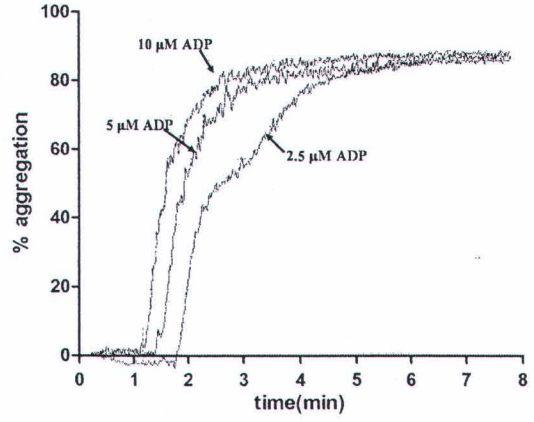
HPLC profile ของสารสกัดเพชรสังฆาตที่สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์

จากการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธี TLC พบว่ามี quercetin ใน CQES7 เท่ากับ 1.82 ± 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด (ตารางที่ 2) โดยที่ CQES48 ได้ถูกคัดเลือกมาศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 พบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ของ quercetin และ resveratrol จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งสองชนิดใน CQES48 ด้วยวิธี HPLC พบ quercetin และ resveratrol บนโครมาโทแกรมที่ค่า retention time เท่ากับ 15.19 และ 13.64 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 25) วิเคราะห์หาปริมาณ quercetin ได้เท่ากับ 0.0763 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดและปริมาณ resveratrol เท่ากับ 0.0026 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวิธีวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าปริมาณ quercetin ใน CQES7 ได้เท่ากับ 1.82 ± 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด (ตารางที่ 2) นั้นมีค่าสูงกว่าวิธีวิเคราะห์ของ CQES48 ด้วย HPLC ทั้งที่ CQES7 ใช้เวลาสกัดน้อยกว่า เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่ามีความถูกต้องแม่นยำน้อยกว่าวิธี HPLC อีกทั้งมีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ในสาร

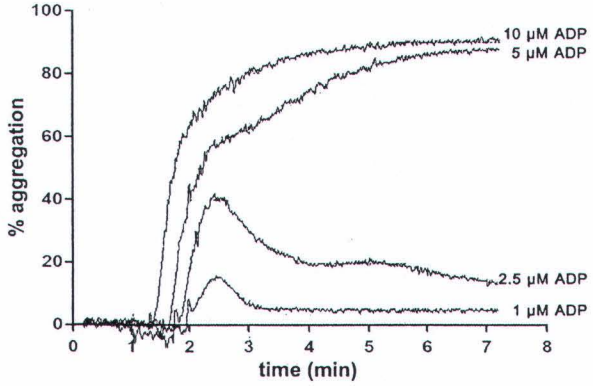
สกัดเพชรสังฆาตที่มีค่า R_f และช่วงความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ quercetin ส่งผลให้การวิเคราะห์ quercetin ใน CQES7 ด้วยวิธี TLC ได้ปริมาณสูงกว่าวิธีวิเคราะห์ CQES48 ด้วยวิธี HPLC

โดยสรุป สารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระกลับเป็นปกติได้ภายในเซลล์ ECV304 ที่ชักนำให้อยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 (ภาพที่ 15A) โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปเพิ่มการแสดงออกเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD และ GPx (ภาพที่ 18) และเอนไซม์ eNOS (ภาพที่ 21) โดยสัมพันธ์กับกลไกการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของ quercetin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (1.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ resveratrol (1.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 15B, 19, 22) นอกจากนี้ CQES48 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ECV304 (ภาพที่ 8) และไม่เป็นพิษต่อยีน (ภาพที่ 11) เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับโพรไฟล์ (ภาพที่ 25) พบว่า CQES48 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นจะมีปริมาณ quercetin อยู่ 0.00763 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ resveratrol อยู่ 0.00026 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า นอกจาก quercetin และ resveratrol ในสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 แล้วยังอาจมีสารชนิดอื่นร่วมกันออกฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์แบบเสริมฤทธิ์กันอยู่ (synergism) ตัวอย่างเช่น ascorbic acid ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่าพบในสารสกัดเพชรสังฆาต โดยป้องกันไม่ให้กระเพาะอาหารของหนูขาวถูกทำลายด้วยแอสไพริน (Jainu and Mohan, 2008) โดยฤทธิ์ที่เสริมกันนั้นอาจมาจากบทบาทของ ascorbic acid ใน CQES48 ที่ไปยับยั้งการเกิด auto-oxidation ของ quercetin ไม่ให้สลายตัว (Lodi et al., 2008)

(A)

