

RESEARCH ARTICLE

Antioxidant Activities of *Vernonia cinerea* L. Extract in Endotoxin and Cytokine Stimulated Macrophages

Sarinya Kumpunya¹, Sakonwun Praputbut^{1,2}

¹ Pharmacology Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

² Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

Abstract

Macrophages are innate immune cells that play a major role in activation of inflammatory processes to eliminate microorganisms, toxins and invading substances, by generating free radicals; nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) and proinflammatory mediators. *Vernonia cinerea* L. is one of the herbal plants that has been used in local remedies for various inflammatory diseases. The aim of this study was to investigate the antioxidant activities of *Vernonia cinerea* extract in macrophages stimulated with endotoxin and cytokines. Macrophage cell lines (RAW264.7) treated with lipopolysaccharides (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) increased NO/ROS productions as well as enhanced protein synthesis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzymes. The results showed that *Vernonia cinerea* water extract (VE) could decrease NO/ROS in a dose dependent manner, and significantly diminished iNOS enzyme expressions in the LPS/IFN- γ stimulated cells. Moreover, VE at the tested concentrations (62.5-500 μ g/mL) had no effect on cell viability in the macrophages. Basically, this study demonstrates that VE has antioxidant property via inhibition of NO productions and reduction of iNOS enzyme synthesis.

Keywords: antioxidant, *Vernonia cinerea* L., nitric oxide, endotoxin, inflammation

ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหญาดอกขาว (*Vernonia cinerea* L.) ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินและไลโปไคโน

สรินยา คำปัญญา¹, สกลวรรณ ประพทิบัติ^{1,2}

¹ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

² ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

บทคัดย่อ

เซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ทำหน้าที่หลักในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ เพื่อกำจัดจุลชีพ สารพิษ และสิ่งแปลกปลอม โดยการสร้างอนุมูลอิสระ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) อนุพันธ์ออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และสารก่อการอักเสบ หญาดอกขาว (*Vernonia cinerea* L.) เป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ตำรายาพื้นบ้าน เพื่อบรรเทาการอักเสบในโรคต่าง ๆ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญาดอกขาวในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซิน และไลโปไคโน เซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (interferon- γ , IFN- γ) จะเพิ่มการสร้าง NO/ROS และเพิ่มการสังเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสชนิดเหนี่ยวนำ (inducible nitric oxide synthase, iNOS) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหญาดอกขาวในน้ำสามารถลดการสร้าง NO/ROS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารและสามารถลดการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ภายในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดหญาดอกขาวในความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (62.5-500 $\mu\text{g/mL}$) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ จากผลการศึกษานี้ได้แสดงข้อมูลเบื้องต้นให้เห็นว่า สารสกัดหญาดอกขาวในน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งการสร้าง NO และลดการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, หญาดอกขาว, *Vernonia cinerea* L., ไนตริกออกไซด์, เอนโดทอกซิน, การอักเสบ

บทนำ

การสร้างสารอนุมูลอิสระและการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องในโรคเรื้อรังต่าง ๆ ระบบภูมิคุ้มกันมีหน้าที่หลักในการปกป้องและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งการติดเชื้อจุลชีพ การได้รับสารพิษ ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (autoimmune) และเซลล์มะเร็ง การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเป็นผลมาจากเซลล์ภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นร่วมกับการสร้างสารไซโตไคน์ (cytokines) และอนุมูลอิสระ (free radicals) ระบบภูมิคุ้มกันสามารถแบ่งได้ 2 แบบ คือ ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive/specific immunity) เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บหรือมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามารบกวน จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทันทีและเริ่มกระบวนการอักเสบ ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดและภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ¹

โรคเรื้อรังเกิดจากพยาธิสภาพของภาวะอักเสบต่อเนื่อง เริ่มจากการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดโมโนไซต์ (monocyte) แมคโครฟาจ (macrophage) นิวโทรฟิล (neutrophil) ร่วมกับการทำงานของไซโตไคน์ และโมเลกุลโปรตีนต่าง ๆ ที่ถูกปล่อยออกมาในช่วงแรกของการอักเสบ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันจำเพาะจะถูกกระตุ้นจากสารก่อการอักเสบที่ถูกปล่อยจากเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด เป็นการจดจำสิ่งแปลกปลอมและเพิ่มการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี (B lymphocyte) และชนิดที (T lymphocyte) ให้ตอบสนองและมีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบเฉพาะเจาะจง การทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดเป็นการตอบสนองอย่างรวดเร็วและไม่จำเพาะ ซึ่งอาจส่งผลทำลายเนื้อเยื่อหรือส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ปกติอื่นได้ อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดมีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นด่านแรกของกระบวนการป้องกันร่างกายและเริ่มกระบวนการอักเสบ² แมคโครฟาจเป็นเซลล์หลักในภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะสารพิษและการติดเชื้อจุลชีพ เซลล์แมคโครฟาจสามารถกำจัดเชื้อโรคโดยการจับกิน (phagocytosis) และปลดปล่อยสารก่อการอักเสบ เช่น tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ) รวมทั้งสร้างอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และอนุมูลออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS)¹ โดยเฉพาะเมื่อเซลล์แมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซิน (endotoxin) หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งเป็นสารที่ถูกปลดปล่อยจากส่วนผนังเซลล์ด้านนอกของเชื้อแบคทีเรีย จะเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ NO ร่วมกับการกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation) เกิดการสร้าง ROS จำนวนมหาศาล โมเลกุล NO และ ROS สามารถทำปฏิกิริยาต่อกันได้โมเลกุลที่มีความเป็นพิษสูงทำให้เกิดพิษทำลายเซลล์ รวมทั้งมีผลรบกวนการส่งสัญญาณต่าง ๆ ซึ่งก่อให้เกิดการบาดเจ็บหรือสูญเสียการทำงานของเซลล์ และส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ^{3,4}

