

การศึกษากฎบัตรด้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

นางสาวฐิติพร เหล่าสิม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF VERNONIA CINEREA LESS. IN HUMAN
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Miss Thitiporn Laosim

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้า หมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์
โดย	นางสาวฐิติพร เหล่าสิม
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณัฐจิรา แสงกฤษ)

ฐิติพร เหล่าสิม : การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหญาหมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์. (Study of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. in human peripheral blood mononuclear cells) อ. ที่ปริภษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. เทวิน เทนคำเนา, อ. ที่ปริภษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล, 114 หน้า.

หญาหมอน้อยหรือหญาดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) มีสรรพคุณต่างๆ เช่น การลดไข้ และการต้านการอักเสบ ดังนั้น จึงมีการนำมาใช้ในการแพทย์แผนไทย แต่ยังไม่มืข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของฤทธิ์ต้านการอักเสบในมนุษย์ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดจากหญาหมอน้อยในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน และศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ จากอาสาสมัครสุขภาพดี ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค MTT พบว่า ไม่ว่าสารสกัดจากส่วนใดก็ตาม ที่สกัดด้วยเมทานอล หรือเฮกเซน ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ โดยความมีชีวิตของเซลล์มีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นที่ 0.19 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดจากเอทานอลจากดอก (50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) ใบ (100 $\mu\text{g/ml}$) และทั้งต้น (100 $\mu\text{g/ml}$) มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ ผลการวิเคราะห์ด้วย ELISA พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบหรือทั้งต้น เอทานอลจากทั้งต้น และเฮกเซนจากลำต้น สามารถลดระดับการหลั่งของไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบชนิด IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยพบว่า ผ่านทางการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B เมื่อพิสูจน์ด้วยวิธี immunocytochemistry โดยอาศัย confocal microscope แต่ระดับ TNF- α ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนั้น สารสกัดทั้งต้นหญาหมอน้อยจากเอทานอลสามารถเพิ่มระดับไซโตไคน์ต้านการอักเสบชนิด IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สรุปได้ว่าสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซนจากหญาหมอน้อยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

ภาควิชาเคมีคลินิก.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิก

และอณูทางการแพทย์

ปีการศึกษา.....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริภษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริภษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5277205737 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS : VERNONIA CINEREA LESS. / PBMCs / ANTI-INFLAMMATORY / NF- κ B

THITIPORN LAOSIM : STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF
VERNONIA CINEREA LESS. IN HUMAN PERIPHEROL BLOOD
MONONUCLEAR CELLS. ADVISOR : ASST.PROF. TEWIN TENCOMNAO,
Ph.D., CO-ADVISOR : SIRIPORN CHUCHAWANKUL, Ph.D., 114 pp.

Vernonia cinerea Less. or little iron weed has many therapeutic properties such as antipyretic and anti-inflammatory effects, thus being applied for Thai traditional medicine. Nevertheless, no scientific data on anti-inflammatory effect in humans is found. Herein, the present study aimed at assessing the toxicity of the methanolic extract of *Vernonia cinerea* L. and its anti-inflammatory effect on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals. Using the MTT assay, we found that the methanolic or hexane extracts from any part of this herb did not cause toxicity, and cell viability percentage of PBMCs was found higher than 90% with regard to its concentration range from 0.19 to 100 μ g/ml. However, the ethanolic extracts from flower (50 and 100 μ g/ml), leaf (100 μ g/ml) and whole plant (100 μ g/ml) resulted in toxicity of PBMCs. As experimentally tested using an ELISA method, we also found that the methanolic extracts from leaf or whole plant, ethanolic extracts from whole plant and hexane extracts from trunk significantly reduced a level of pro-inflammatory cytokine (IL-6) ($P < 0.05$) via inhibition of NF- κ B nuclear translocation as proven using immunocytochemistry and confocal microscope. Nonetheless, no change in the level of TNF- α was observed. In addition, the ethanolic extracts from whole plant significantly increased a level of anti-inflammatory cytokine (IL-10) ($P < 0.05$). Therefore, the methanolic, ethanolic and hexane extracts of *Vernonia cinerea* L. possessed anti-inflammatory effect on human PBMCs.

Department : Clinical chemistry..... Student's Signature

Field of Study : Clinical Biochemistry and Advisor's Signature

Molecular Medicine Co-advisor's Signature

Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อาจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ ในระหว่างการทำวิจัย ศิษย์ขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้ง 2 ท่าน ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานตียนานนท์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒน์ไพศาล และ ดร.ณัฐริกา แสงกฤษ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ และ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

ขอขอบพระคุณ คุณสัญญาชัย จิวเจริญ ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้นำหมอน้อยมาทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ทน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากบัณฑิตวิทยาลัย ซึ่งเป็นทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ และทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย รวมถึงทุนผู้ช่วยสอนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2554 ด้านการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร จากสถาบันวิจัยแห่งชาติ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี และ โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวิจัย ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิจัย ซึ่งมีส่วนสำคัญในการผลักดันให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว รวมถึง พี่ๆ น้องๆ ป.โท และเอก ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อจำกัดการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 .เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ระบบภูมิคุ้มกัน.....	5
ปัจจัยต่อการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกัน.....	5
การตอบสนองของทางภูมิคุ้มกัน.....	7
Toll-like receptors.....	8
Lipopolysaccharide.....	8
กระบวนการอักเสบ.....	10
ไซโตไคน์.....	11
Inflammatory cytokines.....	12
Peripheral blood mononuclear cells.....	17
NF-κB signaling pathway.....	17
ยาต้านการอักเสบที่ใช้ในปัจจุบัน.....	19
หญ้าหมอน้อย.....	19
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหญ้าหมอน้อย.....	22

บทที่	หน้า
กรอบแนวคิดและระเบียบวิธีวิจัย.....	24
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัย.....	25
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	32
การสกัดหญา้หมอน้อยด้วยตัวทำละลาย โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration).....	34
การแยก PBMCs ด้วยวิธี density gradient centrifugation.....	35
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อ PBMCs ด้วยวิธี MTT.....	37
การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยการวัดไซโตไคน์ ด้วยวิธี ELISA.....	39
การศึกษากลไกต้านอักเสบผ่าน NF- κ B ด้วย Confocal microscopy.....	42
การทดสอบผลของสารสกัดต่อ % cell viability ของ HEK293 และ HuH7.....	44
การวิเคราะห์ผล.....	45
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
ผลการสกัดหญา้หมอน้อย โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration).....	46
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อPBMCs.....	46
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากทั้งต้นของหญา้หมอน้อย.....	55
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากดอกของหญา้หมอน้อย.....	57
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบของหญา้หมอน้อย.....	59
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากลำต้นของหญา้หมอน้อย.....	61
ผลการศึกษากลไกต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญา้หมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี Immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy.....	63
ผลของสารสกัดต่อ % cell viability ของ HEK293.....	67
ผลของสารสกัดต่อ % cell viability ของ HuH7.....	73
สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	79
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	80
รายการอ้างอิง.....	88
ภาคผนวก.....	101
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	105

บทที่	หน้า
ภาคผนวก ค.....	107
ภาคผนวก ง.....	108
ภาคผนวก จ.....	110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	114

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของหญ้าหมอน้อย.....	21
4.1	ผลการสกัดส่วนต่างๆของหญ้าหมอน้อยด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน.....	46

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	บทบาทของ LPS ที่กระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory cytokines และ type1 interferon.....	9
2.2	บทบาทของ TLR ใน Innate immunity และ Acquired immunity.....	10
2.3	โครงสร้างของ TNF- α	12
2.4	โครงสร้างของ IL-1.....	14
2.5	โครงสร้างของ IL-6.....	14
2.6	โครงสร้างของ TGF- β	15
2.7	โครงสร้างของ IL-10.....	16
2.8	การทำงานของ LPS ผ่านทาง NF- κ B signaling pathway.....	18
2.9	ลักษณะของหญ้าหมอน้อย.....	20
3.1	PBMCs.....	27
3.2	HuH7.....	28
3.3	HEK293.....	28
3.4	ส่วนดอกและใบของหญ้าหมอน้อยที่ผ่านการตากแห้ง.....	35
3.5	ส่วนลำต้นและทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ผ่านการตากแห้ง.....	35
3.6	การแยก PBMCs.....	37
3.7	ปฏิกิริยาของวิธี MTT.....	38
3.8	หลักการของ sandwich ELISA.....	40
3.9	หลักการการทำงานของ Confocal microscope.....	42
3.10	Confocal microscope (Laser scanning microscope).....	43
4.1	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย.....	49
4.2	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากดอกของหญ้าหมอน้อย.....	50

ภาพที่	หน้า
4.3	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากใบของหญ้าหมอน้อย..... 51
4.4	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากลำต้นของหญ้าหมอน้อย..... 52
4.5	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยร่วมกับ LPS..... 53
4.6	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อยร่วมกับ LPS..... 54
4.7	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อยร่วมกับ LPS..... 54
4.8	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อยร่วมกับ LPS..... 55
4.9	กราฟแสดงระดับของ TNF- α จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย..... 56
4.10	กราฟแสดงระดับของ IL-6 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย..... 56
4.11	กราฟแสดงระดับของ IL-10 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย..... 57
4.12	กราฟแสดงระดับของ TNF- α จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อย..... 58
4.13	กราฟแสดงระดับของ IL-6 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อย..... 58
4.14	กราฟแสดงระดับของ IL-10 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อย..... 59
4.15	กราฟแสดงระดับของ TNF- α จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อย..... 60

ภาพที่	หน้า
4.16	ฐิ
	กราฟแสดงระดับของ IL-6 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อย..... 60
4.17	61
	กราฟแสดงระดับของ IL-10 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อย..... 61
4.18	62
	กราฟแสดงระดับของ TNF- α จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อย..... 62
4.19	62
	กราฟแสดงระดับของ IL-6 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อย..... 62
4.20	63
	กราฟแสดงระดับของ IL-10 จาก PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อย..... 63
4.21	65
	ภาพแสดงกลไกต้านอักเสบของสารสกัดหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทางกรยับยั้ง การเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B..... 65
4.22	66
	ภาพแสดงกลไกต้านอักเสบของสารสกัดหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทางกรยับยั้ง การเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B..... 66
4.23	69
	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากทั้ง ต้นของหญ้าหมอน้อย..... 69
4.24	70
	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจาก ดอกของหญ้าหมอน้อย..... 70
4.25	71
	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากใบ ของหญ้าหมอน้อย..... 71
4.26	72
	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากลำ ต้นของหญ้าหมอน้อย..... 72
4.27	75
	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากทั้งต้น ของหญ้าหมอน้อย..... 75
4.28	76
	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากดอก ของหญ้าหมอน้อย..... 76

ภาพที่		หน้า
4.29	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากใบ ของหญ้าหมอน้อย.....	77
4.30	กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากทั้งต้น ของหญ้าหมอน้อย.....	78
5.1	โครงสร้างของ Luteolin 7-O-glucoside	84
5.2	โครงสร้างของ Quercetin 7-O-glucoside 3-O-rhamnoside	84
5.3	โครงสร้างของ Stigmasterol.....	84
5.4	โครงสร้างของ Lupeol acetate.....	85
5.5	โครงสร้างของ Beta-amyrin acetate.....	85
5.6	โครงสร้างของ Chlorogenic acid.....	85
5.7	โครงสร้างของ Apigenin.....	86

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการรุกรานของเชื้อโรค ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ เช่น lymphocyte, monocyte, neutrophil และ macrophage รวมไปถึงการหลั่งไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) เช่น TNF- α , IL-1 และ IL-6 เป็นต้น [1] โดยมีส่วนชักนำไปสู่การชุมนุมของเซลล์หรือสารต่างๆ ให้มายังบริเวณที่ต้องการให้มีการกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ไซโตไคน์ประเภทนี้จะช่วยเพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecules ทำให้ vascular permeability เพิ่มขึ้น และกระตุ้นการสร้าง chemokines จาก endothelial cells ช่วยให้เซลล์เดินทางมายังบริเวณที่มีการอักเสบได้มากขึ้น [2, 3] ซึ่งกระบวนการสร้างไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบนั้นมีความเกี่ยวข้องกับ NF- κ B signaling pathway [4] นอกจากนี้ เซลล์เม็ดเลือดขาวยังมีการหลั่งไซโตไคน์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokines) เช่น IL-10 และ TGF- β ขึ้นมาเช่นเดียวกัน ทั้งนี้กระบวนการอักเสบอาจนำไปสู่โรคอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammatory diseases) หลายชนิด เช่น โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis), โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis), โรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) และโรคแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง (autoimmune diseases) เป็นต้น [5-8] โรคเหล่านี้เป็นโรคที่พบมากขึ้นในประชากรไทย และเป็นโรคที่ต้องได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่อง ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย แต่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย ได้แก่ หญ้าหมอนน้อยหรือหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) ซึ่งหลายคนมองว่าเป็นวัชพืชที่ต้องกำจัดทิ้ง แต่แท้ที่จริงแล้วกลับเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณมากมาย เช่น ส่วนลำต้นนำมาต้ม แล้วดื่มน้ำเพื่อเป็นยาแก้ไข้ ปวดท้อง ท้องเฟ้อ แผลบวมอักเสบ ความดันโลหิตสูง ส่วนของใบ นำมาบดหรือตำให้ละเอียดใช้พอกแผล ช่วยสมานแผล แก้กกลากเกลื้อน และสะเก็ดเงินได้ดี ส่วนทั้งต้นนำมาต้มน้ำรับประทาน แก้ปวดท้อง ท้องเฟ้อ แก้ไข้ เป็นต้น [9] จะเห็นว่าส่วนต่างๆ ของหญ้าหมอนน้อยล้วนมีฤทธิ์ในการรักษาอาการเจ็บป่วยได้ทั้งสิ้น แม้ว่าจะมีการนำหญ้าหมอนน้อยมาใช้ตามภูมิปัญญาไทยเป็นเวลายาวนาน แต่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในแง่ของกลไกการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของหญ้าหมอนน้อยยังมีอยู่น้อยมาก และส่วนใหญ่จะเป็น

การศึกษาในสัตว์ทดลองเท่านั้น มีการศึกษาพบว่าเมื่อนำหญ้าหมอน้อยมาสกัดด้วยตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม, เมทานอล และอีเทอร์ พบว่ามีฤทธิ์ลดไข้, บรรเทาปวด และต้านการอักเสบ [10] ทั้งยังพบว่าดอกของหญ้าหมอน้อยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่ถูกทำให้เป็น arthritis [11] และไม่นานมานี้มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดของหญ้าหมอน้อยสามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ glutathione-S-transferase ในเลือดและตับในสัตว์ทดลองได้ [12] และมีการศึกษาพบว่าสารสกัดหญ้าหมอน้อยจากเมทานอลลดปริมาณของ nitric oxide (NO) และ pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 และลดการแสดงออกของ mRNA ในยีน cyclooxygenase-2 (COX-2) ได้อีกด้วย [13]

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอลและเฮกเซน ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมูสเซอร์ พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์และกลไกในการต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวมูสเซอร์ ทั้งยังศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งมูสเซอร์เพาะเลี้ยง งานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สามารถนำไปต่อยอดโดยศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารในระดับโมเลกุล และนำไปสู่การพัฒนาแปรรูปหญ้าหมอน้อยให้เหมาะแก่การบริโภคเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ทรัพยากรที่มีอยู่และเป็น การส่งเสริมทางเลือกใหม่ในการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาอาการอักเสบต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. การทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวมูสเซอร์ (PBMCs)
 - 1.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อย
 - 1.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อย โดยการวัด pro-inflammatory cytokines และ anti-inflammatory cytokine ด้วยเทคนิค ELISA
 - 1.3 เพื่อศึกษากลไกต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี Immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy

2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มนุษย์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ได้แก่ HEK293 และ HuH7

ขอบเขตของงานวิจัย

คณะผู้วิจัยจะศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในเม็ดเลือดขาวมนุษย์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของหญ้าหมอนน้อยในตัวทำละลายต่างๆ กัน โดยจะประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้วยการวัด pro-inflammatory cytokines ได้แก่ tumor necrotic factor alpha (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) และ anti-inflammatory cytokine ได้แก่ interleukin-10 (IL-10) โดยศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMCs) และศึกษากลไกด้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยซึ่งผ่านทาง NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี Immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy พร้อมทั้งศึกษาระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยต่อเซลล์ PBMCs และศึกษาผลของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยต่อ % cell viability ของเซลล์มนุษย์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ได้แก่ HEK293 และ HuH7 ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *in vitro* model

ข้อจำกัดการวิจัย

ตัวอย่างเลือดที่นำมาวิจัยต้องมาจากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยยินยอมเข้าร่วมวิจัยด้วยความสมัครใจ เลือดจะถูกนำมาทดสอบกับสารสกัดหญ้าหมอนน้อยเพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและกลไกด้านการอักเสบเท่านั้น เมื่อสิ้นสุดการวิจัย ตัวอย่างเลือดที่เก็บทั้งหมดจะถูกทำลายโดยไม่นำกลับไปใช้ในงานวิจัยอื่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงกลไกด้านการอักเสบที่มาจากสารสกัดหญ้าหมอนน้อยอย่างแท้จริง
2. นำองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นไปต่อยอดงานวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรไทยสำหรับการลดการอักเสบในโรคต่างๆ ซึ่งไม่มีผลข้างเคียงหรือผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและลด

ค่าใช้จ่ายลง พร้อมทั้งนำหญ้าหมอน้อยมาใช้ในการรักษาในปริมาณที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

3. ทราบถึงส่วนของหญ้าหมอน้อยที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและตัวทำละลายที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบมากที่สุด
4. คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้อง ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง เช่น Biofactor (impact factor 1.23) หรือ Molecules (impact factor 1.738)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system)

ระบบภูมิคุ้มกัน คือ ระบบในร่างกายที่เป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์หลายชนิด ซึ่งมีหน้าที่คอยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้ามาทำอันตรายต่อร่างกาย หรือเมื่อหลุดเข้ามาแล้วระบบภูมิคุ้มกันก็จะพยายามทำลายกำจัดสิ่งแปลกปลอมให้หมดไปจากร่างกายโดยรวดเร็ว และอย่างมีประสิทธิภาพ [14]

- ปัจจัยต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ความสามารถในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้น จะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ขึ้นกับปัจจัยบางอย่างดังต่อไปนี้

1. พันธุกรรม (Genetics) พบว่าการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอยู่ภายใต้การควบคุมทางพันธุกรรม มีการศึกษาว่ายีนบนโครโมโซม ซึ่งควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และควบคุมชนิดของ major histocompatibility complex (MHC) ส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการเกิดโรคที่แตกต่างกันเช่น autoimmune disease, โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis), โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นต้น [15]
2. อายุ (Age) เด็กเล็กๆ และผู้สูงอายุสามารถเกิดโรคต่างๆ ได้ง่ายกว่าคนหนุ่มสาวเพราะในเด็กเล็กๆ ระบบภูมิคุ้มกันยังเจริญไม่เต็มที่ ขาด specific immunity ที่จะใช้ป้องกันโรค ขณะเดียวกันระบบ non-specific immunity ก็บกพร่องด้วย เช่น ผิวหนังบางและกลไกการเกิดการอักเสบยังทำหน้าที่ได้ไม่สมบูรณ์ เป็นต้น ในผู้สูงอายุประสิทธิภาพการทำงานของ

- ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายจะค่อยๆ ลดลงไป เพราะการทำงานของ immunoglobulin และการทำหน้าที่ของ cell mediated immunity จะน้อยลง จะเห็นได้ว่า นอกจากผู้สูงอายุจะเป็นโรคติดเชื้อได้ง่ายแล้ว อัตราการเกิดโรค autoimmune และโรคมะเร็ง จะพบมากขึ้นด้วย [16-18]
3. ฮอโมน (Hormone) ฮอโมนบางชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น steroid จะมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันบางชนิด ลดการอักเสบ และลดการสร้างแอนติบอดี พบว่าในผู้หญิงที่เป็น multiple sclerosis, allergy, systemic lupus erythematosus (SLE) จะมีอาการกำเริบในช่วงที่ผู้หญิงมีประจำเดือนซึ่งจะมีฮอโมนจำพวก steroid เช่น estrogens, progesterone อยู่สูง [19]
 4. โภชนาการ (Nutrition) พบว่าถ้าร่างกายได้รับสารอาหารจำพวกโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และสารอาหารต่างๆ เช่น ธาตุเหล็ก, สังกะสี, วิตามินเอ, วิตามินอี, วิตามินบีหก และวิตามินบีสิบสองอย่างเพียงพอจะทำให้ร่างกายมีภูมิต้านทานที่แข็งแรง แต่ถ้ามีการบริโภคไขมันมากเกินไป จะทำให้เกิดการกดภูมิคุ้มกันแทน [20]
 5. สภาพทางกายวิภาคศาสตร์ (Anatomical barrier) ผิวหนังและเยื่อเมือกที่บุอวัยวะต่างๆ ทำหน้าที่เป็นด่านแรกที่ร่างกายใช้ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ในผู้ป่วยถูกไฟไหม้คุณสมบัติดังกล่าวจะเสียไป ทำให้ติดเชื้อโรคได้ง่ายกว่าคนปกติ หรือ ขนอ่อน (cilia) ในระบบทางเดินหายใจ ถ้าผิดไปจากปกติ ทำให้จุลชีพจะเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น [21]
 6. จุลชีพประจำถิ่น (Normal flora) ที่อาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์ โดยไม่ทำให้เกิดโรค เช่นในลำไส้ นอกจากจะช่วยเหลือผลิตวิตามินเค ซึ่งเป็นประโยชน์แก่ร่างกายแล้ว ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic microorganism) ได้ด้วย เมื่อใดก็ตามที่จุลชีพชนิดแรกถูกทำลาย เช่น ได้รับยาปฏิชีวนะติดกันเป็นเวลานาน ทำให้จุลชีพก่อโรคเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นผลร้ายแก่ร่างกายได้ [22, 23]

- การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน [24] แบ่งออกเป็น

1. Innate immune response

เป็นปราการด่านแรกในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม และสามารถตอบสนองได้ทันทีเมื่อพบสิ่งแปลกปลอม มีเซลล์เม็ดเลือดขาวหลากหลายชนิดมาเกี่ยวข้องเช่น neutrophil และ macrophage ซึ่งมีหน้าที่กินและฆ่าจุลชีพ (phagocyte & killing) ทั้งยังส่งผลให้ Host สร้าง pro-inflammatory cytokines ออกมา จุลชีพจะถูกฆ่าและทำลายใน phagosome และชิ้นส่วนของจุลชีพจะถูกนำเสนอต่อ T-lymphocyte ใน adaptive immunity ต่อไป [25] สิ่งสำคัญสำหรับ innate immunity คือ การแยกความแตกต่างระหว่าง self และ non-self ได้ เนื่องจากมี receptor ที่สามารถรับรู้ส่วนที่เป็น conserved motif ของจุลชีพที่จะไม่พบในคน ซึ่ง motif เป็นส่วนสำคัญที่จุลชีพใช้หลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกัน เรียกการรับรู้แบบนี้ว่า Pathogen-associated-molecular patterns (PAMPs) ซึ่งจะจับกับ receptor ที่เรียกว่า Pattern recognition receptors (PRRs) บน phagocytic cell [26] และเป็นระบบที่ไม่มีความจำ คือเมื่อพบแอนติเจนแบบเดิมเป็นครั้งที่สอง ก็ไม่สามารถตอบสนองได้เร็วขึ้น [27]

2. Adaptive (acquired) immune response

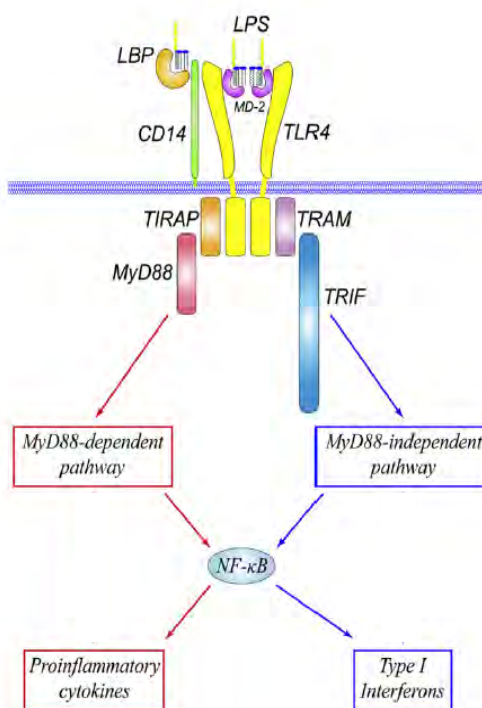
เป็นการตอบสนองอย่างจำเพาะ โดยอาศัยการทำงานของ T และ B lymphocyte เป็นระบบการตอบสนองที่มีความจำ (memory) คือ เมื่อ T และ B lymphocyte ถูกกระตุ้นแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มจำนวน โดยเซลล์ส่วนหนึ่งเปลี่ยนไปเป็น memory cell ซึ่งเมื่อพบแอนติเจนเดิมอีกครั้งจะสามารถตอบสนองได้เร็วกว่าครั้งแรก และเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่ตอบสนองต่อ เนื้อเยื่อของตัวเอง ซึ่งถ้าระบบนี้สูญเสียไปจะก่อให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง [28 - 30] การตอบสนองเช่นนี้มีการออกฤทธิ์ผ่าน 2 ทาง คือ Cell-mediated immune response (CMIR) ซึ่งเป็นการทำงานของ T- lymphocytes ประกอบด้วย cytotoxic T-cells ที่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้โดยตรง และ T helper cells ที่สร้างไซโตไคน์เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นๆ และอีกทางหนึ่งคือ Humoral immune response (HMIR) เป็นการทำงานของ B-lymphocyte เพื่อสร้างแอนติบอดี (antibody) [30]

- Toll-like receptors (TLRs)

TLRs ถูกค้นพบครั้งแรกใน innate immunity ของ *Drosophila* [31] มีความสามารถในการแยกเชื้อรา (fungi) กับแบคทีเรีย (bacteria) ออกจากกันได้ ทำให้เกิดการตอบสนองที่จำเพาะยิ่งขึ้น [32, 33] TLRs ในมนุษย์วิวัฒนาการมาจาก conserved receptors ของ Toll gene ของ *Drosophila* [34] TLRs ส่วนใหญ่จะแสดงออกบน dendritic cell (DC), neutrophil และ macrophage [35] ในมนุษย์มี TLRs 1-10 และ TLR ส่วนมากอยู่บน plasma membrane ยกเว้น TLR3, 7, 8, 9 ที่อยู่ใน endosome membrane [36] และในแต่ละ TLRs สามารถรับรู้จุลชีพได้แตกต่างกัน

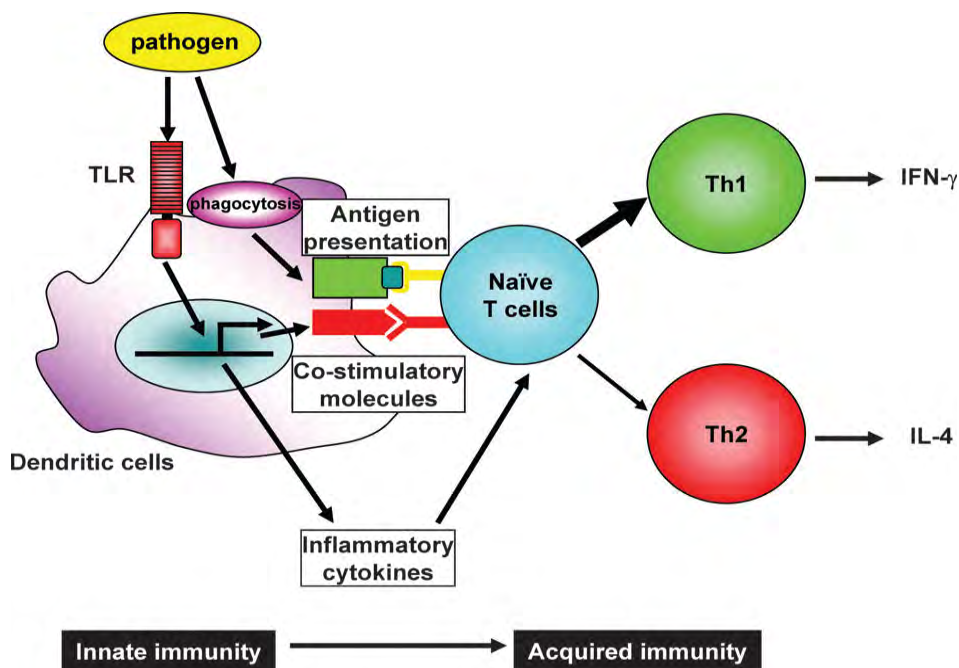
- Lipopolysaccharide (LPS)

LPS เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบ สามารถกระตุ้นการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ได้ และมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด septic shock syndrome [28] โดยเริ่มจาก LPS จะจับกับ LPS-binding protein (LBP) แล้วรวมกันเป็น complex ซึ่งถูกรับรู้ด้วย CD14 บน macrophage ซึ่งสามารถกระตุ้น Toll-like receptor 4 (TLR4) ได้ หรืออีกทางหนึ่ง LPS จับกับ MD2 ซึ่งเป็นโปรตีนบน TLR4 แล้วเกิดการส่งสัญญาณต่อไปโดยอาศัย adaptor protein ต่างๆ เช่น MyD88, TRIF, TRAM และ TIRAP เป็นต้น โดยถ้าเป็น pathway ที่อาศัย MyD88 จะส่งสัญญาณต่อไปที่ NF- κ B signaling pathway ทำให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ออกมา แต่ถ้าเป็น pathway ที่ไม่อาศัย MyD88 จะส่งสัญญาณไปที่ NF- κ B signaling pathway ทำให้เกิดการสร้าง type1 interferon ออกมา [37-40] (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 แสดงบทบาทของ LPS ที่กระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory cytokines และ type 1 interferon [40]

หลังจากที่ macrophage หรือ dendritic cell ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น phagocytic cell และ ตัวนำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cell: APC) ทำการย่อยจุลชีพแล้วนำเสนอชิ้นส่วนของ จุลชีพต่อ naïve T-cells ใน adaptive immunity ได้ และส่วนของ TLR4 ที่ active จะสามารถ กระตุ้น B7 ซึ่งเป็น co-stimulatory molecule [34] เมื่อ naïve T helper cells (Th0) รับรู้ แอนติเจนแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Th1 หรือ Th2 cells ขึ้นกับชนิดของไซโตไคน์ที่มา กระตุ้น ถ้ามี IL-4 กระตุ้นทำให้ Th0 เปลี่ยนแปลงไปเป็น Th2 cells ส่วน IL-12 และ IFN- γ กระตุ้นให้ Th0 เปลี่ยนแปลงไปเป็น Th1 cells ซึ่ง Th1 และ Th2 cells จะหลั่งไซโตไคน์ออกมา แตกต่างกัน โดยที่ Th1 cells หลั่ง IL-2, IFN- γ , TNF- β ส่วน Th2 cells หลั่ง IL-4, IL-5, IL-10 และ IL-13 (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงบทบาทของ TLR ใน Innate immunity และ Acquired immunity [37]

Th1 cytokines ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ phagocyte, cytotoxic T cell, NK cell และการสร้างแอนติบอดีที่ช่วยให้ macrophage เกิดกระบวนการ phagocytosis ได้ดีขึ้น (opsonization) เรียกได้ว่า Th1 cytokines เป็น pro-inflammatory cytokines นั่นเอง ส่วน Th2 cytokines กระตุ้นการทำงานของ eosinophil และเสริม isotype class switching ไปเป็น IgE ซึ่งมีบทบาทมากในการกำจัดหนอนพยาธิและการเกิดภาวะภูมิแพ้ ไซโตไคน์ที่หลังจาก Th1 cells และ Th1 cytokines สามารถยับยั้งการสร้าง Th2 cytokines และ ไซโตไคน์ที่หลังจาก Th2 cells บางชนิดก็สามารถยับยั้งการสร้าง Th1 cytokines ได้เช่นเดียวกัน [41] ในภาวะที่ปริมาณ Th1 และ Th2 cytokines ไม่สมดุลกันจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น ภูมิแพ้ (allergy), autoimmune disease และการติดเชื้อเรื้อรัง เป็นต้น [42-45]

2.2 กระบวนการอักเสบ (Inflammation)

กระบวนการอักเสบ เป็นกระบวนการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกันที่มีความเกี่ยวข้องกับ humoral immune response และ cell-mediated immune response โดยผ่านทางไซโตไคน์หลายชนิด ทำให้เกิดการรวม leukocyte และ plasma protein เข้ามาในบริเวณที่มีการบาดเจ็บ

[46, 47] ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เม็ดเลือดขาวหลัง pro-inflammatory cytokines, chemokines ออกมา และมีการสะสมของเม็ดเลือดแดง [48] ลักษณะของการอักเสบที่ปรากฏออกมาให้เห็น คือ ปวด (pain), บวม (swelling), แดง (redness), ร้อน (heat) [49] มีการศึกษาพบว่า neutrophil เมื่อมาถึงบริเวณที่บาดเจ็บจะ active ทันทีและสามารถกำจัดจุลชีพได้โดยตรงโดยการปล่อยสารที่เป็นพิษในแกรนูลซึ่งก็คือ reactive oxygen species (ROS) , reactive nitrogen species, proteinase3, cathepsin G และ elastase [50] หลังจากกำจัดจุลชีพหมดแล้ว เนื้อเยื่อบริเวณนั้น จะถูกซ่อมแซม โดยมี macrophage เข้ามาเก็บกิน และ pro-inflammatory prostaglandin ถูกเปลี่ยนเป็น lipoxin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น anti-inflammation เพื่อลดการอักเสบ lipoxin จะยับยั้งการรวมตัวกันของ neutrophil และเรียก macrophage มาเก็บกินเซลล์ที่ตายออกไป เพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และ cytokines ที่สำคัญคือ Transforming growth factor - beta (TGF- β) [51, 52] แต่ถ้า innate immunity ไม่สามารถกำจัดจุลชีพได้ กระบวนการอักเสบก็จะดำเนินต่อไป โดยมี T-cells มาเกี่ยวข้อง แต่ถ้าการทำงานร่วมกันยังไม่เพียงพอจะส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) [53] ซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งต่อไปได้ [54] เช่น ผู้ที่ติดแอลกอฮอล์ นำไปสู่การอักเสบของตับและตับอ่อน และทำให้เกิดมะเร็งที่อวัยวะนั้นๆ หรือใน inflammatory bowel disease (IBD) เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *H.pylori* ซึ่งทำให้เป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric carcinoma) เป็นต้น [55, 56] มีการศึกษาพบว่าตัวโมเลกุลที่เชื่อมโยงระหว่างการอักเสบกับการเกิดมะเร็งคือ inhibitor of NF- κ B kinase/ NF- κ B (IKK/NF- κ B) signaling pathway ซึ่งเป็นกระบวนการที่กระตุ้น pro-inflammatory cytokines และ NF- κ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งสามารถกดการตายของเซลล์มะเร็งหรือกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตได้ [57-59]

- **ไซโตไคน์ (cytokine)**

ไซโตไคน์ เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (< 30kDa) สร้างจากเม็ดเลือดขาว และเซลล์ต่างๆ ในร่างกายเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้น ไซโตไคน์ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายโดยจับกับตัวรับ (cytokine receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์นั้นๆ แล้วกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ไซโตไคน์จะจับกับตัวรับด้วย affinity ที่สูงทำให้ออกฤทธิ์ได้ดีมาก ไซโตไคน์เป็นโมเลกุลที่เซลล์ใช้ในการติดต่อสื่อสารซึ่งกันและกัน เช่น T lymphocyte สร้างไซโตไคน์ไปกระตุ้นให้ macrophage สร้างสารทำลายจุลชีพที่อาศัยภายในเซลล์มากขึ้น หรือไปกระตุ้นให้ B

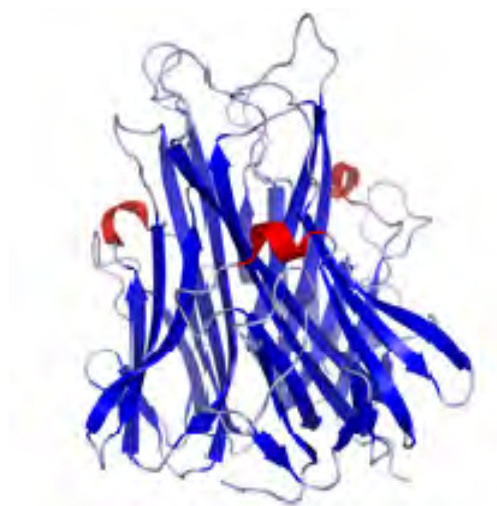
lymphocyte พัฒนาต่อไปและสร้างแอนติบอดีออกมา เป็นต้น เห็นได้ว่าการทำงานร่วมกันในระหว่าง innate immune response และ adaptive immune response การที่ cell-mediated immune response ช่วย humoral immune response ทำงาน หรือแม้กระทั่งการกระตุ้นให้เซลล์ทำลายจุลชีพ ต่างก็มีไซโตไคน์เข้าไปเกี่ยวข้องทั้งสิ้น [60-63]

- **Inflammatory cytokines** คือไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. Pro-inflammatory cytokines

เป็นไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ซึ่งเป็นกลไกที่นำไปสู่การชุมนุมของเซลล์หรือสารต่างๆ ให้มายังบริเวณที่ต้องการให้มีการกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ไซโตไคน์ประเภทนี้จะช่วยให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecules ทำให้เกิดการเพิ่ม vascular permeability และกระตุ้นการสร้าง chemokines จาก endothelial cells ช่วยเซลล์เดินทางมายังบริเวณที่มีการอักเสบได้มากขึ้น ตัวอย่างเช่น $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 และ IL-6 เป็นต้น [2, 3]

1.1 Tumor necrosis factor – alpha ($\text{TNF-}\alpha$)

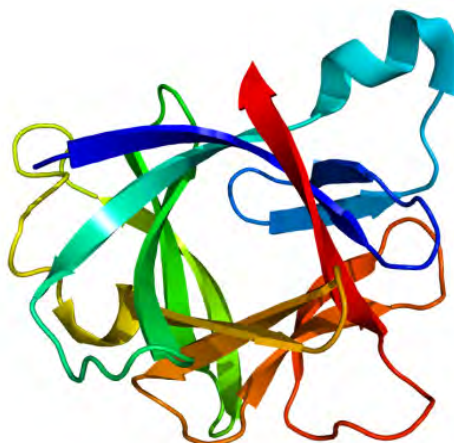


ภาพที่ 2.3 ภาพแสดงโครงสร้างของ $\text{TNF-}\alpha$

(http://www.argyllbiotechnologies.com/SF-1019_immune-overview.html)