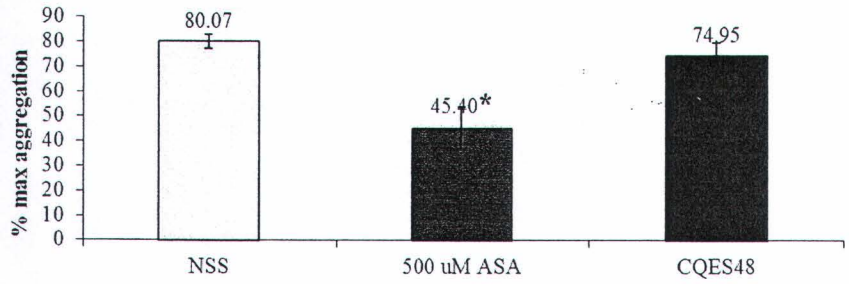


(B)

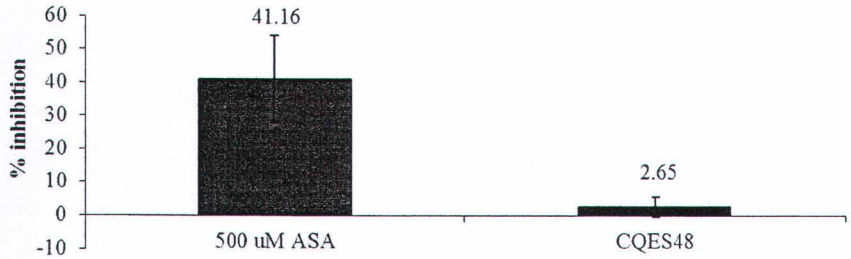


ภาพที่ 23. Aggregation trace ของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นให้เกาะกลุ่มกันด้วย ADP ความเข้มข้น 1 - 10 ไมโครโมลาร์ (A) เกล็ดเลือดของอาสาสมัครคนที่ 1 (B) เกล็ดเลือดของอาสาสมัครคนที่ 2 (การทดลอง 1 ครั้ง)

(A)

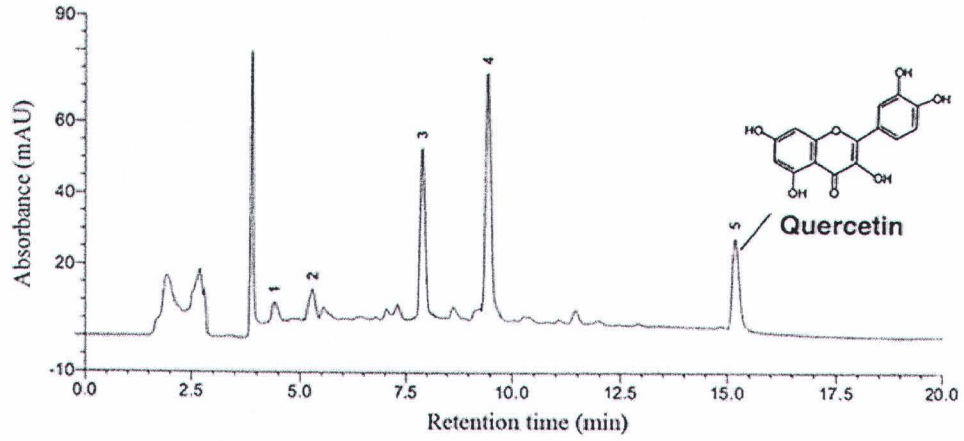


(B)

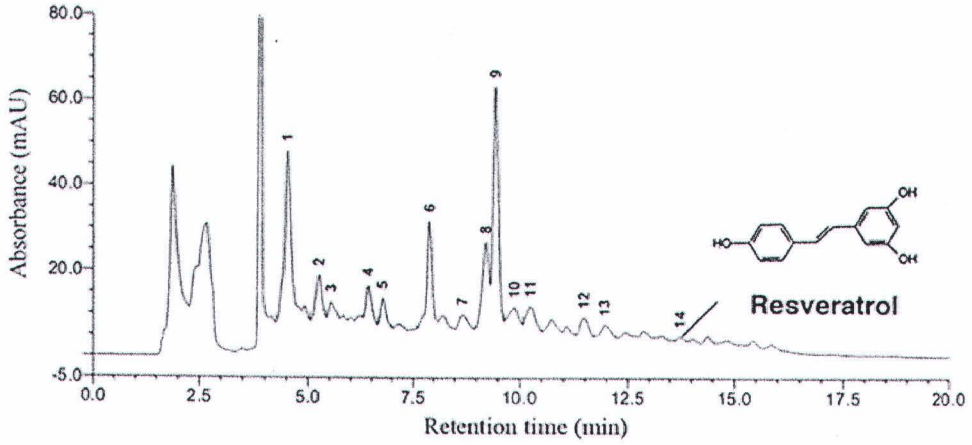


ภาพที่ 24. ผลของ CQES48 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ (A) % maximal aggregation (B) % inhibition ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ของการทดลอง 3 ครั้ง * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

(A)



(B)



ภาพที่ 25. โครมาโทแกรมของสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ในคอลัมน์ C_{18} เฟสเคลื่อนที่ระบบ gradient ประกอบด้วยตัวทำละลาย (1) acetonitrile และตัวทำละลาย (2) 0.3% formic acid อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดที่ความยาวคลื่น (A) 370 นาโนเมตร และ (B) 307 นาโนเมตร