อนุมูลอิสระ NO เป็นก๊าซที่เซลล์หลายชนิดในร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้ NO เกิดจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน L-arginine ด้วยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS) ให้เป็นสารซิทรูลิน (citrullin) และปลดปล่อย NO ออกมา⁵ เอนไซม์ NOS แบ่งออกเป็นสองชนิดหลัก ตามการแสดงออกของเอนไซม์และกลไกที่ควบคุมการทำงาน ชนิดแรก NOS ที่แสดงออกในสภาวะปกติของร่างกาย (constitutive form) และถูกควบคุมการทำงาน

ด้วยความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ ชนิดที่สอง NOS ที่จะแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ เอนโดทอกซิน หรือสารก่อการอักเสบ (inducible form) และการทำงานไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ เมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาภายในเซลล์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็น NO ออกมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีปริมาณ NO เพิ่มขึ้นมาก⁶ ในสภาวะปกติของร่างกาย เซลล์ที่สร้าง NO ออกมาจะสร้างในความเข้มข้นระหว่าง picomolar ถึง nanomolar ด้วยการทำงานของ constitutive NOS อนุมูลอิสระ NO ความเข้มข้นในระดับต่ำนี้มีหน้าที่เป็นสารช่วยกำกับดูแลการทำงานของเซลล์ NO ที่ถูกสร้างจากเซลล์ผนังหลอดเลือดทำหน้าที่ขยายหลอดเลือด (vasodilator) โดยเฉพาะในหลอดเลือดขนาดเล็กส่วนปลาย เพื่อให้เกิดการไหลเวียนเลือดที่ดี (microcirculation) หรือ NO ที่ถูกสร้างจากเซลล์ประสาทจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ช่วยการส่งผ่านกระแสประสาทร่วมกับสารสื่อประสาทหลัก ในระบบภูมิคุ้มกันที่ภาวะปกติ เซลล์แมคโครฟาจจะมีการสร้าง NO ในปริมาณน้อยมาก เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินหรือไซโตไคน์จากการอักเสบจะเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ iNOS และสามารถเพิ่มการสร้าง NO ออกมาในปริมาณมากในความเข้มข้นระดับ micromolar ซึ่งสูงกว่าปกติ 100-1000 เท่า เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่แปลกปลอมเข้ามา ในขณะเดียวกัน NO ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นระดับนี้ จะสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลปกติภายในเซลล์ ส่งผลทำลายเซลล์และเกิดพิษ^{5,7}

โรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) หรือตับอักเสบ (hepatitis) เป็นหนึ่งในโรคเรื้อรังที่มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นทั่วโลก ผู้ป่วยโรคตับจากแอลกอฮอล์ร้อยละ 65 มีอัตราการเสียชีวิตภายในระยะเวลาสี่ปีเท่านั้น สาเหตุหลักเกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณสูงอย่างต่อเนื่องจากการรวบรวมข้อมูลในประเทศแสดงการดื่มแอลกอฮอล์ของประชากรไทยเป็นปัจจัยเสี่ยงอันดับหนึ่งทางด้านสุขภาพ ส่งผลทำให้เกิดการบาดเจ็บ พิการ เสียชีวิตจากอุบัติเหตุ และโรคตับจากแอลกอฮอล์⁸ เมื่อร่างกายได้รับแอลกอฮอล์ปริมาณสูงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเซลล์ต่าง ๆ ตั้งแต่ภาวะไขมันสะสมในตับ (steatosis) ตับอักเสบเรื้อรัง (hepatitis) ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma)⁹ กลไกและกระบวนการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของโรคนี้มีความซับซ้อน ส่วนหนึ่งมาจากความเป็นพิษโดยตรงของเอทานอลและผลผลิตที่มาจากการเปลี่ยนแปลงเอทานอลเป็นสารพิษอะเซตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เอทานอลยังสามารถถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 2E1 ได้สารอนุมูลอิสระ¹⁰ นอกจากนี้ อีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เซลล์ตับถูกทำลายและนำไปสู่การอักเสบเพิ่มขึ้น คือการมีปริมาณเอนโดทอกซินในระบบทางเดินอาหาร ผ่านเข้าสู่กระแสเลือดทางหลอดเลือดดำพอร์ทัล (portal vein) เพิ่มขึ้น จากการศึกษาในระดับพรีคลินิกและระดับคลินิกมีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดว่าโรคตับจากแอลกอฮอล์จะมีระดับ endotoxin ในซีรัมสูงขึ้นและสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค¹¹ เอนโดทอกซินกระตุ้นแมคโครฟาจและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด เกิดพยาธิสภาพของโรคตับอักเสบเรื้อรังตามมา¹²⁻¹⁴ แนวทางการรักษาโรคเรื้อรังที่ดีที่สุดทางหนึ่งคือ การชะลอการอักเสบโดยลดการสร้างอนุมูลอิสระและสารก่อการอักเสบจากเซลล์ภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันกลุ่มยาต้านการอักเสบ ได้แก่ กลุ่มสเตียรอยด์ (corticosteroid), กลุ่มแอนติบอดีต้านสารก่อการอักเสบ

(monoclonal antibody) และกลุ่มสารสกัดจากพืชสมุนไพร^{15,16} อย่างไรก็ตามยาในกลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้ยังมีข้อจำกัดด้านอาการไม่พึงประสงค์หรือด้านเภสัชจลนศาสตร์