TNF- α เป็นยีนซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 233 ตัว มีน้ำหนัก 25.6 kDa [64] และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.3 สร้างจาก macrophage activated T cell และ activated T cell TNF- α เป็นไซโตไคน์ตัวสำคัญต่อการตอบสนองต่อแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งยังมีบทบาทสำคัญระหว่าง innate immune response, adaptive immune response และการเกิด acute inflammation เริ่มแรก TNF- α ถูกสร้างเป็น transmembrane protein ขนาด 25 kDa ต่อมาเกิดกระบวนการ proteolytic ทำให้ TNF- α ถูก cleave เป็นโปรตีนขนาด 17 kDa ซึ่งถูกปล่อยออกสู่ภายนอกในรูป secreted form [65, 66] มีหน้าที่กระตุ้น adhesion molecules และการสร้าง chemokine ของ endothelial cells ทำให้เกิดการดึงดูดเซลล์ต่างๆ เช่น neutrophil, monocyte และ lymphocyte ให้ไปชุมนุมกันบริเวณที่มีการอักเสบ กระตุ้นความสามารถในการกำจัดจุลชีพของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ได้แก่ neutrophil, eosinophil และ mononuclear phagocyte [14] กระตุ้นการสร้าง IL-1 จาก macrophage ทั้งยังทำให้เกิดอาการไข้ เนื่องจากไปออกฤทธิ์ต่อไฮโปทาลามัส ทำให้เกิดการสร้าง prostaglandin และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase 2 (COX-2) ซึ่งช่วยเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อเกิดการอักเสบและเนื้องอก(tumor) จะพบเอนไซม์ COX-2 มาก [67, 68] และ TNF- α ยังกระตุ้นให้เซลล์ตับสร้าง acute phase proteins ในภาวะที่มี TNF- α มากเกินไป TNF- α จะเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดภาวะ septic shock จากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกระแสเลือด โดยพยาธิสภาพเกิดจาก lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อกระตุ้นการสร้าง IL-1 และ IL-6 ซึ่งมีบทบาทคล้ายคลึงกันทำให้เกิดการเพิ่มการเกาะกันของเม็ดเลือดและเกร็ดเลือดกับ endothelial cells เกิดการเพิ่มขึ้นของ vascular permeability ทำให้เซลล์ โปรตีน และของเหลวเดินทางไปยังบริเวณที่มีการอักเสบ ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดในอวัยวะต่างๆ ส่งผลให้ขาดเลือดไปเลี้ยงสมองและหัวใจ [69] สามารถกระตุ้นการสร้างสารที่เป็นพิษต่อยีนในร่างกายได้ เช่น NO, ROS ส่งผลให้เกิด DNA mutation และถูกทำลายในที่สุด [70]นอกจากนั้น TNF- α ยังมีบทบาทสำคัญใน neuropathic pain [71], โรคที่มีพยาธิสภาพของผิวหนังที่ผิดปกติ เช่น psoriasis [72] และพบว่ามีส่วนต่อการเสื่อมของกระดูกในโรค rheumatoid arthritis [73], bladder cancer และ breast cancer [74] นอกจากนี้ยังเป็นตัวรบกวน metabolism เช่น ทำให้ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ เนื่องจาก กดการผลิตน้ำตาลจากตับ [14]

1.2 Interleukin-1 (IL-1)

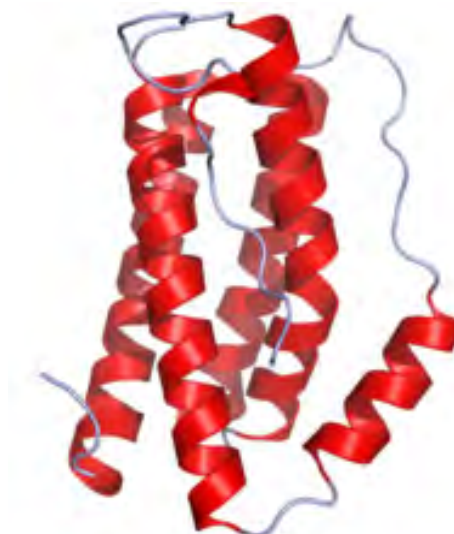


ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงโครงสร้างของ IL-1

(http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_1)

IL-1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 269 amino acids [64] และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.4 สร้างจาก macrophage, endothelial cells และ epithelial cells มีฤทธิ์คล้ายกับ TNF- α คือ กระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecules บนผนังหลอดเลือด การเกิดไข้ กระตุ้นการสร้าง acute phase proteins [75] และเป็นสาเหตุสำคัญในการกระตุ้นเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ซึ่งเป็นสาเหตุของการสลายกระดูก (bone resorption) [76]

1.3 Interleukin-6 (IL-6)



ภาพที่ 2.5 ภาพแสดงโครงสร้างของ IL-6

(http://www.argyllbiotechnologies.com/SF-1019_immune-overview.html)

IL-6 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 ตัว มีน้ำหนัก 26 kDa [64] และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.5 สร้างจาก macrophage, endothelial cells, fibroblast พบว่า LPS, TNF- α และ IL-1 กระตุ้นการหลั่ง IL-6 ได้ IL-6 กระตุ้นการสร้าง acute phase proteins การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของ B-cell การเกิดไข้ และเป็นไซโตไคน์ที่มีความเกี่ยวข้องในโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน (diabetes), โรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis), systemic lupus erythematosus (SLE), มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer), rheumatoid arthritis, mesangial glomerulonephritis และ sepsis [77, 78]

2. Anti-inflammatory cytokines

เป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในภาวะปกติ เมื่อมีการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันก็ต่อมียกลไกที่ยับยั้งการตอบสนองตามมาเพื่อไม่ให้เกิดการตอบสนองมากเกินไป ซึ่งอาจทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อตนเองได้ ตัวอย่างเช่น TGF- β และ IL-10 เป็นต้น

2.1 Transforming growth factor - beta (TGF- β)

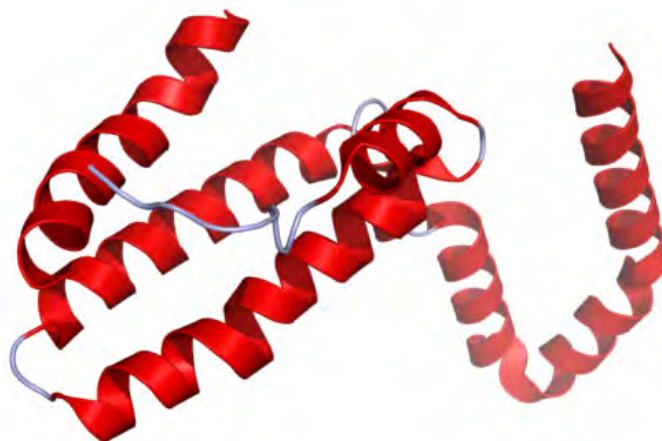


ภาพที่ 2.6 ภาพแสดงโครงสร้างของ TGF- β

(<http://www.cytokines-cks.com/Biological-products/Transforming-growth-factor-beta>)

TGF- β ประกอบด้วยกรดอะมิโน 683 ตัว มีน้ำหนัก 68 kDa [64] และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.5 สร้างจากเซลล์หลายชนิดรวมทั้ง T- cell และ macrophage มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการทำงานของ T- cell, B- cell, macrophage และ regulatory T-cell (T reg) ยับยั้งการเจริญเติบโตของ cytotoxic T-cells (CTLs) ทั้งยังมีฤทธิ์ตรงกันข้ามกับไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบโดยจะออกฤทธิ์ต่อ polymorphonuclear leukocyte และ endothelial cell นอกจากนี้ยังทำให้เกิด isotype class switching ไปเป็น IgA และ IgE มีบทบาทสำคัญใน immunoregulation[79]

2.2 Interleukin-10 (IL-10)



ภาพที่ 2.7 ภาพแสดงโครงสร้างของ IL-10

(http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_10)

IL-10 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 160 ตัว มีน้ำหนัก 18 kDa [64] และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.6 สร้างจาก T-cell และ macrophage เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) สามารถสร้าง IL-10 ได้เช่นเดียวกัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งภูมิคุ้มกันโดยยับยั้งการสร้าง IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6 และ chemokine ลดการทำงานของ dendritic cell และ macrophage ทั้งยังลดการแสดงออกของ MHC II molecules และ co-stimulatory molecules บน macrophage และ dendritic cells ซึ่งก็คือการยับยั้งการกระตุ้น cell-mediated immune response [14] จากการศึกษพบว่า IL-10 เมื่อจับกับตัวรับจะส่งสัญญาณผ่านทาง JAK/STAT

pathway ซึ่งไปยับยั้งสัญญาณใน NF- κ B signaling pathway [80] และสามารถควบคุมการ apoptosis และกดกระบวนการ angiogenesis ของ tumor ได้ [81] ในสัตว์ทดลองพบว่าถ้าไม่มี IL-10 จะมีภาวะการอักเสบมากเกินไป เช่น inflammatory bowel disease ซึ่งเกิดจากการกระตุ้น macrophage มากเกินไปโดยไม่มีการควบคุม นอกจากนี้ยังพบในโรคมะเร็ง และ autoimmune disease อีกด้วย [82]

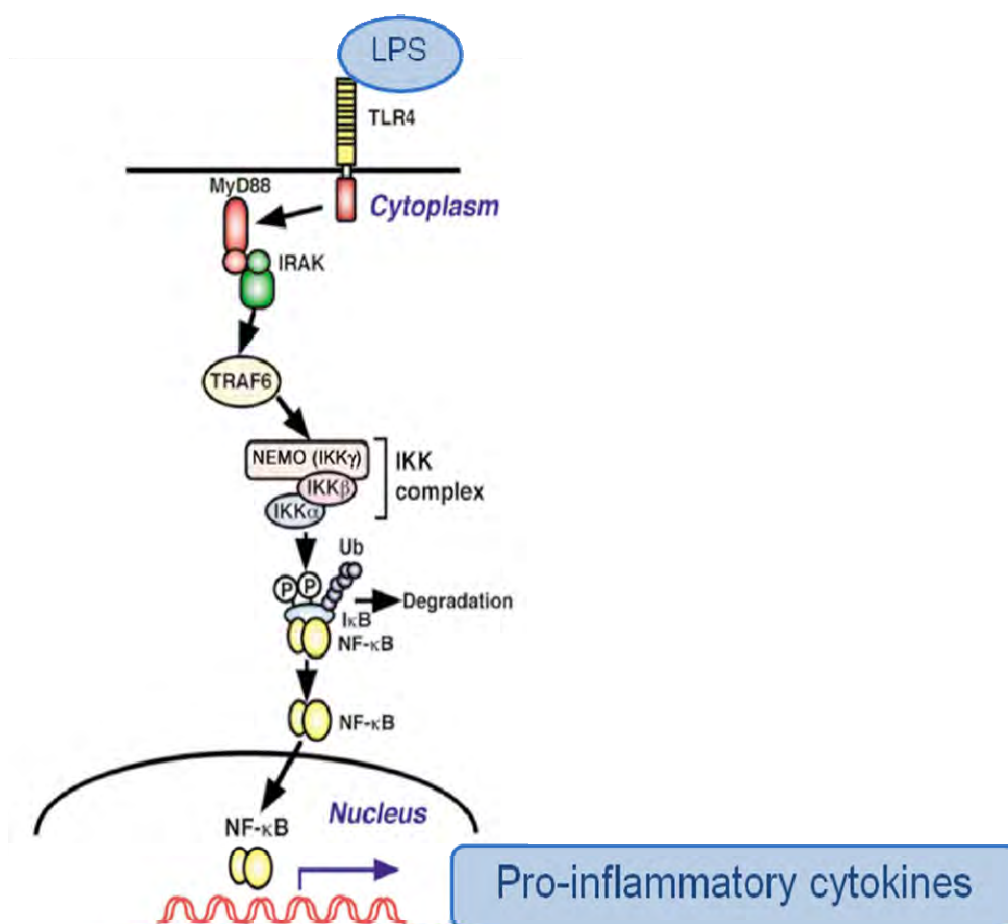
- Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs เป็นต้นแบบที่ดีที่ใช้ในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกัน PBMCs ประกอบไปด้วย monocyte, macrophage, T-cell และ B-cell เป็นจำนวนมาก และมีปริมาณของ NK cells และ dendritic cells อยู่ปริมาณเล็กน้อย มีการศึกษาว่าถ้ากระตุ้น PBMCs ด้วย LPS จะสามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage, B-cell และ natural killer(NK) cell ได้ พบว่า LPS สามารถกระตุ้น macrophage และ mature B-cell ให้หลั่ง IL-6 ทั้งยังกระตุ้น macrophage และ NK cell ให้หลั่ง TNF- α นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ B-cell และการสร้างแอนติบอดี [83, 84]

- NF- κ B signaling pathway

NF- κ B (nuclear factor kappa B) เป็นโปรตีนซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองในกระบวนการอักเสบ เช่น TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 และ COX-2 เป็นต้น [85, 86] ซึ่งขบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้จากการกระตุ้นของ pathogen เช่น LPS เกิดการส่งสัญญาณผ่าน adaptor protein ต่างๆ ไปสู่การกระตุ้น NF- κ B ซึ่งประกอบไปด้วย subunit ต่างๆ ได้แก่ p50, p52 , p65 (Rel A), RelB และ c-Rel แต่ active form ที่พบได้มาก คือ p50 หรือ p52 ที่เกิดเป็น heterodimer กับ p65 NF- κ B ที่พบในไซโตพลาสซึมจะอยู่ในรูปของ inactive form จะถูกจับด้วย inhibitor of NF- κ B (I κ B) ประกอบด้วย 3 isoforms ได้แก่ I κ B α , I κ B β และ I κ B ϵ ซึ่งมีความจำเพาะในการจับ NF- κ B แตกต่างกันไป เช่น I κ B α มักจับกับ heterodimer ของ p50/p65 และ homodimer ของ p50 ส่วน I κ B β จับกับ p50/p65 มากกว่า

p50/Rel-B และ p50/c-rel ส่วน I κ B ϵ จับกับ c-Rel เป็นต้น กระบวนการดังกล่าวทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเข้าสู่นิวเคลียสและทำงานได้ แต่เมื่อมี I κ B kinase (IKK) ซึ่งประกอบไปด้วย 3 subunits ได้แก่ IKK- α , IKK- β และ IKK- γ โดยการทำงานของ IKK เริ่มจาก IKK- α มาเติมหมู่ฟอสเฟตที่ serine ตำแหน่ง NH₂-terminal ของ I κ B แล้ว จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเติม ubiquitin protein และถูกย่อยสลายด้วย 26S proteasome ทำให้ NF- κ B หลุดออกจาก I κ B แล้วเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส เพื่อจับกับ promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องบริเวณ NF- κ B binding site ทำให้เกิดการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) ต่อไป [87, 88] ซึ่งในที่นี่จะเกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ออกมา (ภาพที่ 2.8) มีการศึกษาพบว่า การทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้นในโรคต่างๆ ดังนี้ Rheumatoid arthritis, Atherosclerosis, Asthma และ Inflammatory bowel disease [89-92]



ภาพที่ 2.8 แสดงการทำงานของ LPS ผ่านทาง NF- κ B signaling pathway [93]

- ยาด้านการอักเสบที่ใช้ในปัจจุบัน

ยาด้านการอักเสบในปัจจุบันเน้นไปที่การยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ซึ่งมีความจำเพาะในกระบวนการอักเสบ ตัวอย่างเช่น Acetylsalicylic acid (ASA) และ Sodium salicylate จะไปจับบริเวณ binding site ของ ATP บน IKK ส่งผลให้ IKK ไม่สามารถเติมฟอสเฟตแก่ I κ B ได้ [94] Indomethacin และ Sulindac เป็นยาในกลุ่ม NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) ทำหน้าที่ลดการทำงานของ IKK β ทำให้ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B [95] รวมถึง Hydrocortisone ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม glucocorticoids เป็นกลุ่มยาที่ใช้ยาด้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกันอย่างแพร่หลาย โดย Hydrocortisone มีหน้าที่เพิ่มปริมาณของ I κ B- α และลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B ใน PBMC [96] ที่น่าสนใจกว่านั้นคือ สารประกอบจากธรรมชาติ เช่น sesquiterpene lactones ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในหญ้าหมอนน้อย มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้ง I κ B phosphorylation เพื่อที่จะหยุดการทำงานของ NF- κ B ในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ T-cell, macrophage และ epithelial cell [97-100] และยังพบว่าสารประเภท Luteolin ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสารประกอบ flavonoid สามารถยับยั้งการทำงานของ IKK และยับยั้ง I κ B phosphorylation ได้อีกด้วย [101]

2.3 หญ้าหมอนน้อย (*Vernonia cinerea* Less.)