หญ้านดอกขาว (หญ้ามอนน้อย, หญ้าละออง, หญ้าสามวัน) เป็นพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในประเทศไทยและในแถบเอเชีย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vernonia cinerea* L. จัดอยู่ในตระกูล Asteracea จากการศึกษาพบว่าหญ้านดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย อาทิ มีฤทธิ์แก้ปวด ใช้รักษาแผลสด กลากเกลื้อน และภาวะดีซ่าน¹⁷ รายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้านดอกขาวในเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดไข้ และลดปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carageenan, histamine หรือ serotonin และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับแอสไพริน^{18,19} ในหนูที่ถูกกระตุ้นเป็นข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) เมื่อได้รับสารสกัดหญ้านดอกขาวสามารถลดอาการข้อบวม และลดระดับโปรตีนในพลาสมาที่สูงขึ้นจากภาวะอักเสบได้ดี²⁰ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหญ้านดอกขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus*, *B. subtilis* และแกรมลบ *E. coli*, *P. aeruginosa*^{21,22} รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง²³ นอกจากนี้ ผงแห้งหญ้านดอกขาวในรูปแบบชาชง ใช้เป็นยาช่วยเลิกบุหรี่ โดยสามารถช่วยลดอาการถอนยาในผู้ติดยาโคดีนได้ดีและทำให้ผู้ป่วยเลิกบุหรี่เร็วขึ้น²⁴ หญ้านดอกขาวยังมีฤทธิ์ลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และเพิ่มการหลั่งสารในกลุ่มเอนโดฟิน²⁵ จากการศึกษาด้านความเป็นพิษพบว่า สารสกัดหญ้านดอกขาวมีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่ออวัยวะสำคัญ²⁶ สารสกัดหญ้านดอกขาวจึงเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการนำมาศึกษา เพื่อพัฒนาสำหรับรักษาภาวะอักเสบเรื้อรังและชะลอการดำเนินของโรค การศึกษานี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญ้านดอกขาวในน้ำ โดยการทดสอบผลของสารสกัดต่อการสร้าง NO/ROS ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินและไลโปโพลีแซคคาไรด์

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดหญ้านดอกขาว

ผงอบแห้งของหญ้านดอกขาวส่วนดอกและลำต้น ได้จากโรงพยาบาลบางกระพุ่ม อำเภอบางกระพุ่ม จังหวัดพิษณุโลก นำมาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60°C ใช้ผงหญ้านดอกขาวขนาด 100 g ในน้ำปริมาตร 1 L หมักเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ทำการหมักน้ำสามครั้ง เก็บรวบรวมสารสกัดทั้งหมดมาทำให้แห้ง ในสภาวะลดความดันและอุณหภูมิเยือกแข็ง (freeze dry) ได้สารสกัดแห้ง (crude water extract) ในปริมาณสุทธิ 15 g (% yield = 15%) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป สารสกัดจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แยกโดยใช้ Mightysil C-18, 250 × 4.6 mm, 5 µm column (Kanto Chemical, Tokyo, Japan), mobile phase: acetonitrile:phosphate buffer pH 3.5, flow rate: 1 mL/min, UV detector wavelength 254 nm เป็นเวลา 20 นาที และโครมาโตแกรมที่ได้จะนำมาใช้สำหรับเป็นแบบรอยมาตรฐาน (footprint) ในการสกัดแต่ละครั้งและทดสอบความคงตัวของสารสกัด

การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และการทดสอบผลของสารสกัดหญาดอกขาว

เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 (ATCC, Manassas, VA, USA) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มียาปฏิชีวนะ penicillin (100 unit/mL), streptomycin (100 µg/mL) และ fetal bovine serum (10%) โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ปริมาณเซลล์หนาแน่นเต็มที่ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบผลของสารสกัดหญาดอกขาว โดยเซลล์จะถูกแบ่งเพาะเลี้ยงในภาดหลุมขนาด 96-well จำนวนเซลล์หลุมละ 3×10^4 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (นับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer) แบ่งเป็นกลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุม, เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย endotoxin LPS 1 µg/mL ร่วมกับ IFN-γ 100 ng/mL เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง (LPS/IFN-γ), เซลล์ที่ได้รับสารสกัดหญาดอกขาวความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 750 และ 1,000 µg/mL, เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN-γ และได้รับสารสกัดหญาดอกขาวความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 µg/mL ตามลำดับ, เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN-γ และได้รับ L-N^G-nitroarginine methyl ester (L-NAME) 1 mM

การวิเคราะห์หาปริมาณไนตริกออกไซด์

การวิเคราะห์หาปริมาณ NO ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ โดยหาปริมาณ NO ที่ละลายอยู่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) เปลี่ยนเป็น nitrite (NO₂⁻) ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งเป็นรูปแบบที่คงตัวของ NO ในสารละลาย และวัดด้วยวิธี Griess assay²⁷ โดยนำ supernatant 100 µL เติมด้วย sulfanilamide 50 µL ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเติม N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED) ในสภาวะกรด 50 µL ตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะนำไปเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน sodium nitrite ปริมาณ NO ที่ถูกสร้างขึ้นจะแสดงในรูปความเข้มข้นของ nitrite (µM)

การวิเคราะห์การสร้างอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิปิด

การวัดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid reactive (TBARs) assay โดยวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation เซลล์เลี้ยงในภาดหลุมขนาด 24-well จำนวนเซลล์หลุมละ 1×10^6 ถูกเก็บและนำมาปั่นให้เซลล์แตกละเอียดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) นำเซลล์ที่แตกละเอียด (lysate) 500 µL เติมด้วย TBARs reagent 500 µL (1.4 % trichloroacetic acid, 10% thiobarbituric acid, 8% HCl ratio: 1:2:1) แล้วนำมาบ่มที่ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัด fluorescence ที่ความยาวคลื่น 485 nm (excitation) และ 535 nm (emission) ค่าที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณจากเส้นกราฟมาตรฐาน MDA (µM)

การหาปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ด้วยวิธี immunoblotting

เซลล์ RAW264.7 ถูกเก็บและผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับการแยกโปรตีนที่อุณหภูมิ 4°C (Tris buffers: 50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 10% protease inhibitor cocktail) นำไปต้มให้เดือด ทำการแยกโปรตีนด้วย gel electrophoresis และส่งผ่านโปรตีนไปที่แผ่น PVDF (polyvinylidene fluoride)

จากนั้นนำไปบ่มกับ iNOS polyclonal antibody แสดงผลระดับโปรตีนด้วยสาร chemiluminescent reagent (GE Healthcare Bio-Science, Bangkok, Thailand) บันทึกแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นฟิล์ม การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากแถบที่ปรากฏในแผ่นฟิล์ม โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA)

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability)

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) โดยล้างเซลล์ RAW264.7 ด้วย PBS แล้วเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 100 μ L บ่มในตู้บ่มเพาะที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาสารละลาย MTT ออกก่อนเติมสารละลาย DMSO:ethanol (1:1) ลงไป แล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

การวิเคราะห์ทางสถิติ

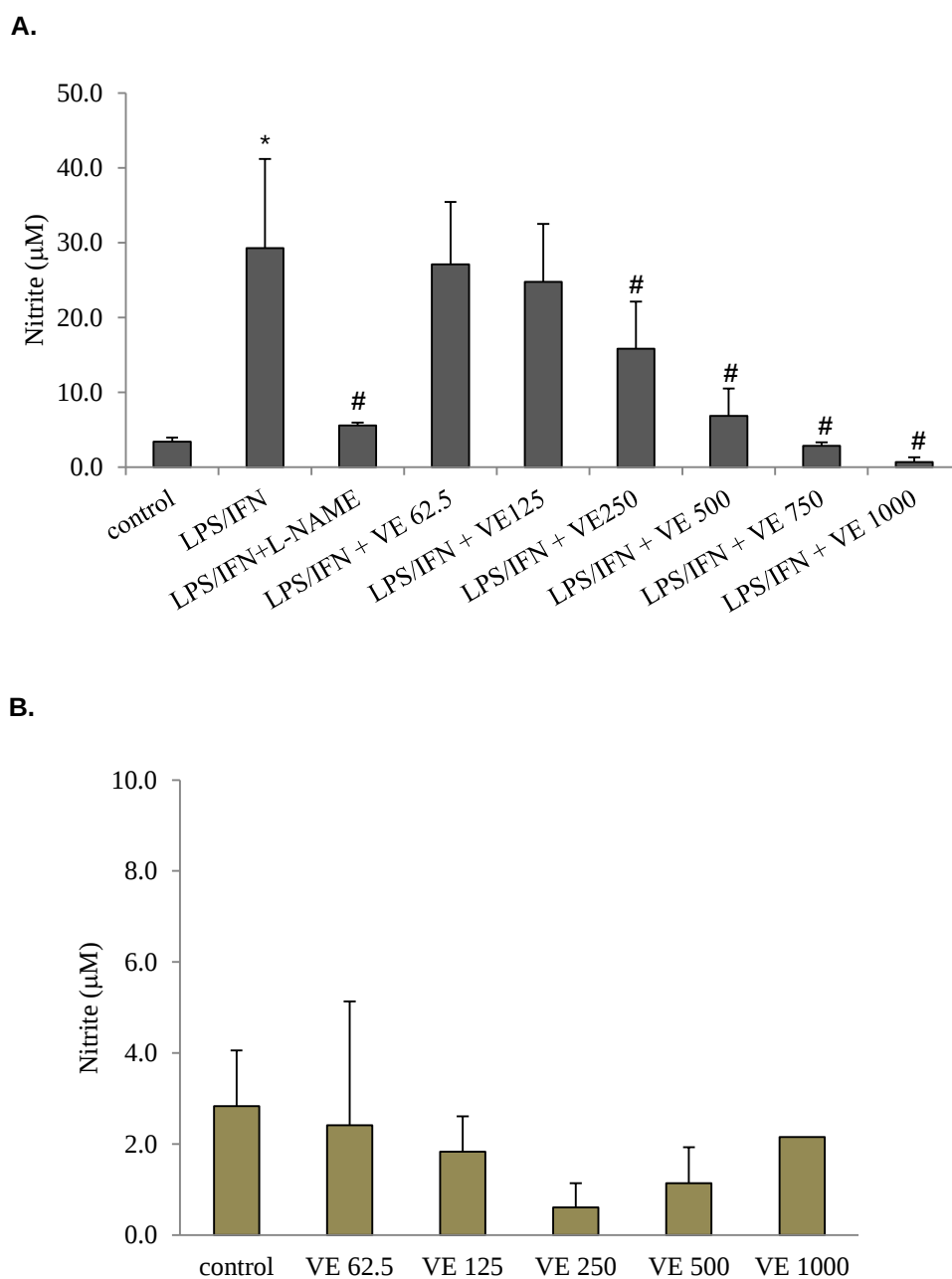
ข้อมูลจากผลการทดลองทุกตัวอย่างในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบมาจากการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้ student t-test ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS statistic software

ผลการทดลอง

ฤทธิ์ของสารสกัดหัวดอกขาวต่อการสร้างไนตริก ออกไซด์ และอนุพันธ์ออกซิเจนในปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิปิด ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินร่วมกับไลโปไคเนส

เซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินและไลโปไคเนส LPS/IFN- γ เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงสามารถเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ NO ออกมาจำนวนมาก ซึ่งวัดเป็นระดับความเข้มข้นของ nitrite ในการศึกษานี้มีปริมาณ NO ที่ถูกสร้างเพิ่มขึ้นประมาณ 8 เท่า (29.28 ± 11.90 μ M) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (3.40 ± 0.56 μ M) และเมื่อได้รับ L-NAME ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS อย่างเฉพาะเจาะจง พบว่ามีผลลดการสร้าง NO อย่างชัดเจน