หญ้าหมอนน้อยหรือหญ้าดอกขาวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vernonia cinerea* Less. จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูง 15-80 เซนติเมตร ลำต้นแข็งเป็นทรงกระบอกมีร่องตามแนวตั้ง ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ ใบรีแคบ รูปไข่ รูปหอก หรือรูปแถบ ใบที่โคนต้นขนาดใหญ่กว่าที่ปลายยอด ใบที่โคนต้นกว้าง 1.5-3.5 ซม. ยาว 3-8.5 ซม. ใบที่บริเวณปลายยอดกว้าง 3-15 มม. ยาว 1-7 ซม. ขอบใบหยักตื้นๆ ไม่สม่ำเสมอ มีดอกเป็นช่อกระจุกแน่น แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก ช่อดอกมีกลีบรองดอกรูปร่างยาว หรือเป็นเส้นแหลมขนาดเล็กๆ เมื่อดอกบานจะเป็นสีม่วงสด [9] ดังแสดงในภาพที่ 2.9 พบว่าหญ้าหมอนน้อยมีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปในเขตร้อนแถบแอฟริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย [102] ทั้งยังเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปตามที่รกร้างข้างทางในทุกภาคของประเทศไทย ชื่อที่เรียกกันตามท้องถิ่นต่างๆ เช่น หญ้าดอกขาว หญ้าล่อง หญ้าสามวัน หญ้าผ้าสาม หญ้าหนวดแป้ง ฉัตรพระอินทร์ ม่านสวรรค์ ก้าน

รูป ฝรั่งสามโคก ซางห่างฉาว เสือสามขา เขียวหัวเสา เป็นต้น [103] ในภูมิปัญญาไทย มีการนำลำต้นมาต้ม เอน้ำกินเป็นยาแก้ไข้ ปวดท้องเฟ้อ แผลบวมอักเสบ ความดันโลหิตสูง หรือใช้ตำให้ละเอียดเอามาพอก แก้มคัด ดูดหนองแก้บวม ใบใช้ขับ นำมาตำให้ละเอียดใช้พอกแผล ช่วยสมานแผล แก้มตาฟาง ถอนพิษ แก้อักเสบ ลดบวม แก้มตาแดง ตาแฉะ แก้หืด แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ รักษาสะเก็ดเงิน แก้มกลากเกลื้อน รักษาหลอดลมอักเสบ แก้ไข้ แก้ระดูขาว และรักษามาลาเรีย ดอกใช้แก้ไข้ แก้เยื่อตาอักเสบ และรักษาโรครูมาตอยด์ ส่วนเมล็ดนำมาป่นให้ละเอียด ใช้ชงกับน้ำร้อนกินเป็นยาขับพยาธิเส้นด้าย บัสสาวะขัด แก้ไอ แก้ปวดท้อง ทั้งต้นมีสรรพคุณในการลดไข้ รักษาตับอักเสบ ลดความดันโลหิต รักษาแผลบวมอักเสบ นอกจากนั้นยังใช้ในการเลิกบุหรี่ [104] ลดอาการหอบหืด ไอเรื้อรัง และใช้รักษาโรคไขข้อได้อีกด้วย [9]



ภาพที่ 2.9 ลักษณะของหมอนน้อย

สารเคมีที่สำคัญที่ค้นพบในหมอนน้อยส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม flavonoids, triterpenoids และ steroids ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงสารประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของหญ้าหมอน้อย [10, 105 -115]

ส่วนที่พบ	ตัวทำละลาย	ชื่อสาร	ประโยชน์
ทั้งต้น	-	Apigenin	ต้านอักเสบ, สารต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการติดเชื้อไวรัส
	-	Chlorogenic acid	สารต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการเกิดเนื้องอก , ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัสและเป็น antimutagenic
	-	Lupeol acetate	สารต้านอนุมูลอิสระ, ต้านอักเสบ, ต้านการเกิดเนื้องอก, เป็น antimutagenic และ antiarthritic
	-	β -amyrin acetate	ต้านอักเสบ, สารต้านอนุมูลอิสระ
	-	Stigmasterol	ต้านอักเสบ, ต้านการเกิดมะเร็ง , ต้านการสลายของกระดูก, เป็นสารตั้งต้นของสเตอรอยด์ฮอร์โมน
ดอก	เอทานอล	Tannin	ใช้ห้ามเลือด, แก้ท้องเสีย, ต้านอักเสบ, ต้านการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส
ใบ	คลอโรฟอร์ม, บีโตรเลียมอีเทอร์	Saponin	ลดไข้, ต้านอักเสบ, บรรเทาอาการปวด
	เมทานอล	Luteolin 7-O-glucoside	ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย, ต้านอักเสบ, แก้ไอ, ยาแก้คัน
	เมทานอล	Quercetin 7-O-glucoside 3-O-rhamnoside	ต้านอักเสบ, สารต้านอนุมูลอิสระ
	เอทานอล	Potassium chloride	เป็นแร่ธาตุเสริมโพแทสเซียม

ส่วนที่พบ	ตัวทำละลาย	ชื่อสาร	ประโยชน์
ลำต้น	เอทานอล	Potassium chloride	เป็นแร่ธาตุเสริมโพแทสเซียม
	เอทานอล	Potassium nitrate	ลดอาการเสียวฟัน, ใช้ขยับปัสสาวะ
	เอทานอล	Succinic acid	ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย, ต้านอักเสบ
	เอทานอล	Vernolide-A,B	ต้านมะเร็ง
ราก	เอทานอล	Potassium chloride	เป็นแร่ธาตุเสริมโพแทสเซียม
	เอทานอล	Potassium nitrate	ลดอาการเสียวฟัน, ใช้ขยับปัสสาวะ

- การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหญ้าหมอน้อย

1. ฤทธิ์ต้านอักเสบ

เมื่อนำใบหญ้าหมอน้อยมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform), เมทานอล (methanol) และอีเทอร์ (ether) แล้วฉีดให้หนูทดลอง พบว่ามีฤทธิ์ลดไข้, บรรเทาปวด และต้านการอักเสบ ในหนูทดลอง [10] นอกจากนั้นดอกของหญ้าหมอน้อยยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่ถูกทำให้เป็น arthritis [11] และสารสกัดจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยจากเมทานอลสามารถลดปริมาณของ nitric oxide (NO) และ pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 และลดการแสดงออกของ mRNA ในยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ได้อีกด้วย [13] นอกจากนั้นสารสกัดเมทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย เมื่อนำไปฉีดให้หนูทดลองในขนาด 200 และ 500 mg/kg ทำให้ลดการอักเสบได้ [116]

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยจากตัวทำละลายเมทานอล สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ glutathione-S-transferase ในเลือดเพิ่มขึ้น และมี lipid peroxidation activity ลดลง [12]

3. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

สาร Vernolide – A และ B ซึ่งอยู่ในกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่สกัดจากลำต้นของหญ้าหมอน้อยด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ดังนี้ KB (มะเร็งในช่องปาก), DLD-1 (มะเร็งลำไส้ใหญ่), NCI-661 (มะเร็งปอดขนาดใหญ่) และ Hela (มะเร็งปากมดลูก) [117] นอกจากนี้การศึกษาของ สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้นหญ้าหมอน้อยยับยั้ง การ metastasis ในปอด ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย B16F-10 melanoma cells ในหนูทดลองได้ โดยยับยั้ง lung tumor formation ทั้งยังลดระดับของ Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด angiogenesis ในหนูทดลองได้ [112]

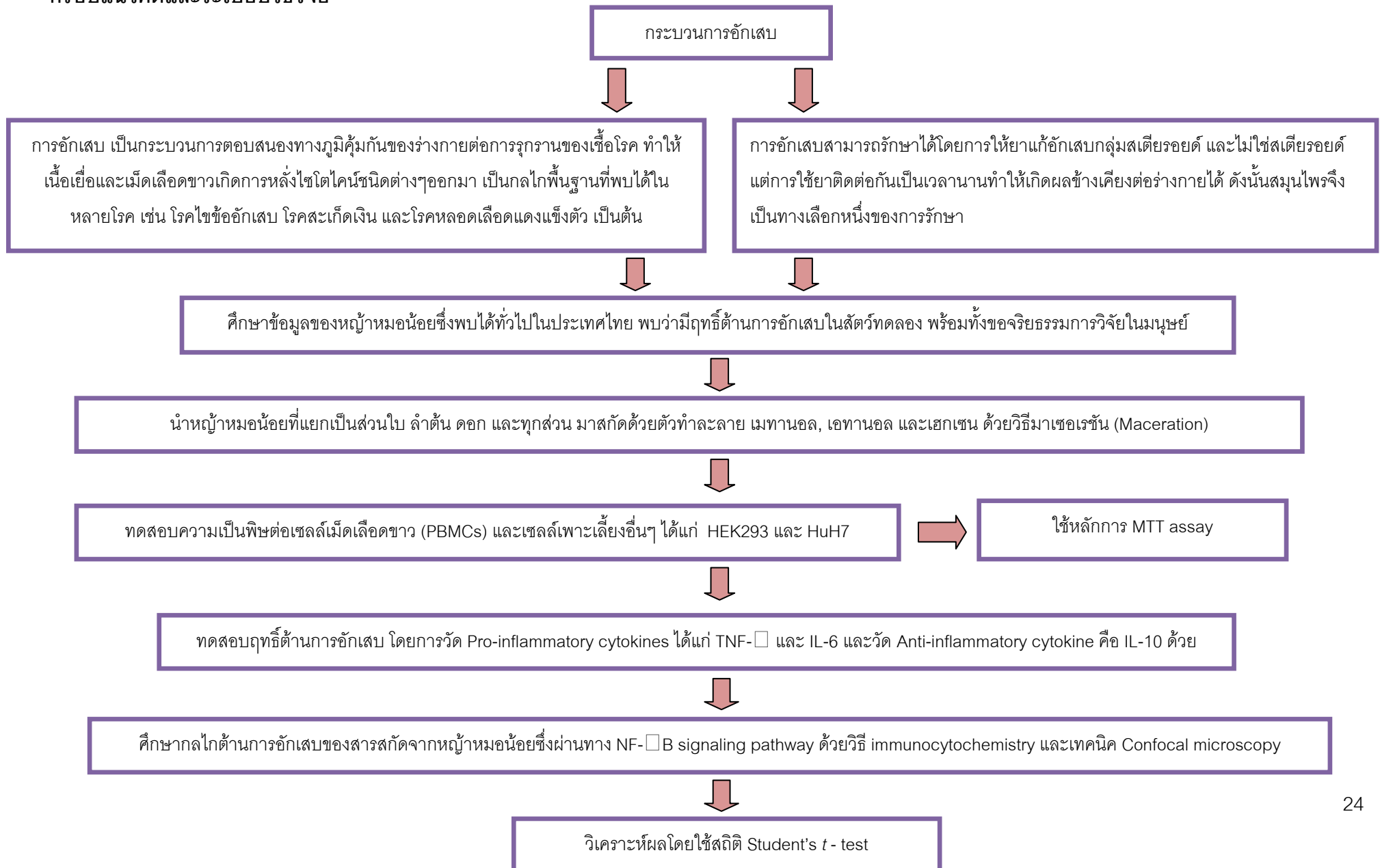
4. ฤทธิ์ลดการสูบบุหรี่

เมื่อนำทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยมาต้มเป็นชา สามารถทำให้เลิกบุหรี่ได้ [118] นอกจากนี้ ถ้าให้คนที่สูบบุหรี่ทานชาชงหญ้าหมอน้อยควบคู่กับการออกกำลังกาย ทำให้ลดอัตราการสูบบุหรี่ ส่งผลให้ระดับคาร์บอนมอนอกไซด์ในลมหายใจลดลง และสามารถลด oxidative stress ได้ [104]

5. ฤทธิ์อื่นๆ

ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย, เชื้อราและไวรัส ถ้ายพยาธิ ลดปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ [119, 120]

กรอบแนวคิดและระเบียบวิธีวิจัย



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัยมีดังนี้

1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

1.1.1 เซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) ซึ่งได้มาจากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยได้แก่ บุคลากรและนิสิตคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มีสุขภาพดี จำนวน 20 คน

จำนวนผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยที่ต้องการศึกษาคำนวณจากสูตร ดังนี้ [131]

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 / d^2$$

n คือ จำนวนคนที่ต้องการศึกษา

$Z_{\alpha/2}$ คือ ค่า Z ของ type I error ซึ่งตั้งค่า 0.05 , $Z_{\alpha/2} = 1.96$

Z_{β} คือ ค่า Z ของ type II error ซึ่งตั้งค่า 0.1 , $Z_{\beta} = 1.28$

σ^2 คือ variance of difference จากงานวิจัยก่อนหน้า [132-134]

d^2 คือ ค่าความแตกต่างของค่าระหว่างสองกลุ่มทดลอง

ดังนั้น จำนวนผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย = $(1.96+1.28)^2(1.5)^2/(1.9)^2 = 7$ คน

ดังนั้นจำนวนผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยควรมากกว่า 7 คน คณะผู้วิจัยจึงได้กำหนดจำนวนผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยเป็น 20 คน เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัยทำการเก็บเลือด (EDTA blood) จากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยได้แก่ ผู้บริจาคโลหิตที่ศูนย์บริจาคโลหิตสภากาชาดไทย หรือบุคลากรและนิสิตคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มีสุขภาพดี ซึ่งในระหว่างนั้นต้องมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการเจ็บป่วยใดๆ โดยอาศัยจากการซักถามจากแบบสอบถาม จำนวน 20 คนซึ่งเป็นจำนวนที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษา PBMC โดยอ้างอิงจากงานวิจัยที่ผ่านมา แบ่งเป็นชายจำนวน 10 คน และ หญิงจำนวน 10 คน คนละ 30 ซีซี (6 ซ้อนชา) โดยแบ่งเป็น เจาะเลือด 25 ซี.ซี (5 ซ้อนชา) เพื่อนำมาใช้ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว และศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร

สกัดส่วนต่างๆของหญ้าหมอน้อย โดยวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งการทดลองดังกล่าวใช้ผู้ร่วมวิจัยจำนวน 14 คน และเจาะเลือดอีก 5 ซี.ซี (1 ซ้อนชา) เพื่อนำมาศึกษากลไกด้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF-κB signaling pathway ด้วยวิธี immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy ซึ่งการทดลองดังกล่าวใช้ผู้ร่วมวิจัยจำนวน 6 คน เหตุผลที่เจาะเลือดปริมาณแตกต่างกัน เพราะว่าเป็นการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยทำแตกต่างกัน 10 ความเข้มข้น แล้วนำความเข้มข้นที่เลือกแล้ว 4 ความเข้มข้นมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป และมีอาจารย์ที่ปรึกษาหลักและผู้วิจัย สังกัดคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นนักเทคนิคการแพทย์ที่มีใบประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ เลขที่ ทน 2865 และ ทน 9487 เป็นผู้เจาะเลือด ซึ่งผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยต้องได้รับข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และหนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยที่ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หากเกิดความผิดปกติหรือผลข้างเคียงขณะเจาะเลือด ทางคณะผู้วิจัยจะทำการปฐมพยาบาลและทำการรักษาต่อไปโดยคณะผู้วิจัยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด และ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตัวอย่างเลือดที่เก็บทั้งหมดจะถูกทำลายโดยไม่นำกลับไปใช้ในงานวิจัยอื่น

ผลงานวิจัยจะถูกส่งไปให้ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยได้รับทราบ หากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยต้องการรับทราบผลงานวิจัย และผลงานวิจัยนี้ทำให้เกิดองค์ความรู้เพื่อไปต่อยอดงานวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรไทยสำหรับลดการอักเสบในโรคต่างๆ ซึ่งไม่มีผลข้างเคียงหรือผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยขึ้นกับ Inclusion criteria และ Exclusion criteria ดังต่อไปนี้

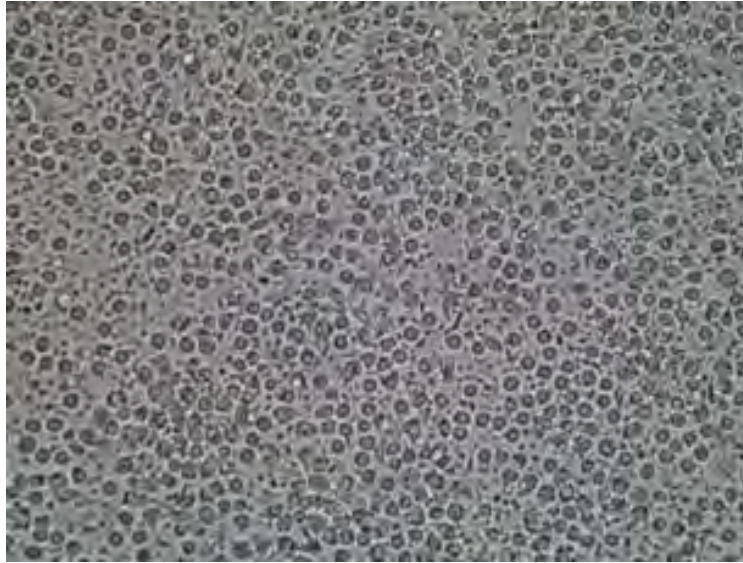
Inclusion criteria

1. ประชากรชายหรือหญิงอายุระหว่าง 20 – 40 ปีที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
2. สุขภาพทั่วไปสมบูรณ์ดี ไม่เป็นไข้หวัด เจ็บคอ ปวดศีรษะ ไม่มีภาวะเจ็บป่วยหรืออยู่ระหว่างรับประทานยาใดๆที่ใช้รักษาโรค โดยเฉพาะยาแก้อักเสบ หรือยาปฏิชีวนะ ต้องหยุดยาแล้วอย่างน้อย 7 วัน
3. ไม่มีประวัติการเป็นโรคที่เป็นอุปสรรคต่องานวิจัย ดังต่อไปนี้
 - โรคอักเสบ เช่น ตับอักเสบ, สะเก็ดเงิน
 - โรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน, มะเร็ง

- โรคติดเชื้อ เช่น เอดส์, ตับอักเสบบ
- โรคทางภูมิคุ้มกัน เช่น ภูมิแพ้ , Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

Exclusion criteria

1. ประชากรที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
2. มีประวัติการดื่มสุรา และการสูบบุหรี่
3. อยู่ในภาวะตั้งครรภ์

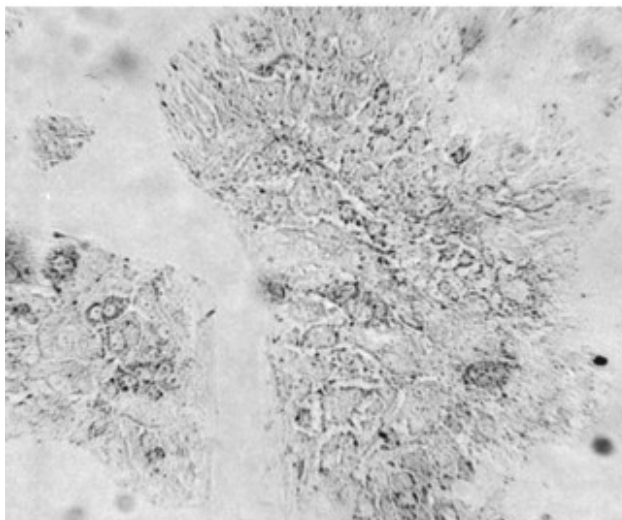


ภาพที่ 3.1 PBMCs (peripheral blood mononuclear cells)

(จาก <http://www.ers-education.org>)

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ RPMI-1640 medium (Hyclone) ที่ผสมกับ fetal bovine serum (Hyclone) 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100 µg/ml (Hyclone) โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

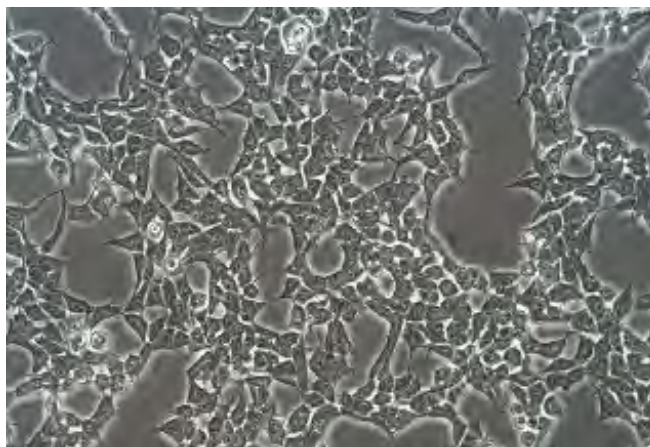
1.1.2 เซลล์มะเร็งตับมนุษย์ HuH7 (Hepato cellular carcinoma cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี



ภาพที่ 3.2 เซลล์ HuH7 (Hepato cellular carcinoma cell line) [109]

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ RPMI-1640 medium (Hyclone) ที่ผสมกับ fetal bovine serum (Hyclone) 10% (v/v) โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

1.1.3 เซลล์มะเร็งไตมนุษย์ HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.นพ.ดร.วันล่า กุลวิฑิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพ 3.3 เซลล์ไต HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cell line)

(จาก <http://www.cell-lines-service.de>)

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) (Hyclone) ที่ผสมกับ fetal bovine serum (Hyclone) 10% (v/v) โดยนำ เซลล์มาบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

1.2 ตัวอย่างของสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ หญ้าหมอนน้อย (หญ้าดอกขาว) ซึ่งเก็บมาจาก จังหวัดกำแพงเพชร ส่วนของหญ้าหมอนน้อยที่นำมาศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ ดอก ใบ ลำต้น และทั้งต้น และระบุชนิดและเก็บตัวอย่างของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ที่พิพิธภัณฑสถาน ศ. กสิน สุวตะพันธ์และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้รายละเอียดดังนี้ ชื่อไทยคือ หมอนน้อย ชื่อสามัญคือ Little iron weed ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Vernonia Cinerea* (L.) Less. อยู่ในวงศ์ Compositae (Asteraceae) และได้รับ voucher specimen เลขที่ 013426 (BCU)

1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยสามารถแบ่งได้เป็น 5 หมวด คือ

1.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดหญ้าหมอน้อย

Ethanol	Merck, เยอรมนี
Methanol	Merck, เยอรมนี
Hexane	Merck, เยอรมนี

1.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation

Hank's balanced salt solution (HBSS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Ficoll- hypaque solution	Lymphoprep, นอร์เวย์
Tryphan Blue stain 0.4%	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