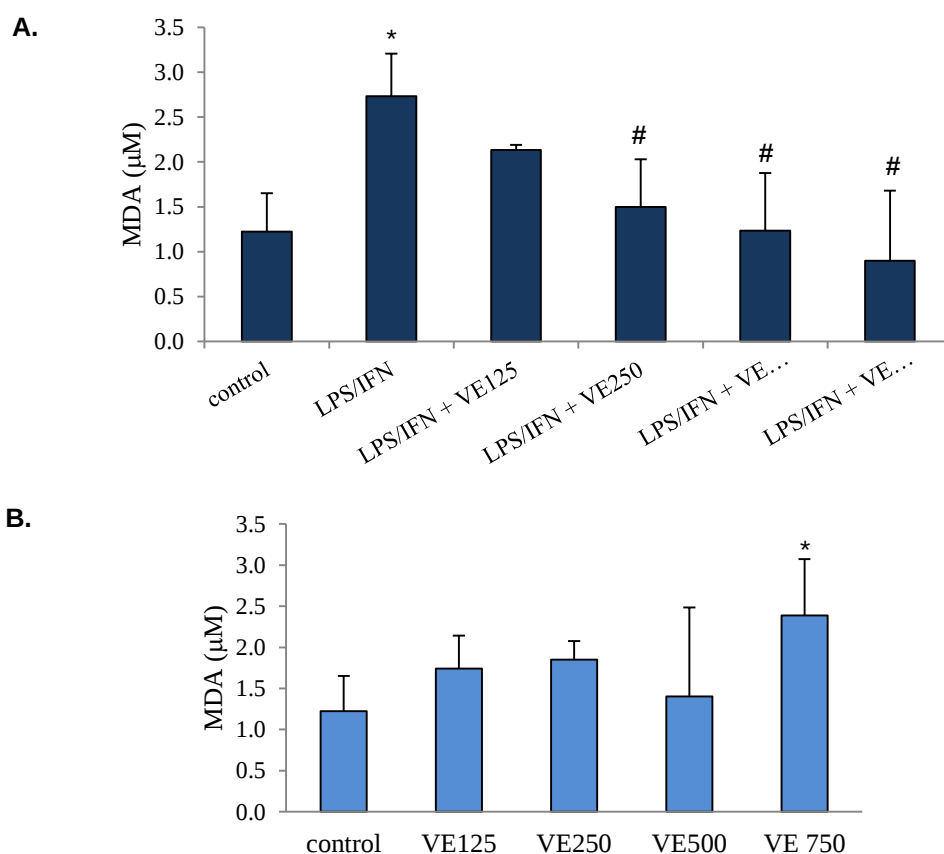
เมื่อทดสอบ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS /IFN- γ ร่วมกับการได้รับสารสกัดหัวดอกขาวในน้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 μ g/mL) พบว่า สารสกัดหัวดอกขาวมีฤทธิ์ลดการสร้าง NO จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ ได้ดีและเป็นการตอบสนองในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (dose-dependent response) สารสกัดหัวดอกขาวที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250-1000 μ g/mL สามารถลดการสร้าง NO ในเซลล์แมคโครฟาจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหัวดอกขาวในน้ำต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ถูกกระตุ้นพบว่า สารสกัดหัวดอกขาวไม่มีฤทธิ์โดยตรงต่อการกระตุ้นการสร้าง NO (รูปที่ 1 A และ B)



รูปที่ 1 ผลของสารสกัดเห็ดดอกขาวต่อการสร้าง nitric oxide ในแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ (A) และผลของสารสกัดเห็ดดอกขาวโดยตรงต่อแมคโครฟาจ (B)

แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ และ IFN- γ 100 ng/mL (LPS/IFN) ร่วมกับได้รับสารสกัดเห็ดดอกขาว (VE) ที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$ บ่มนาน 16 ชั่วโมง การวัดปริมาณ NO ที่ถูกสร้างขึ้นมาโดยวัดในความเข้มข้นของ nitrite ในสารละลายลิ้นจี่เซลล์ โดยใช้ Griess assay หน่วยเป็น μM ผลการศึกษามาจากการทดสอบ 3-5 ครั้ง และแสดงค่า mean $\pm$ SD, การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ t-test, * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN ($P < 0.05$)

เมื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบดอกขาวในน้ำต่อการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วยการวัด malondialdehyde (MDA) พบว่าเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ มีการสร้าง MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อได้รับร่วมกับ สารสกัดหยาบดอกขาวพบว่า สารสกัดหยาบดอกขาวสามารถลดการสร้าง MDA ได้ในลักษณะ dose dependent response เช่นกัน โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 250, 500, 750 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการสร้าง MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ และไม่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้ เมื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบดอกขาวต่อการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในเซลล์ RAW264.7 โดยตรงพบว่า สารสกัดไม่มีผลเพิ่มการสร้าง MDA อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบดอกขาวที่ความเข้มข้นสูง 750 $\mu\text{g/mL}$ เพิ่มการสร้าง MDA อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 A และ B)

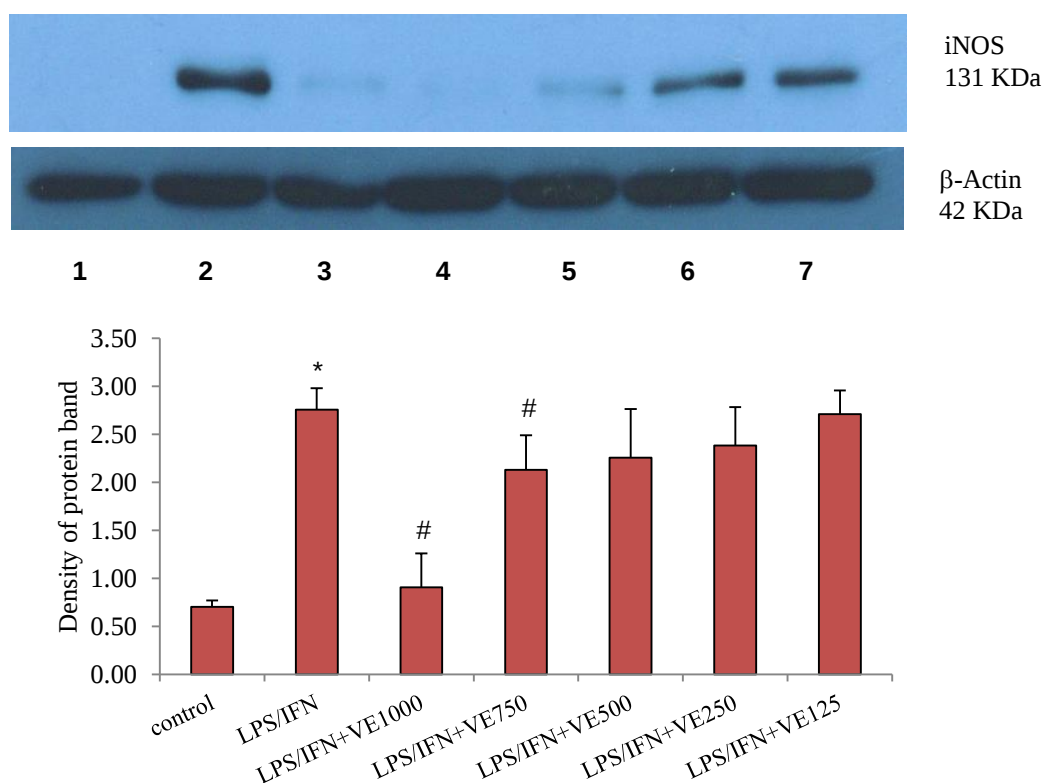


รูปที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบดอกขาวต่อปฏิกิริยา lipid peroxidation ในแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ (A) และผลของสารสกัดหยาบดอกขาวโดยตรงต่อเซลล์แมคโครฟาจ (B)

แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ และ IFN- γ 100 ng/mL (LPS/IFN) ร่วมกับได้รับสารสกัดหยาบดอกขาวในน้ำ (VE) ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 750 $\mu\text{g/mL}$ บ่มนาน 16 ชั่วโมง ความเข้มข้นของ malondialdehyde (MDA) เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidation วัดด้วยวิธี TBAR assay หน่วยเป็น μM ผลการศึกษามาจากการทดสอบ 3 ครั้งและแสดงค่า mean $\pm$ SD, การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ t-test, * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN ($P < 0.05$)

ผลของสารสกัดหญาดอกขาวต่อปริมาณเอนไซม์ *inducible nitric oxide synthase* ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินร่วมกับไซโตไคน์

เซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ เพิ่มการสังเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ iNOS อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ ร่วมกับการได้รับสารสกัดหญาดอกขาวในน้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สารสกัดหญาดอกขาวสามารถลดการสร้างปริมาณเอนไซม์ iNOS โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 750 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการปริมาณแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ และไม่ได้รับสารสกัด (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดหญาดอกขาวต่อปริมาณเอนไซม์ iNOS ในแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ

แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ และ IFN- γ 100 ng/mL (LPS/IFN) ร่วมกับการได้รับสารสกัดหญาดอกขาวในน้ำ (VE) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มนาน 16 ชั่วโมง นำมาแยกโปรตีนและหาปริมาณเอนไซม์ iNOS ด้วย immunoblotting แสดงแถบโปรตีนที่ 131 KDa โดยแถบที่ 1: control, 2: LPS/IFN- γ stimulated macrophages, 3-7: LPS/IFN- γ stimulated macrophages ร่วมกับ VE 1000, 750, 500, 250, 125 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากแถบที่ปรากฏในแผ่นฟิล์มโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการคำนวณ Quantity One® แสดงผลเป็นความเข้มของแถบโปรตีน (density of protein band) mean $\pm$ SD ผลการศึกษาจากการทดสอบ 3-4 ครั้ง การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ t-test, * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN ($P < 0.05$)

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability)

เมื่อทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำด้วยวิธีวิเคราะห์ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) พบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวที่ใช้ในการทดสอบทุกความเข้มข้น (62.5-500 $\mu\text{g/mL}$) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ นอกจากนี้เมื่อทดสอบในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ ร่วมกับการได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว ผลการทดสอบแสดงให้เห็นชัดเจนเช่นกันว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ

% Cell viability (mean $\pm$ SD)	
Control	100
VE 62.5	94.65 $\pm$ 4.02
VE 125	93.32 $\pm$ 3.76
VE 250	92.47 $\pm$ 3.51
VE 500	88.23 $\pm$ 4.12
LPS/IFN	106.52 $\pm$ 4.98
LPS/IFN + VE 62.5	101.40 $\pm$ 12.59
LPS/IFN + VE 125	99.87 $\pm$ 10.19
LPS/IFN + VE 250	101.47 $\pm$ 11.54
LPS/IFN + VE 500	95.15 $\pm$ 8.00

VE: *Vernonia cinerea* extract ($\mu\text{g/mL}$), LPS/IFN: Lipopolysaccharide 1 $\mu\text{g/mL}$
ร่วมกับ Interferon- γ 100 ng/mL