1.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าหมอน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (PBMC) เซลล์ในช่องท้อง ได้แก่ HEK293 และ HuH7

RPMI-1640 (with L-glutamine)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Dulbecco's modified Eagle's medium/ High glucose (DMEM : with 4 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose Without Sodium Pyruvate)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 units/ml Penicillin/ 10,000 µg/ml Streptomycin)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Phosphate buffer saline (PBS; without calcium and Magnesium)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
0.25 % EDTA- Trypsin (1x)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,
5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Biobasic , แคนาดา

1.3.4 สารเคมีที่ใช้ในศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อย

Human TNF- α ELISA Development Kit	Peprotech, สหรัฐอเมริกา
Human IL-6 ELISA Development Kit	Peprotech, สหรัฐอเมริกา
Human IL-10 ELISA Development Kit	Peprotech, สหรัฐอเมริกา
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, ออสเตรเลีย
Polyxyethylene-20 sorbitan monolaurate (Tween-20)	Biobasic , แคนาดา
ABTS Liquid Substrate Solution	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dulbecco's PBS	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

1.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษากลไกต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF- κ B signaling pathway

NF- κ B p65 Rabbit monoclonal antibody	Cell Signalling , แคนาดา
Anti-rabbit IgG (Alexa Fluor [®] 555 Conjugate)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
4',6-diamidino-2'-phenylindole (DAPI)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Triton X-100	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

2. เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

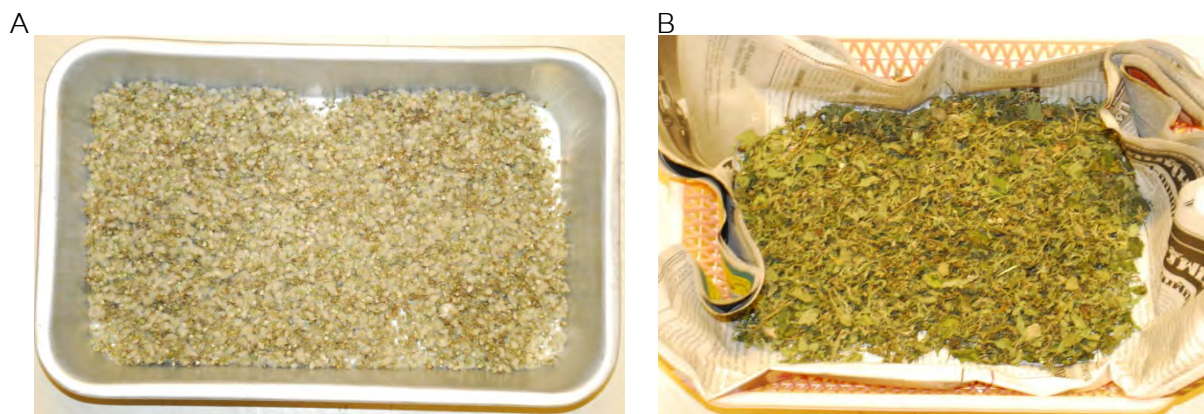
Glassware	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Mivac Quattro concentrator	GeneVac [®] , สหรัฐอเมริกา
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
96 well cell culture plate flat bottom with lid	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
24 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
Laminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Cell Culture Flask (25,75 cm ²)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้
Centrifuge	Beckman coulter, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Analytical Balances	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Autopipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Multichannel pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Cryovial tube 2.0 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Microcentrifuge tube (0.6 ml)	Axyen scientific, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Biologix Research company, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (10,200, 1000 µl)	Sorenson [™] BioScience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldn Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี

Water Bath	Memmert, เยอรมนี
Laser scanning microscope (LSM 700)	Carl Zeiss, เยอรมนี
Microplate Reader	Biotek, สหรัฐอเมริกา
Glass slide microscope	Sail brand, จีน
Coverslip	German cover glasses, เยอรมนี
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
- 80 °C ULT Deep Freezer	IIShin Lab, เกาหลีใต้
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา

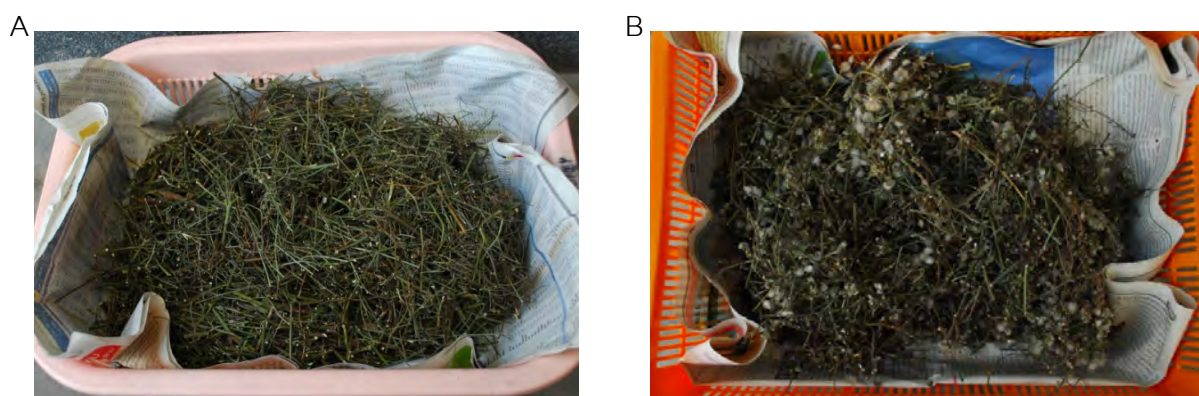
3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยด้วยตัวทำละลายโดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration)

หญ้าหมอน้อยที่ใช้ในงานวิจัยนี้เก็บมาจากจังหวัดกำแพงเพชร และถูกนำส่งไประบุชื่อ วิทยาศาสตร์ที่พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธ์ุและหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งกระบวนการสกัดเริ่มจาก นำหญ้าหมอน้อยมาแยกออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ดอก, ใบ, ลำต้น และทั้งต้น จากนั้นนำส่วนต่างๆ ของหญ้าหมอน้อยที่แยกได้มาตากแดดจนแห้งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นตั้งแต่ส่วนของหญ้าหมอน้อยมา 5 กรัมแช่ในตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่ อุณหภูมิห้อง ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล เอทานอล และ เฮกเซน เรียกวิธีการ สกัดนี้ว่า วิธีมาเซอเรชัน ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชหรือสมุนไพรโดยการหมักพืชหรือ สมุนไพรกับตัวทำละลายจนกระทั่งเนื้อเยื่อของพืชหรือสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถ แทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในพืชหรือสมุนไพรออกมาได้ ซึ่งจะเก็บตัวทำละลาย ออกมาทุกๆ 72 ชั่วโมง โดยกรองส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงใส่ตัวทำละลาย ใหม่เข้าไป และทำเช่นนี้เป็นเวลา 3 ครั้ง เนื่องจากถ้าไม่มีการเปลี่ยนตัวทำละลายในการหมักซึ่งใช้ ระยะเวลาานาน ทำให้สารสกัดถึงจุดอิ่มตัว ทำให้ได้สารสกัดออกมาน้อยลง หลังจากนั้นเตรียมสาร สกัดหยาบ (crude extract) โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธี Evaporation ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ละลายสารสกัดหยาบให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย DMSO (Merck, Germany)



ภาพที่ 3.4 (A) ส่วนดอกของหญ้าหมอน้อยที่ผ่านการตากแห้งแล้ว (B) ส่วนใบของหญ้าหมอน้อยที่ผ่านการตากแห้งแล้ว

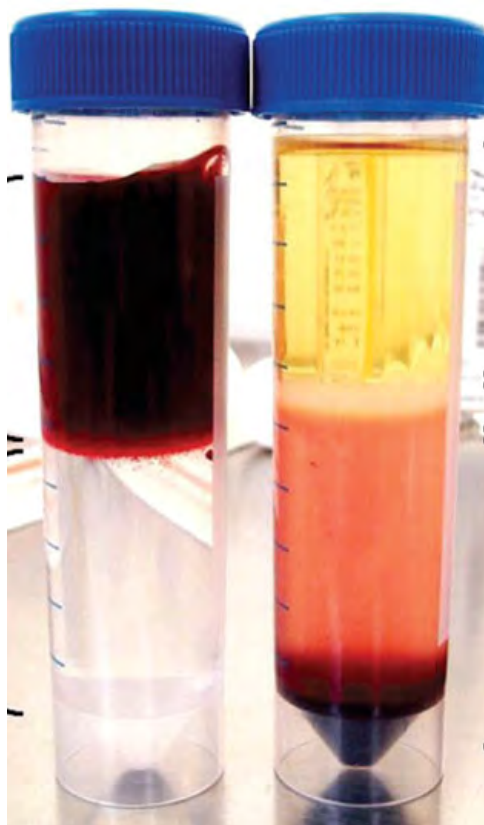


ภาพที่ 3.5 (A) ส่วนลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ผ่านการตากแห้งแล้ว (B) ส่วนทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ผ่านการตากแห้งแล้ว

3.2 การแยก PBMCs ด้วยวิธี density gradient centrifugation

คณะผู้วิจัยทำการเก็บเลือด (EDTA blood) จำนวน 25 มิลลิลิตรจากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยได้แก่ บุคลากรและนิสิตคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มีสุขภาพดี ซึ่งในระหว่างนั้นต้องมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการเจ็บป่วยใดๆ โดยอาศัยจากการซักถามจากแบบสอบถาม จำนวน 20 คน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการวิจัยเลขที่ 103.1/53 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

เมื่อได้เลือดมาแล้วนำไปแยก PBMCs โดยวิธี density gradient centrifugation ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ เทเลือดทั้งหมดใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Hank's balanced salt solution (HBSS) ลงไปในอัตราส่วนเลือดต่อ HBSS เป็น 1:2 ผสมกันแบบ inverse แล้วนำไปปั่นที่ 800 g เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูด plasma และ HBSS ที่อยู่ด้านบนออก จากนั้นเติม HBSS ลงไปอีกครั้งเท่ากับสารละลายที่ดูดออก ผสมกันแบบ inverse แล้วจึงดูดย้ายทั้งหมดไปยังหลอดใหม่ที่มี Ficoll – hypaque solution ซึ่งมี specific gravity 1.077 โดยเติมในอัตราส่วนเลือดต่อ Ficoll – hypaque เป็น 4:3 ค่อยๆ เทเลือดลงบน Ficoll – hypaque solution ช้าๆ อย่าให้เกิดการฟุ้งกระจาย จากนั้นนำไปปั่นที่ 800 g เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา จะเห็นชั้น PBMCs ปรากฏขึ้นมาเป็นชั้นขุ่นๆ บางๆ ให้ดูดย้ายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นล้างเซลล์โดยการเติม HBSS ลงไปปั่นล้างที่ 400 g เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้ว resuspend ด้วย RPMI-1640 medium ที่ผสมกับ fetal bovine serum 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจนับจำนวนเซลล์และดู % viability ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion method [110] ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ สี trypan blue จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ลักษณะวาวใส ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วเยื่อหุ้มเซลล์จะขาดคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน สี trypan blue จะสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ติดสีน้ำเงิน โดยมีวิธีการดังนี้ นำเซลล์มาข้อมด้วยสี trypan blue ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer และคำนวณ % cell viability



ภาพที่ 3.6 หลอดทางซ้ายคือเลือดที่ใส่ลงไป ใน Ficoll – hypaque solution เกิดการแยกเช่นกัน
อย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำไปปั่นชั้น PBMCs จะแยกตัวออกมาเป็นชั้นขาวๆบางๆ ในหลอดทางขวา

(จาก www.kalpkrushi.in)

3.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าหมอน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (PBMCs) ด้วยวิธี MTT assay

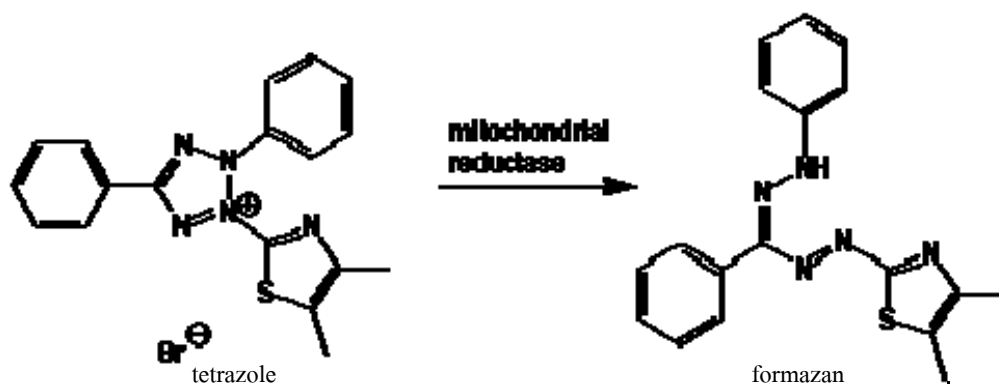
3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100 mg/ml (ในตัวทำละลาย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์) มาเจือจางใน RPMI-1640 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91 และ 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อ PBMCs ด้วยวิธี MTT assay สารสกัดจะถูกเจือจางลงอีก 10 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นสูงสุดของ DMSO ในสารสกัดทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจะไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และเตรียม

control solvent คือสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยเจือจางใน RPMI-1640

3.3.2 ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดจากใบของหญ้าหมอน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (PBMCs) ด้วยวิธี MTT assay

เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan สีม่วงอยู่ที่ก้นหลุม สามารถละลายตะกอน formazan ด้วยสารตัวทำละลาย เช่น DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.7 ปฏิกริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay
(จาก http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 wells plate) ใช้จำนวนเซลล์ PBMCs ต่อหลุมเท่ากับ 1×10^5 เซลล์ จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) สารสกัดจากของหญ้าหมอน้อยในตัวทำละลายต่างๆที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 – 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2.) DMSO 0.1 เปอร์เซ็นต์ 3.) DMSO 100 เปอร์เซ็นต์เป็น positive control 4.) อาหารเลี้ยงเซลล์เป็น negative control โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาหยอดน้ำยา MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์,

pH 7.5) 20 ไมโครลิตร ต่อจากนั้น incubate ที่ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาปั่นที่ 2000 rpm 10 นาที แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ละลายตะกอนด้วย DMSO นำมาปั่นที่ 2000 rpm 10 นาที ย้ายส่วนใส 100 ไมโครลิตรมาหยันจานเพาะเลี้ยงใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร สุดท้ายคำนวณหาค่า % cell viability และ IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration)

คำนวณ % cell viability ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{treated cell-blank}) * 100}{(\text{untreated cell} - \text{blank})}$$

คำนวณ IC₅₀ จาก Logarithmic graph

จากขั้นตอนนี้จะทำการเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม 4 ความเข้มข้นที่มากที่สุดซึ่งไม่ทำให้ % cell viability ของ PBMCs ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อไป

3.4 ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อย โดยวัดระดับไซโตไคน์ ด้วยเทคนิค sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

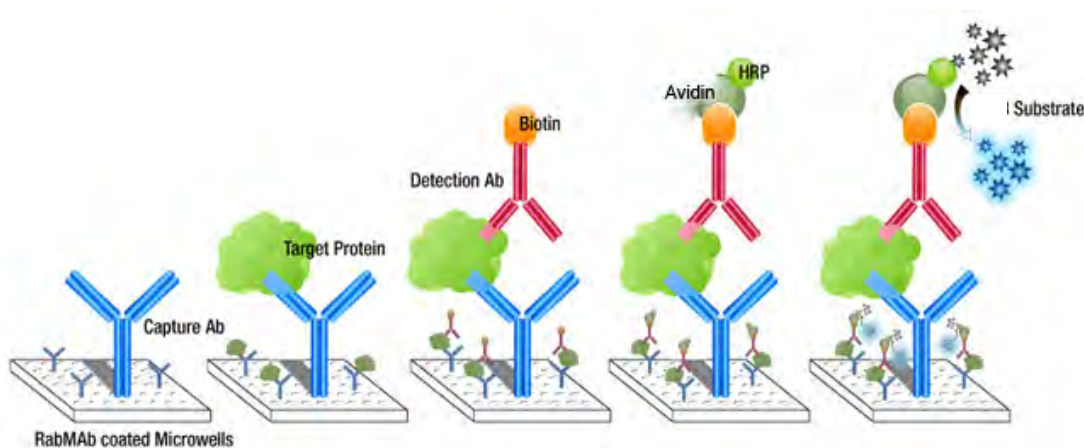
3.4.1 การเก็บ cell culture supernatant

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24 well-plate) โดยใช้ PBMCs จำนวน 2×10^6 เซลล์ ต่อหลุม เติมสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยเมทานอลและเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป ส่วนสารสกัดของหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยเอทานอล ส่วนที่เป็นดอกใช้ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25 และ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่เป็นใบและทั้งต้นใช้ความเข้มข้น 50, 25, 12.50 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนลำต้นใช้ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์จาก PBMCs ด้วย lipopolysaccharide (LPS) 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแบคทีเรีย LPS สามารถกระตุ้น macrophage และ mature B-cell ให้หลั่ง IL-6 และกระตุ้น macrophage ให้หลั่ง TNF- α และ IL-10 นำไปปั่นใน

ตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บ cell culture supernatant โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจวัดระดับไซโตไคน์

3.4.2 การตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เป็นการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ ได้แก่ TNF- α , IL-6 และ IL-10 ด้วยเทคนิค ELISA ใช้หลักการ Sandwich ELISA ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติเจน ซึ่งในที่นี้คือไซโตไคน์ โดยอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และการจับกันอย่างจำเพาะของ biotin และ avidin ยังช่วยเพิ่ม sensitivity ของการตรวจวัด ซึ่ง biotin ถูก conjugated อยู่กับ secondary antibody ส่วน avidin จะ conjugated กับ เอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยากับ chromogenic substrate ทำให้เกิดสีที่สามารถวัดได้



ภาพที่ 3.8 หลักการของ sandwich ELISA

(จาก <http://www.epitomics.com>)

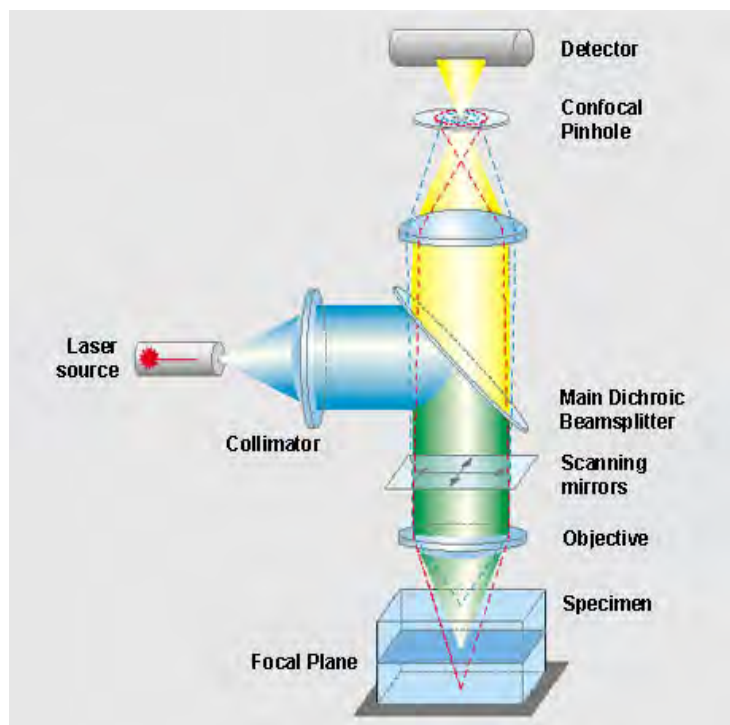
การตรวจวัดระดับไซโตไคน์ใช้ชุดนี้ยา Human TNF-Alpha ELISA Development Kit, Human IL-6 ELISA Development Kit และ Human IL-10 ELISA Development Kit ตรวจวัดตามขั้นตอนและวิธีการจากบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ เติมน้ำ capture antibody ลงไปใน ELISA plate well จากนั้น seal plate แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เมื่อครบเวลา ล้าง plate ด้วย

wash buffer (0.05% tween -20) 4 ครั้ง จากนั้นใส่ block buffer (1%BSA) ลงไปในแต่ละหลุม incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ standard และ cell culture supernatant ลงในแต่ละหลุม โดยทำเป็น triplicate แล้ว incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง และใส่ detection antibody ซึ่งติดฉลากด้วย biotin ไปใน ELISA plate well แล้ว incubate 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ Avidin-HRP Conjugate ที่ dilute ด้วย diluents ในอัตราส่วน 1 : 2000 ลงไปในแต่ละหลุม แล้ว incubate 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง ใส่ ABTS substrate solution ลงไปในแต่ละหลุม incubate ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอให้เกิดสีนาน 15 นาที สุดท้ายวัดค่าดูดกลืนแสงโดยเครื่อง ELISA reader ที่ 405 และ 650 นาโนเมตร

3.5 ศึกษากลไกด้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี Immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy

Immunocytochemistry เป็นวิธีใช้ตรวจหาโปรตีนในเซลล์ โดยอาศัยการจับจำเพาะของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งสามารถติดตามการตำแหน่ง การเคลื่อนที่ และปริมาณของโปรตีนที่ต้องการได้ โดยนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยเลเซอร์ (Confocal microscope หรือ Laser scanning microscope) ซึ่งใช้ลำแสงนั้นก็คือเลเซอร์ในการส่องที่วัตถุที่ต้องการศึกษา และอาศัยการสะท้อนกลับของลำแสงโดยใช้ตัวรับสัญญาณรับภาพที่เกิดจากการสะท้อนนั้นก็คือ PMT(Photo Multiplier Tube) ซึ่งเป็นตัวรับภาพเฉพาะสำหรับเลเซอร์ โดยก่อนที่ลำแสงจะกระทบวัตถุที่ศึกษา จะผ่านเลนส์ทำให้แนวลำแสงมีช่วงโฟกัสที่แคบลงและทำให้เกิดความสามารถในการทะลุทะลวงทำให้สามารถเห็นภาพได้ในแนวลึก และ pinhole จะทำหน้าที่ในการรวมแสงที่ด้านหน้าของตัว detector เพื่อกำจัดสัญญาณที่อยู่นอกโฟกัส (out of focus) แสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ออกจากตัวอย่างปริมาณมากจะถูกสกัดด้วย pinhole เพื่อเพิ่ม resolution นอกจากนี้ยังมีลำแสงเป็นแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่อยู่ใกล้ๆ กับ focal plane ทำให้สามารถจับภาพได้อย่างคมชัดโดยเฉพาะตัวอย่างที่อยู่ในที่ลึกลงไป ทำให้สามารถติดตาม

ตำแหน่งที่ต้องการถ่ายรูปได้ ความโดดเด่นที่มากกว่ากล้องฟลูออเรสเซนส์ทั่วไป คือ มี scanning mirror ทำให้เกิดการสแกนแบบ X/Y image ทำให้เกิดภาพจนครบทั้ง field และสามารถเลือกตำแหน่งที่เราต้องการได้



ภาพที่ 3.9 หลักการทำงานของ Confocal microscope

(จาก <http://www2.bio.ku.dk/microbiology/research/clsm.asp>)

ทำการทดสอบในงานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24 well-plate) โดยใช้ PBMCs จำนวน 2×10^6 เซลล์ ต่อหลุม เติมสารสกัดของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นที่ทำให้ระดับ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α หรือ IL-6 ลดลง โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์จาก PBMCs ด้วย lipopolysaccharide (LPS) 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ทั้งหมดดูใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 2000 rpm 10 นาที ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วย PBS (phosphate buffer saline) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมเมทานอลที่เย็นจัดให้ท่วมเซลล์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อเป็นการ fix รูปร่างของเซลล์ เมื่อครบเวลา นำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม BSA 5 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมกับ

triton x-100 0.5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งอยู่ใน PBS เพื่อทำการ permeabilization เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมน้ำ primary antibody ซึ่งก็คือ rabbit anti-human p65 antibody ที่มีอัตราส่วน 1: 500 ลงไป ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมน้ำ secondary antibody ซึ่งก็คือ Alexa 555 – conjugated anti-rabbit IgG ที่มีอัตราส่วน 1: 500 ลงไป ทิ้งไว้ 45 นาที ในที่มืด แล้วนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืด แล้วนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำย้ายไปสู่แผ่นสไลด์ ปิดด้วย coverslip แล้ว mount ด้วยน้ำยาทาเล็บ นำเซลล์ไปดูด้วย confocal microscope

DAPI ย้อมติดบริเวณที่เป็น double-stranded DNA หมายความว่า DAPI ย้อมติดบริเวณนิวเคลียส DAPI ดูดกลืนแสงที่ 358 นาโนเมตร และมีปล่อยพลังงานที่ 461 นาโนเมตร โดยจะเห็นเป็นสีน้ำเงิน ถ้าหากเซลล์มี NF- κ B p65 อยู่จะเห็นเป็นสีแดงเนื่องจาก rabbit anti-human p65 antibody จับกับ Alexa Fluor® 555 – conjugated goat anti-rabbit IgG ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และปล่อยพลังงานที่ 555 นาโนเมตร โดยเห็นเป็นสีแดง



ภาพที่ 3.10 Confocal microscope (Laser scanning microscope) ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

3.6 การทดสอบผลของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยต่อ % cell viability ของ HEK293 และ HuH7

3.6.1 การเตรียมสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยที่ความเข้มข้น 100 mg/ml (ในตัวทำละลาย 100% DMSO) มาเจือจางใน DMEM/High glucose สำหรับสารสกัดที่ใช้กับ HEK293 และเจือจางใน RPMI-1640 สำหรับสารสกัดที่ใช้กับ HuH7 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91 และ 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293 และ HuH7 ด้วยวิธี MTT assay สารสกัดจะถูกเจือจางลงอีก 10 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นสูงสุดของ DMSO ในสารสกัดทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจะไม่เกิน 0.1% (v/v) และเตรียม control solvent คือสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 1 และ 0.1% (v/v) โดยเจือจางใน DMEM/High glucose และ RPMI-1640 สำหรับสารที่ใช้ทดสอบกับ HEK293 และ HuH7 ตามลำดับ

3.6.2 ประเมินผลของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยต่อ % cell viability ของ HEK293 และ HuH7 ด้วยวิธี MTT assay

ทำการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 wells plate) ใช้จำนวนเซลล์ HEK293 ต่อหลุมเท่ากับ 5×10^3 เซลล์ นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) สารสกัดจากของหญ้าหมอนน้อยในตัวทำละลายต่างๆ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 – 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2.) DMSO 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ 3.) DMSO 100 เปอร์เซ็นต์เป็น positive control 4.) อาหารเลี้ยงเซลล์เป็น negative control โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาหยอดน้ำยา MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5) 20 ไมโครลิตร ต่อจากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ละลายตะกอนด้วย DMSO นำมาปั่นที่ 2000 rpm 10 นาที ย้ายส่วนใส 100 ไมโครลิตรมายังจานเพาะเลี้ยงใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความ

ยาวคลื่น 550 นาโนเมตร สูดทำหาคำนวณหาค่า % cell viability และ IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)

คำนวณ % cell viability ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{treated cell-blank}) * 100}{(\text{untreated cell} - \text{blank})}$$

คำนวณ IC_{50} จาก Logarithmic graph

3.7 วิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลโดยใช้ Student's *t* - test โดยจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า *P* - value น้อยกว่า 0.05 (ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) และแสดงผลเป็นรูปภาพตาราง และกราฟ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel เวอร์ชัน 2007 (Microsoft, สหรัฐอเมริกา)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการสกัดหญาหอมน้อย โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration)

เมื่อทำการสกัดหญาหอมน้อยด้วยตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวทำละลายออกมาทุกๆ 72 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ครั้ง พบว่า ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารออกจากหญาหอมน้อยได้มากที่สุด คือ เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดส่วนต่างๆของหญาหอมน้อยด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน

ส่วนที่นำมาสกัด	Extract yield (%)		
	เมทานอล	เอทานอล	เฮกเซน
ดอก	20	9	8
ใบ	26	12	12
ลำต้น	12	5	4
ทั้งต้น	14	7	5

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหญาหอมน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (PBMCs)

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในส่วนต่างๆของหญาหอมน้อยที่สกัดจากตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.50, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (PBMCs) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งมีเซลล์ที่ถูกทดสอบกับ DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้

รับการทดสอบกับสารสกัดหญ้าหมอน้อยเป็น กลุ่มควบคุมลบ (negative control) โดยมี control solvent คือสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้จะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ

- ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยต่อ PBMCs

เมื่อศึกษาความเป็นพิษของทั้งต้นหญ้าหมอน้อย พบว่า สารสกัดเมทานอลและเฮกเซน จากทั้งต้นหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ โดยมีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยที่สุดอยู่ที่ 94.53 ± 8.66 เปอร์เซ็นต์ และ 91.25 ± 11.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ ทำให้มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เหลือเพียง 78.11 ± 7.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.1)

- ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดอกของหญ้าหมอน้อยต่อ PBMCs

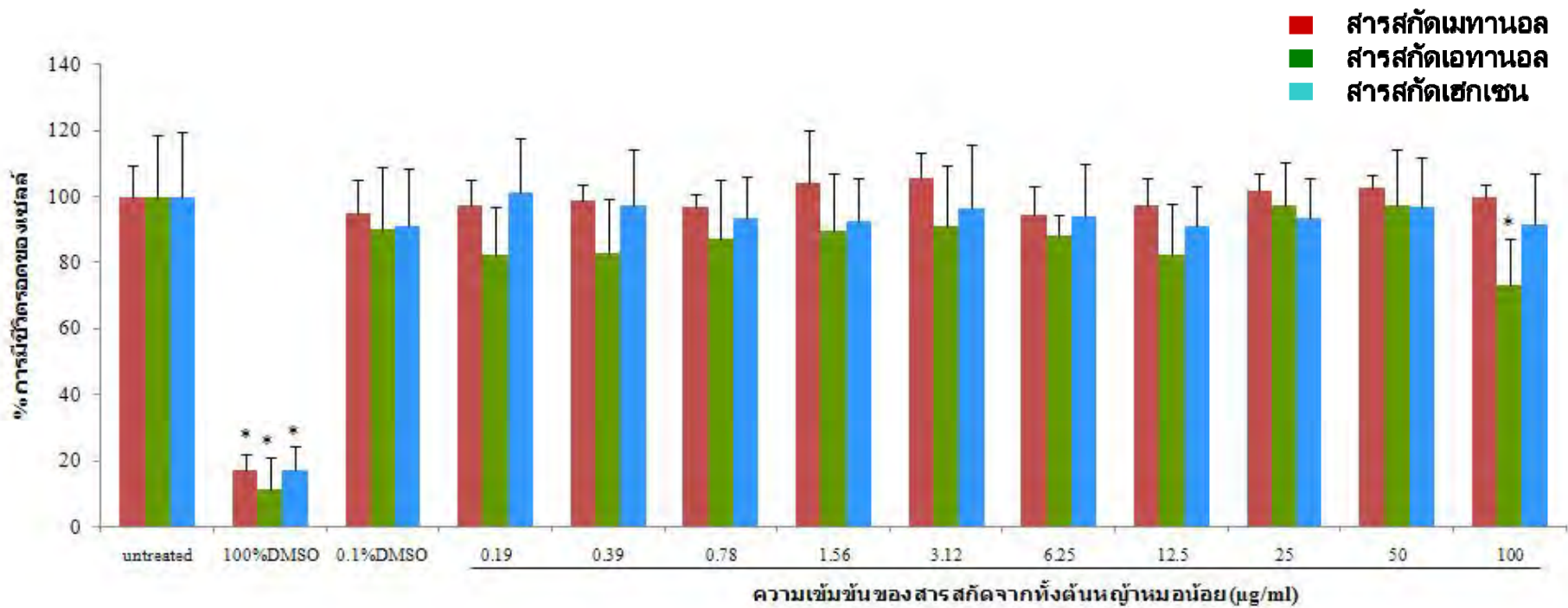
สารสกัดเมทานอลและเฮกเซนจากดอกหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ โดยมีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยที่สุดอยู่ที่ 98.87 ± 9.2 เปอร์เซ็นต์ และ 94.89 ± 12.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลจากดอกหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ ซึ่งทำให้มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เหลือเพียง 73.57 ± 16.2 เปอร์เซ็นต์ และ 31.55 ± 14.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) นอกจากนี้ สารสกัดเอทานอลจากดอกของหญ้าหมอน้อยมีค่า IC_{50} ที่ 73.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบของหญ้าหมอน้อยต่อ PBMCs

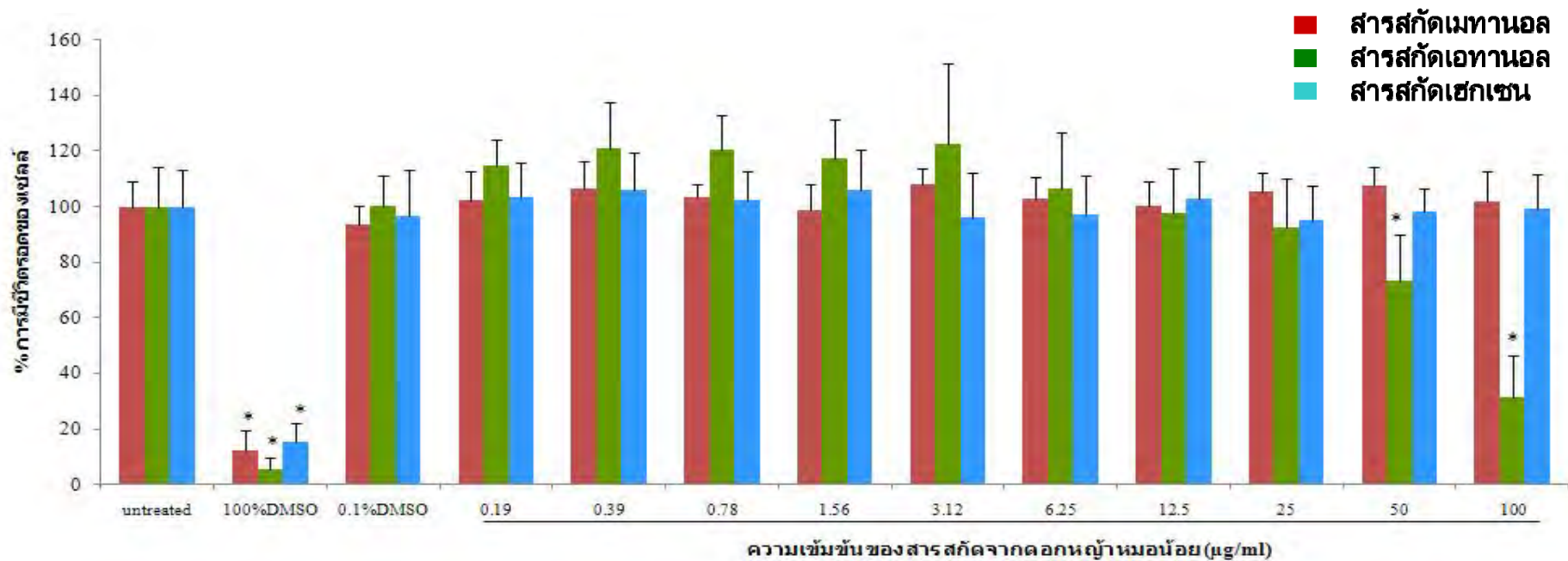
สารสกัดเมทานอลและเฮกเซนจากใบหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ โดยมีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยที่สุดอยู่ที่ 90.88 ± 11.36 เปอร์เซ็นต์ และ 97.13 ± 11.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่สารสกัดเอทานอลจากใบหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ ทำให้มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เหลือเพียง 76.71 ± 15.01 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.3)

- ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลำต้นของหญ้าหมอนน้อยต่อ PBMCs

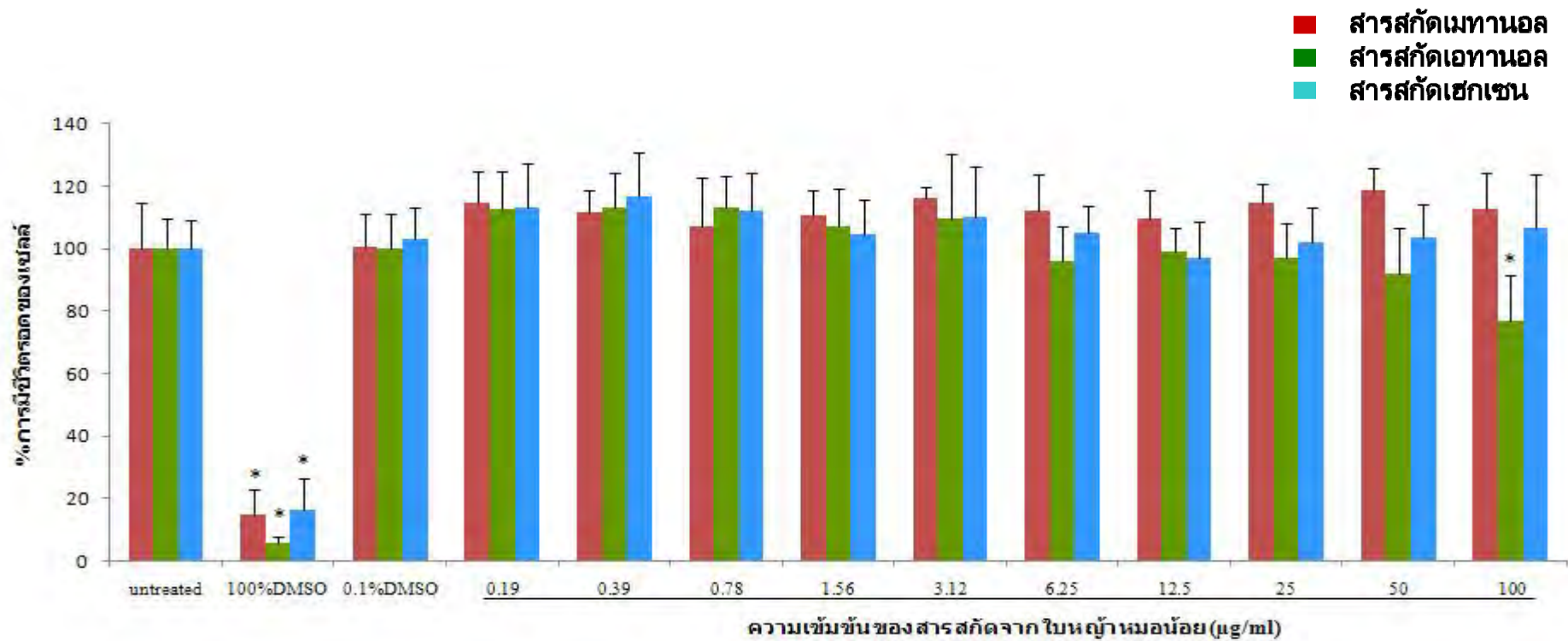
ในส่วนของลำต้นของหญ้าหมอนน้อยพบว่า สารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซนที่ความเข้มข้น 0.19 -100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ โดยมีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยที่สุดอยู่ที่ 107.17 ± 15.51 เปอร์เซ็นต์ 85.83 ± 7.6 เปอร์เซ็นต์ และ 91.3 ± 15.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4)