วิจารณ์

การตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดโดยการสร้างอนุมูลอิสระ และสารก่อการอักเสบ ณ บริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม สารพิษ เชื้อจุลินทรีย์ หรือมีเนื้อเยื่อถูกทำลาย นับเป็นปฏิกิริยาต้านแรกเพื่อกำจัดสิ่งบุกรุกที่เข้ามาทำลายเซลล์ และส่งสัญญาณกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะให้เกิดการตอบสนอง แมคโครฟาจเป็นหนึ่งในเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดที่มีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นกระบวนการอักเสบ เมื่อแมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินจากจุลินทรีย์ หรือไซโตไคน์หลังจากเซลล์ภูมิคุ้มกันจำเพาะที่ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B และ T ทั้งในภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หนองพยาธิ²⁸⁻³⁰ การเกิดพยาธิสภาพของโรคเรื้อรัง รวมทั้งโรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) จะเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ NO และ ROS ออกมาจำนวนมากส่งผลให้มีการอักเสบรุนแรงมากขึ้น ทั้งยังสามารถส่งผลทำลายเซลล์ปกติอื่น ๆ และก่อให้เกิดเป็นพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ¹ ดังนั้น การพัฒนายาหรือสารที่สามารถลดการตอบสนองของแมคโครฟาจ โดยยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระและสารก่อการอักเสบ สารนั้น ๆ มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปใช้เป็นยาต้านการอักเสบสำหรับการรักษาเรื้อรังและโรคตับจากแอลกอฮอล์ ในปัจจุบัน

การศึกษายังคงมุ่งความสนใจในค้นหาสารสกัดสมุนไพรในแถบเอเชีย และสมุนไพรประจำถิ่นชนิดใหม่ ๆ เพื่อพัฒนาให้ได้สารต้านการอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่มีความปลอดภัย ลดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาเคมีสังเคราะห์ อาทิ สารสกัดจาก *Amomum xanthioides* (เร่วหอม)³¹, *Prunus yedoensis* (ชากุระ)³², *Gelidium elegans* (สาหร่ายแดง)³³ นอกจากนี้ยังมีพืชสมุนไพรและสารสังเคราะห์จำนวนมากที่อยู่ระหว่างการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบ³⁴ การศึกษานี้ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN- γ ผลการทดสอบยืนยันการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจสามารถเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ NO ในปริมาณสูงหลายเท่าเมื่อเทียบกับภาวะปกติ ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์แมคโครฟาจถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS เพิ่มขึ้น เอนไซม์ iNOS ที่ถูกสังเคราะห์ออกมาสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นกรดอะมิโน L-arginine ให้เป็น NO อย่างต่อเนื่อง จึงเพิ่มการสร้าง NO ในปริมาณมหาศาล เมื่อทำการทดสอบร่วมกับสารสกัดหญาดอกขาวในน้ำพบว่า สารสกัดหญาดอกขาวมีฤทธิ์ลดการสร้าง NO ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินและไลโปไคโนได้ดี นอกจากนี้ ผลการทดสอบจากการวัดปริมาณเอนไซม์แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญาดอกขาวยังสามารถลดการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ได้ชัดเจน รวมทั้งสารสกัดหญาดอกขาวสามารถลดการสร้าง ROS ซึ่งส่งผลต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์แมคโครฟาจได้ด้วย จากการทดสอบสารสกัดหญาดอกขาวในน้ำต่อเซลล์แมคโครฟาจโดยตรงพบว่า สารสกัดหญาดอกขาวอย่างเดียวไม่มีผลกระตุ้นการสร้าง NO หรือ ROS อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงแสดงการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นบ้าง ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากภายในสารสกัดหญาดอกขาวมีองค์ประกอบของสารสำคัญหลากหลาย ซึ่งอาจจะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์

หญาดอกขาวเป็นหนึ่งในพืชท้องถิ่นในเอเชียที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคติดเชื้อ ลดไข้ และภาวะข้ออักเสบ^{19,21} จากการศึกษาสารสกัดหญาดอกขาวในเมทานอลพบว่า มีฤทธิ์ลดการสร้างสารก่อการอักเสบ และลดอาการปวดได้ดีในหนูที่ทำให้อักเสบ³⁵ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญาดอกขาวต่อระบบภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ BALB/c พบว่า สารสกัดหญาดอกขาวในเมทานอลสามารถเพิ่มการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวและแอนติบอดี รวมทั้งเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไขกระดูก ด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบพบว่า สารสกัดหญาดอกขาวในเมทานอลสามารถลดการสร้าง NO และสารก่อการอักเสบชนิดต่าง ๆ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในหนูเมาส์ที่ได้รับ LPS รวมทั้งมีฤทธิ์ลดการสังเคราะห์ mRNA ของเอนไซม์ iNOS และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ดี³⁶ ด้านความเป็นพิษของหญาดอกขาวเป็นสมุนไพรที่มีความเป็นพิษต่ำและปลอดภัย²⁶ ผลจากการทดสอบครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นเช่นกันว่า สารสกัดหญาดอกขาวในน้ำไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ ทั้งในภาวะปกติและในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินและไลโปไคโน การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญาดอกขาวในน้ำ ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านั้นเป็นการศึกษาสารสกัดหญาดอกขาวในเมทานอลหรือตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากปัจจุบันหญาดอกขาวได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นยาสมุนไพร ในรูปแบบผงแห้งสำหรับชงในน้ำอุ่น สำหรับดื่มเพื่อลดอาการถอนยาจากการติดยาโคเคน²⁴ ดังนั้น สารสกัดหญาดอกขาวในน้ำจึงน่าจะมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและมีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่

เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นยา อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ การวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดและเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดหญาดอกขาในน้ำ ยังจำเป็นต้องมีการทดสอบและรวบรวมข้อมูลต่อไป

สรุป

การศึกษานี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญาดอกขาในน้ำในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซินและสารก่อการอักเสบไซโตไคน์ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหญาดอกขาสามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระ NO และ ROS และลดการสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ได้ ดังนั้น หญาดอกขาน่าจะเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ส่วนหนึ่งได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี 2554 และผู้วิจัยขอขอบคุณ นิสิตบัณฑิตศึกษา และบุคลากรในหน่วยวิจัยเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001 Jun 2; 357(9270):1777-89.
2. Chaplin DD. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2 Suppl Mini-Primer):S430-5.
3. Deng XS, Deitrich RA. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. *Curr Clin Pharmacol*. 2007 May;2(2):145-53.
4. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003 Dec;54(4): 469-87.
5. Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I. Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot*. 2008;59(1):25-35.
6. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829-37.
7. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):807-16.
8. ทักษพล ธรรมรังสี, บรรณาธิการ. สถานการณ์การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และผลกระทบในประเทศไทยปี 2556. นนทบุรี: ศูนย์วิจัยปัญหาสุรา สำนักงานพัฒนานโยบายสุขภาพระหว่างประเทศ กระทรวงสาธารณสุข; 2556.