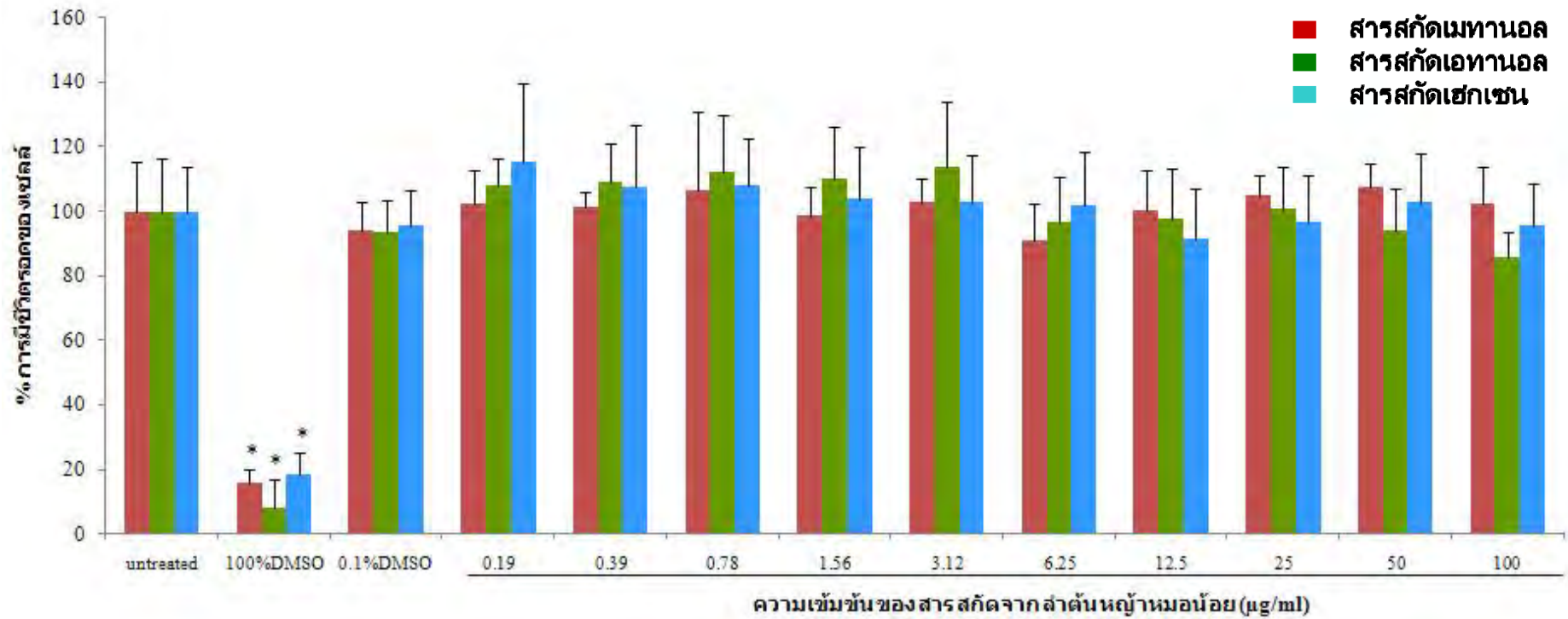
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากทั้งต้นของหญ้าหมอนน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

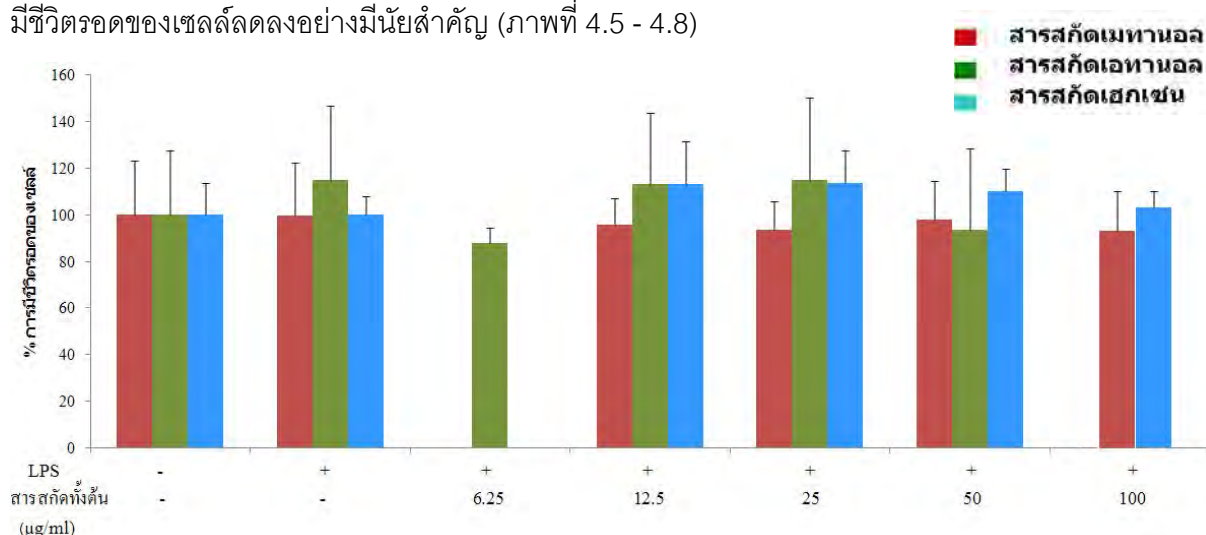


ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

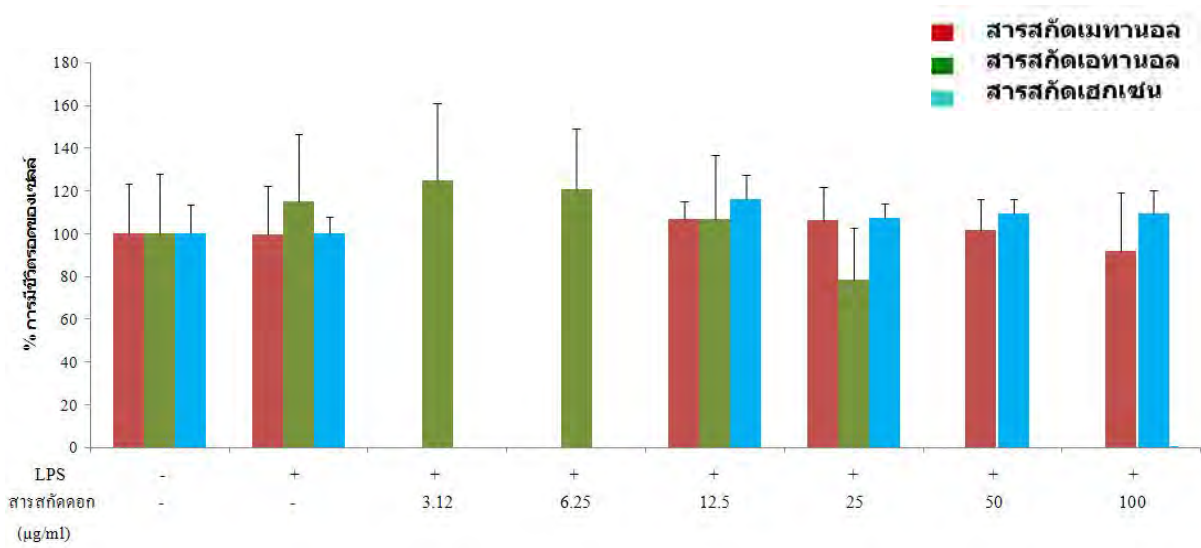
จากผลในขั้นนี้ จะทำการเลือกความเข้มข้น 4 ความเข้มข้นที่มากที่สุด 4 ความเข้มข้นแรกที่ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์มีค่าการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อนำมาทดสอบหาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อย เพื่อนำมาตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA และ ศึกษากลไกต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี Immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy ซึ่งความเข้มข้นที่เลือกใช้มีดังนี้

- สารสกัดของหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยเมทานอลและ เฮกเซนที่ความเข้มข้น 100, 50 , 25 และ 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- สารสกัดของหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยเอทานอล
 - ส่วนที่เป็นดอกใช้ความเข้มข้น 25, 12.50, 6.25 และ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 - ส่วนที่เป็นใบและทั้งต้นใช้ความเข้มข้น 50 , 25, 12.50 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 - ส่วนลำต้นใช้ความเข้มข้น 100, 50 , 25 และ 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

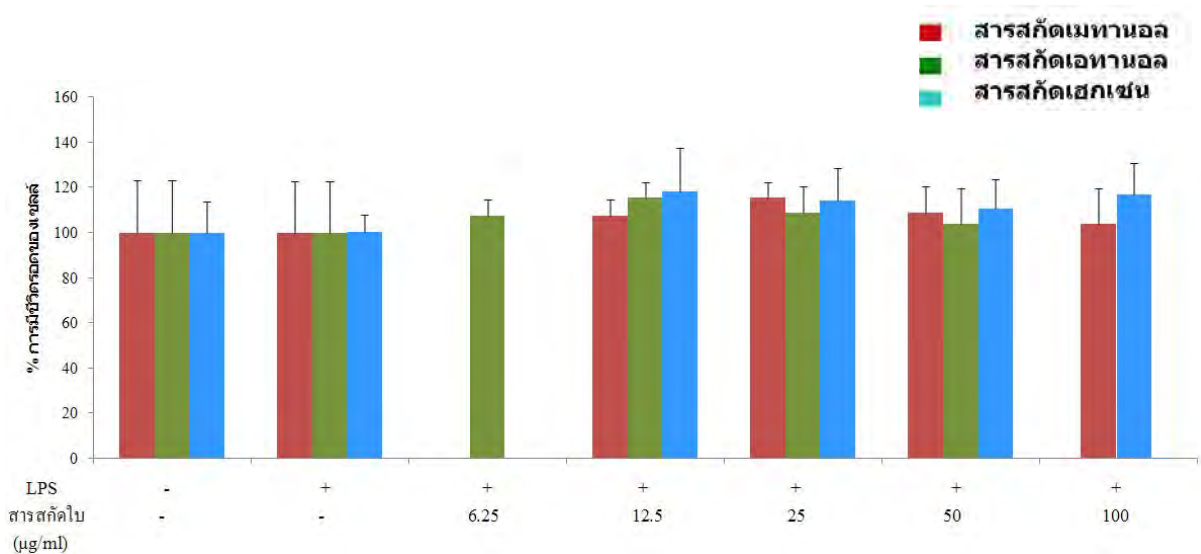
หลังจากนั้นนำความเข้มข้นที่คัดเลือกมาแล้วทำการทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ร่วมกับ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำมากระตุ้นการหลั่ง TNF- α , IL-6 และ IL-10 และทำการทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์กับ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ด้วยสารสกัดและ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ได้ทำให้มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.5 - 4.8)



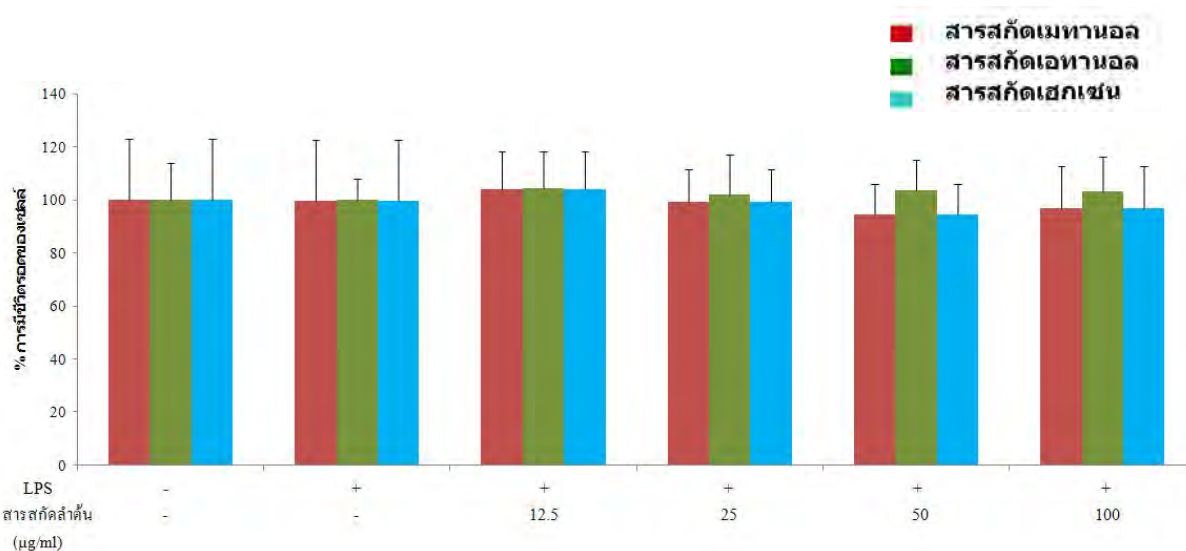
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย และ LPS 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อย และ LPS 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ PBMCs เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อย และ LPS 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



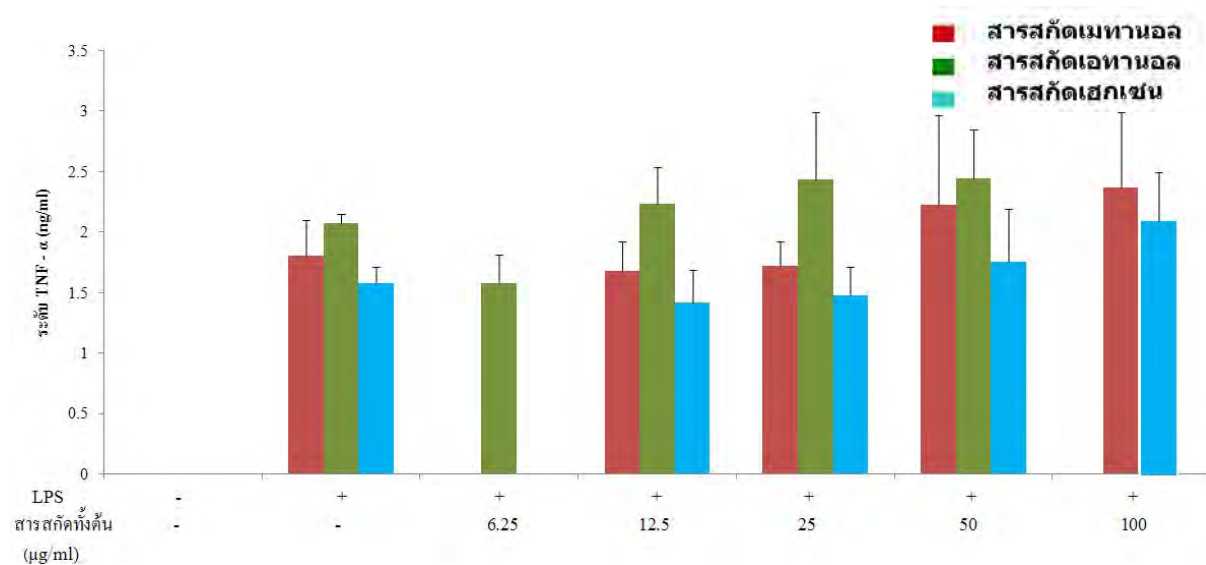
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตของเซลล์ PBMCs เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อย และ LPS 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย โดยวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

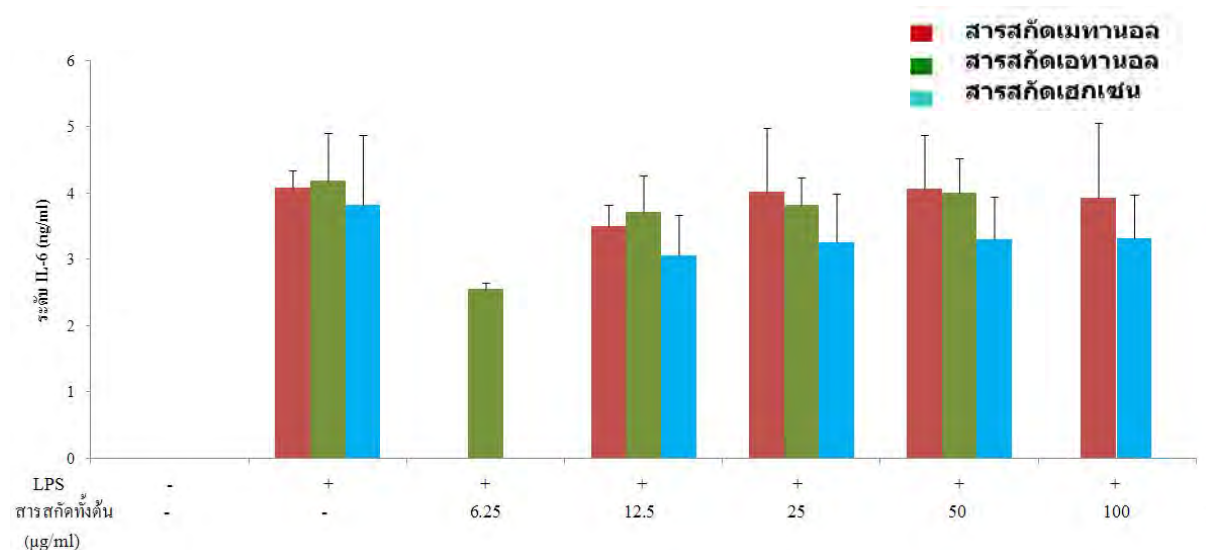
ทำการทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์กับสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยเมทานอลและเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดของหญ้าหมอน้อยที่สกัดด้วยเอทานอล ส่วนที่เป็นดอกใช้ความเข้มข้น 25, 12.50, 6.25 และ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่เป็นใบและทั้งต้นใช้ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนลำต้นใช้ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บ cell culture supernatant และนำมาตรวจวัดระดับไซโตไคน์

จากการทดลอง สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นที่ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้นที่ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับการหลั่งของไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ คือ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.10) ในขณะที่สารสกัดที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่มีผลต่อการหลั่ง TNF- α (ภาพที่ 4.9) นอกจากนี้ พบว่า สารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มการหลั่งไซโตไคน์ด้านการอักเสบ