9. Helmut KS, Charles SL, Felix S, Mikko S, Hans-Peter S, Yoshimori H. Alcoholic liver disease: from pathophysiology to therapy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 July;29(7):1276-81.
10. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2005 Feb;9(1):1-35.
11. Schafer C, Parlesak A, Schutt C, Bode JC, Bode C. Concentrations of lipopolysaccharide-binding protein, bactericidal/permeability-increasing protein, soluble CD14 and plasma lipids in relation to endotoxaemia in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2002 Jan-Feb;37(1):81-6.
12. Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;26(1):30-46.
13. Moriya T, Naito H, Ito Y, Nakajima T. Hypothesis of seven balances. Molecular mechanisms behind alcoholic liver diseases and associated with PPAR α . *J Occup Health*. 2009;51(5):391-403.
14. Lieber CS. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2005;50:7-20.
15. Zhang W, Hong R, Tian T. Silymarin's protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats. *Biomol Ther*. 2013 July 30;21(4):264-9.
16. Day CP. Treatment of alcoholic liver disease. 2007 Nov;13(11 Suppl 2):S69-75.
17. Toyang NJ, Verpoorte R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*. 2013 Apr 19;146(3):681-723.
18. Gupta M, Mazumder UK, Manikandan L, Bhattacharya S, Halder PK, Roy S. Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. *Phytother Res*. 2003 Aug;17(7):804-6.
19. Iwalewa EO, Iwalewa OJ, Adeboye JO. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. *J Ethnopharmacol*. 2003 Jun;86(2-3):229-34.
20. Latha RM, Geetha T, Varalakshmi P. Effect of *Vernonia cinerea* Less flower extract in adjuvant-induced arthritis. *Gen Pharmacol*. 1998;31(4):601-6.
21. Gupta M, Mazumder UK, Manikandan L, Halder PK, Bhattacharya S, Kandar CC. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. *Fitoterapia*. 2003 Feb;74(1-2):148-50.
22. Yoga Latha L, Jr., Darah I, Sasidharan S, Jain K. Antimicrobial activity of *Emilia sonchifolia* DC., *Tridax procumbens* L. and *Vernonia cinerea* L. of Asteracea family: potential as food preservatives. *Malays J Nutr*. 2009 Sep;15(2):223-31.
23. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Modulation of cytotoxic T lymphocyte, natural killer cell, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity by *Vernonia cinerea* L. and vernolide-A in BALB/c mice via enhanced production of cytokines IL-2 and IFN- γ . *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012 Feb;34(1):46-55.

24. Wongwiwatthananut S, Benjanakaskul P, Songsak T, Suwanamajo S, Verachai V. Effectiveness of *Vernonia cinerea* for smoking cessation. J Health Res. 2009 Jan-Mar;23(1):31-6.
25. Leelarungrayub D, Pratanaphon S, Pothongsunun P, Sriboonreung T, Yankai A, Bloomer R. *Vernonia cinerea* Less. supplementation and strenuous exercise reduce smoking rate: relation to oxidative stress status and beta-endorphin release in active smokers. J Int Soc Sports Nutr. 2010 May 26;7:21.
26. Latha LY, Darah I, Jain K, Sasidharan S. Toxicity study of *Vernonia cinerea*. Pharm Biol. 2010 Jan;48(1):101-4.
27. Hetrick EM, Schoenfisch MH. Analytical chemistry of nitric oxide. Annu Rev Anal Chem. 2009;2:409-33.
28. Panaro MA, Brandonisio O, Sisto M, Acquafredda A, Leogrande D, Fumarola L, et al. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. Clin Exp Med. 2001 Sep;1(3):137-43.
29. Padrao Jda C, Cabral GR, da Silva Mde F, Seabra SH, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. Parasitol Int. 2014 Oct;63(5):659-63.
30. Chandrasekar B, Deobagkar-Lele M, Victor ES, Nandi D. Regulation of chemokines, CCL3 and CCL4, by interferon gamma and nitric oxide synthase 2 in mouse macrophages and during *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. J Infect Dis. 2013 May 15;207(10):1556-68.
31. Wang JH, Shin JW, Choi MK, Kim HG, Son CG. An herbal fruit, *Amomum xanthoides*, ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rat via antioxidative system. J Ethnopharmacol. 2011 May 17;135(2):344-50.
32. Lee J, Yang G, Lee K, Lee MH, Eom JW, Ham I, et al. Anti-inflammatory effect of *Prunus yedoensis* through inhibition of nuclear factor-kappaB in macrophages. BMC Complement Altern Med. 2013 Apr 30;13:92.
33. Jeon HJ, Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY. *Gelidium elegans*, an edible red seaweed, and hesperidin inhibit lipid accumulation and production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in 3T3-L1 and RAW264.7 Cells. Phytother Res. 2014 Nov;28(11):1701-9.
34. Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. Curr Med Chem. 2012;19(14):2088-103.
35. Pratheeshkumar P, Kuttan G. *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2009;31(1):94-102.
36. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Modulation of immune response by *Vernonia cinerea* L. inhibits the proinflammatory cytokine profile, iNOS, and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2011;33(1):73-83.