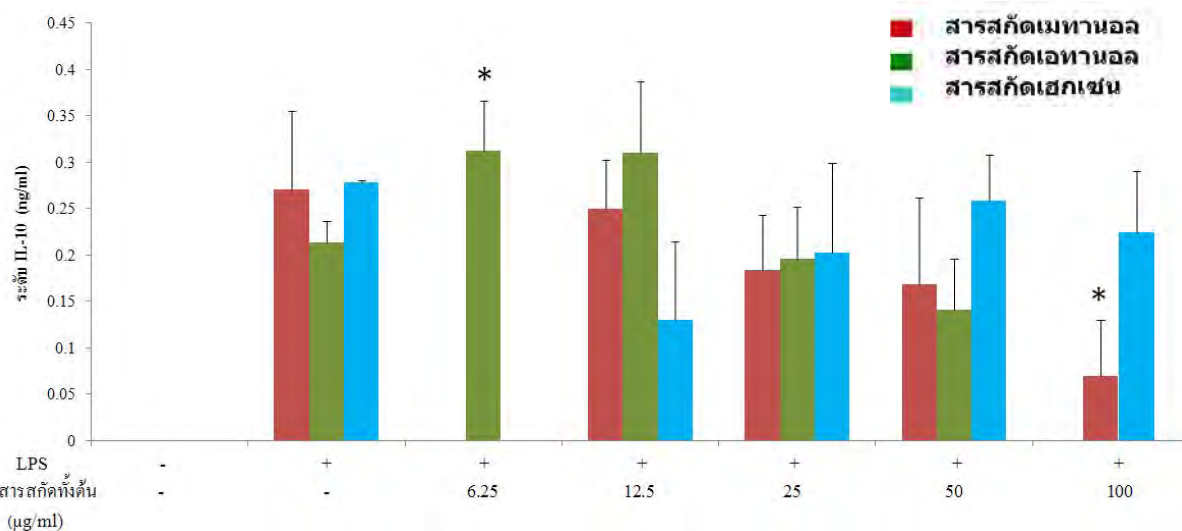
คือ IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.11) แต่สารสกัดเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ยับยั้งการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงระดับของ TNF- α (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



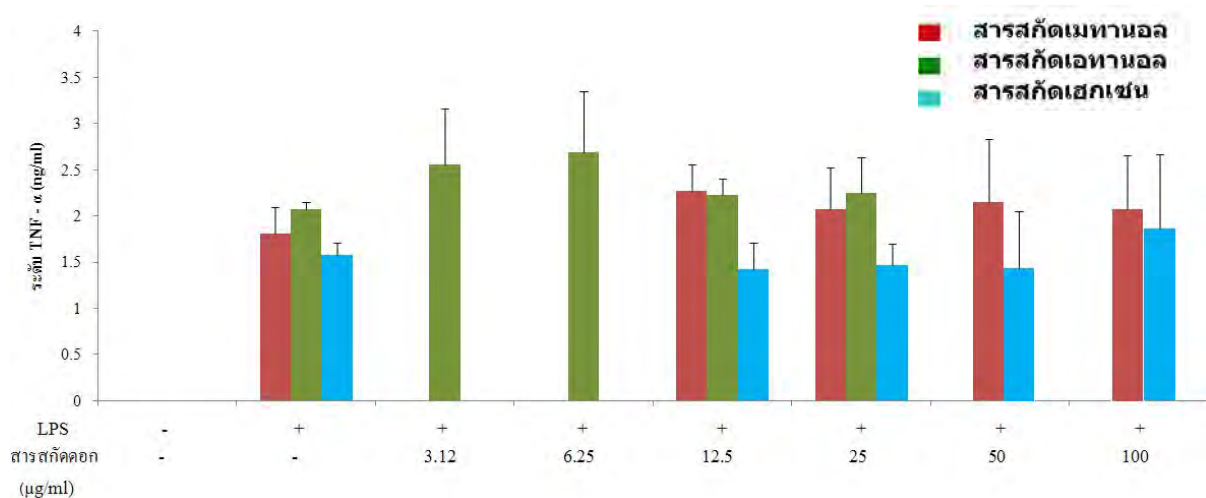
ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงระดับของ IL-6 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



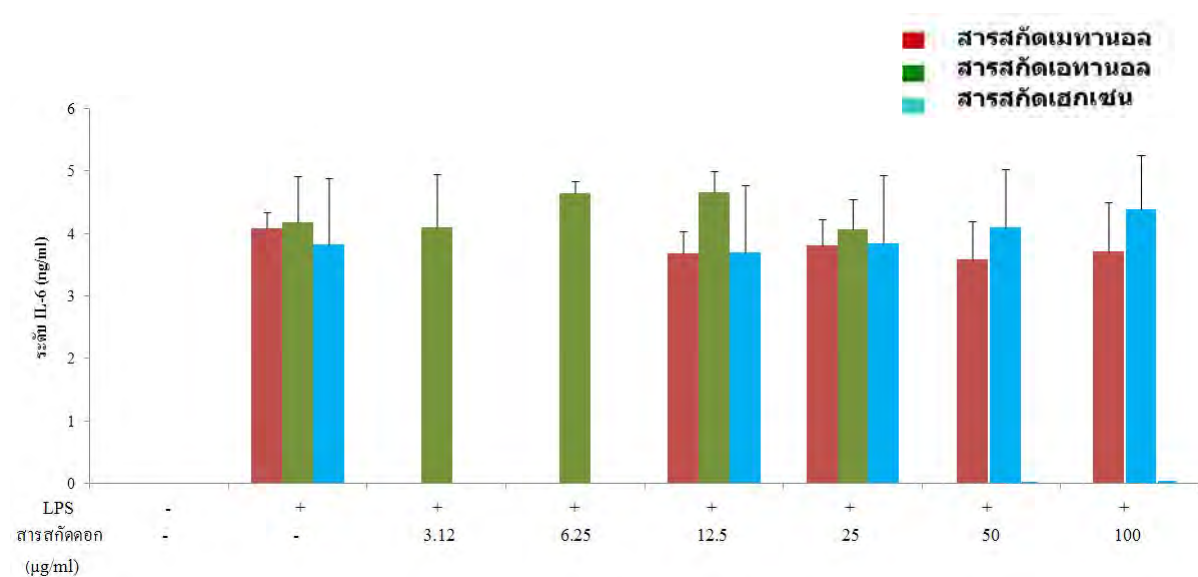
ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงระดับของ IL-10 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากดอกหญ้าหมอน้อย โดยวัดระดับไซโตไคน์ ด้วยเทคนิค sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

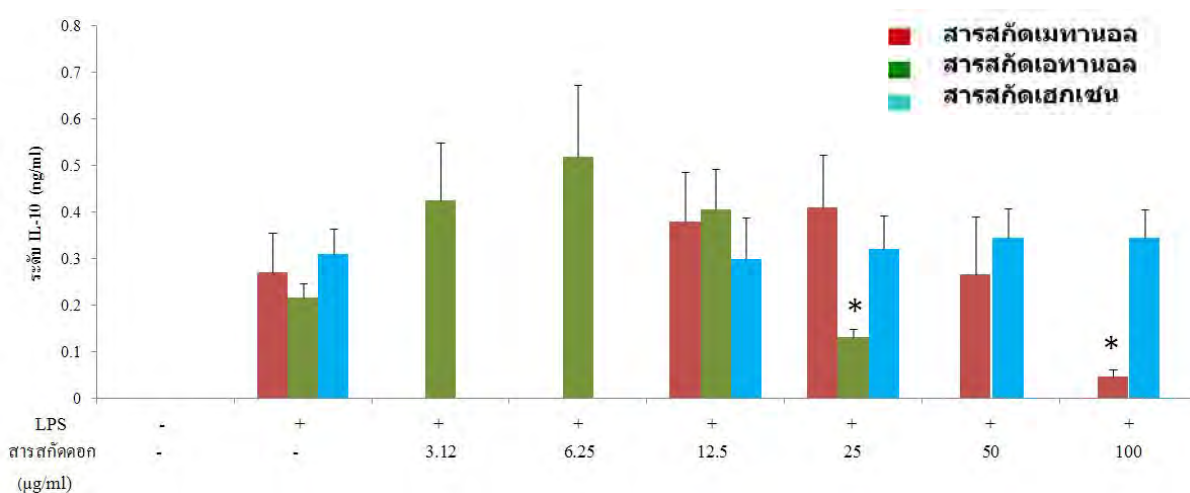
จากการทดลอง พบว่าสารสกัดเมทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นที่ 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลจากดอกหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25 และ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถลดระดับการหลั่งของไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ คือ TNF- α (ภาพที่ 4.12) และ IL-6 ได้ (ภาพที่ 4.13) ในขณะที่สารสกัดเมทานอลดอกหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงระดับของ TNF- α (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



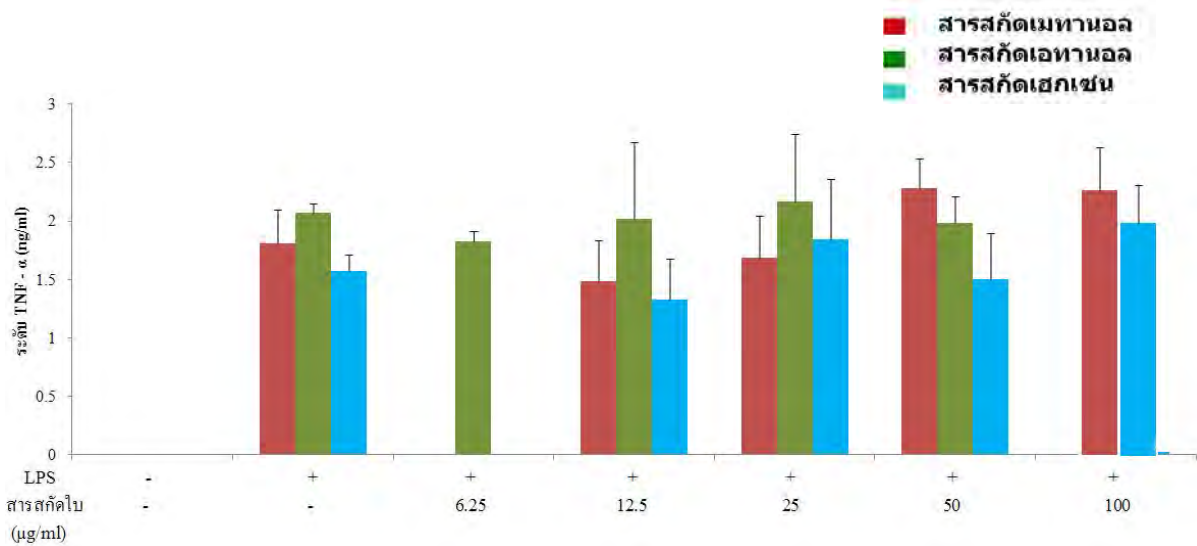
ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงระดับของ IL-6 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



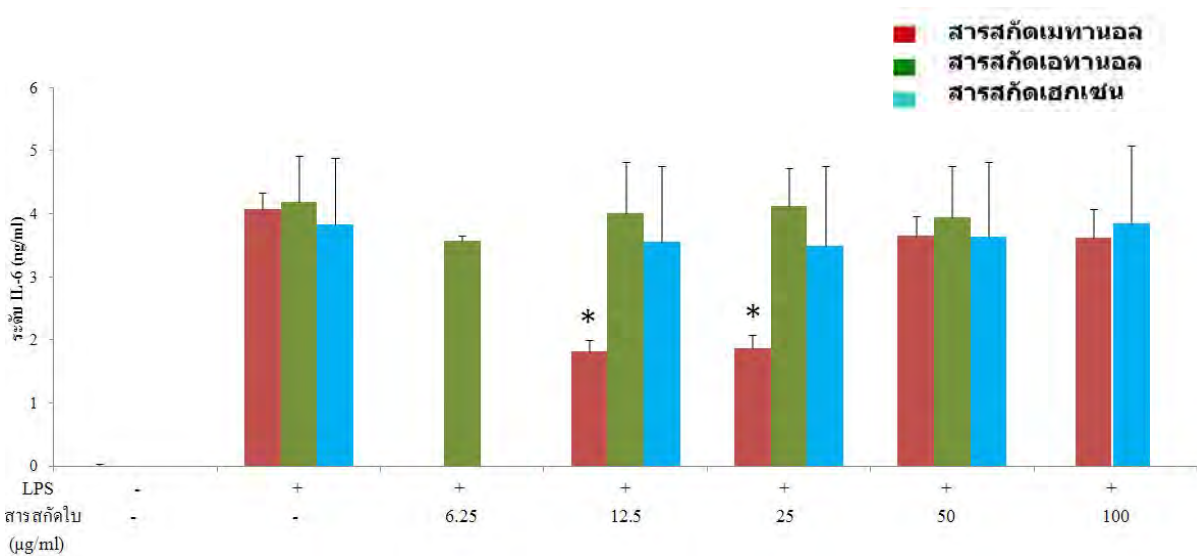
ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงระดับของ IL-10 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบหญ้าหมอน้อย โดยวัดระดับไซโตไคน์ ด้วยเทคนิค sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

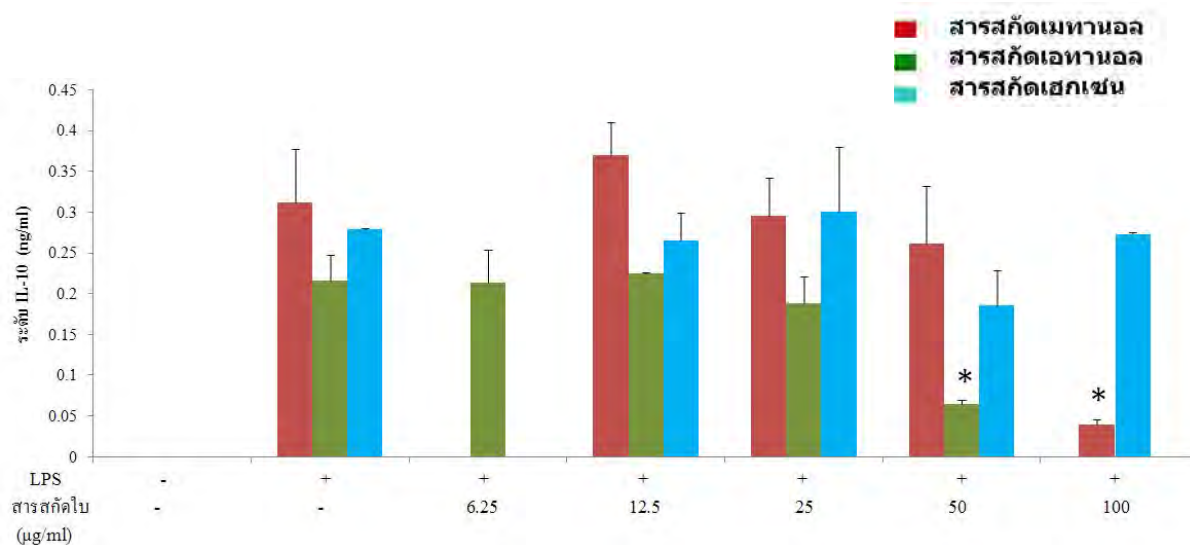
จากการทดลอง สารสกัดเมทานอลจากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นที่ 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับการหลั่งของไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ คือ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.16) ในขณะที่สารสกัดที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่มีผลต่อการหลั่ง TNF- α (ภาพที่ 4.15) รวมถึงสารสกัดเฮกเซนจากใบหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการหลั่ง TNF- α , IL-6 และ IL-10 (ภาพที่ 4.15, 4.16 และ 4.17) นอกจากนี้พบว่า สารสกัดเมทานอลใบหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.17)



ภาพที่ 4.15 กราฟแสดงระดับของ TNF- α (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



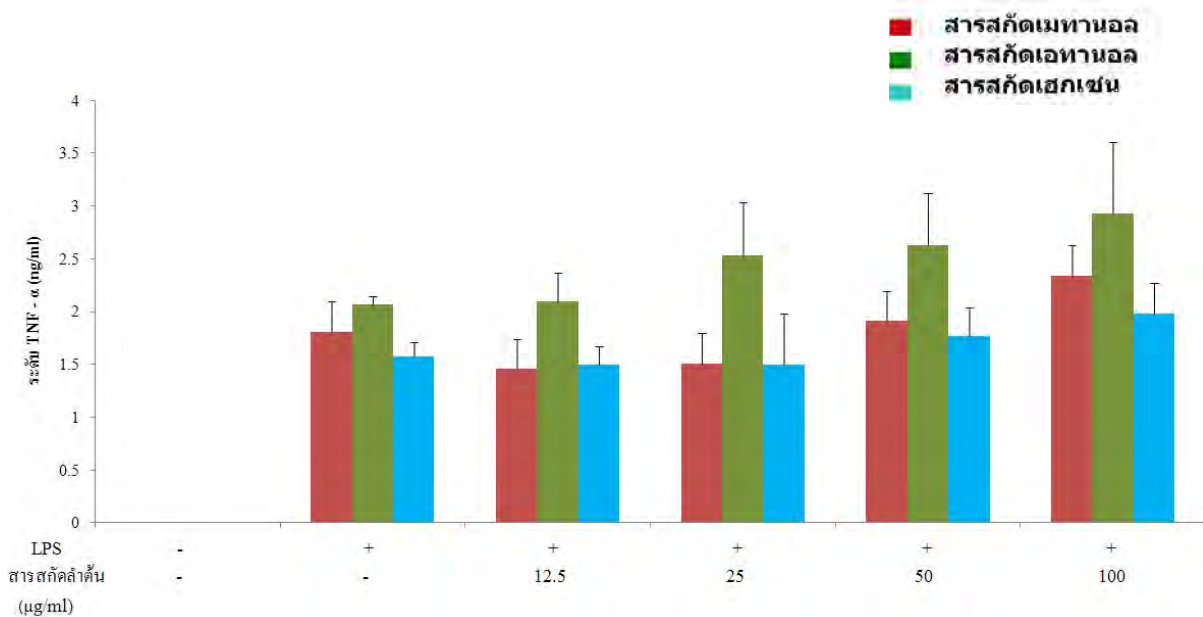
ภาพที่ 4.16 กราฟแสดงระดับของ IL-6 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



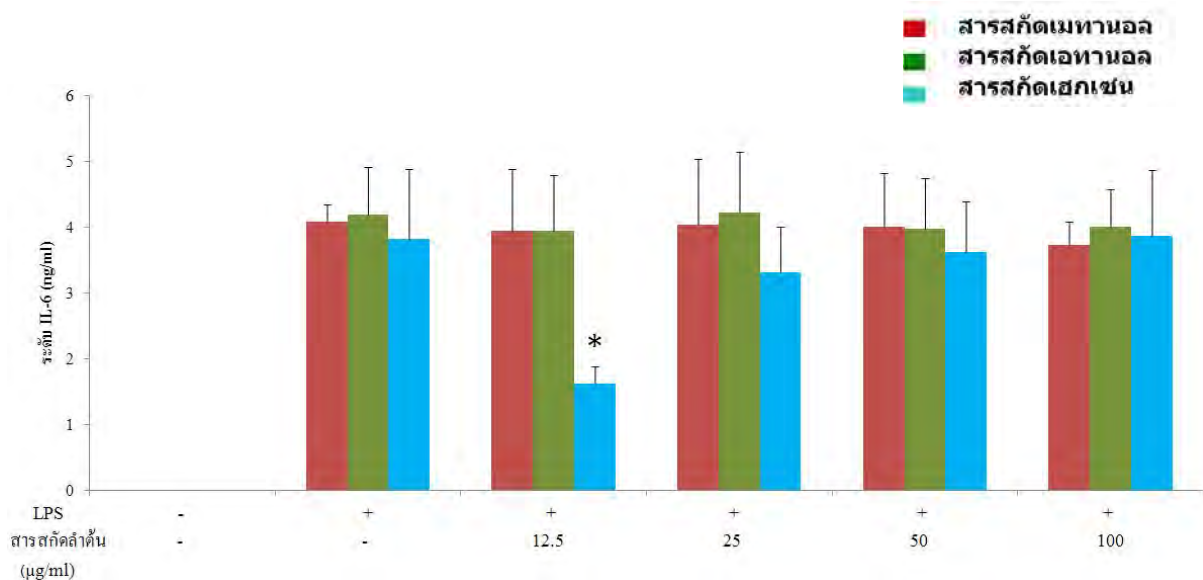
ภาพที่ 4.17 กราฟแสดงระดับของ IL-10 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากลำต้นหญ้าหมอน้อย โดยวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

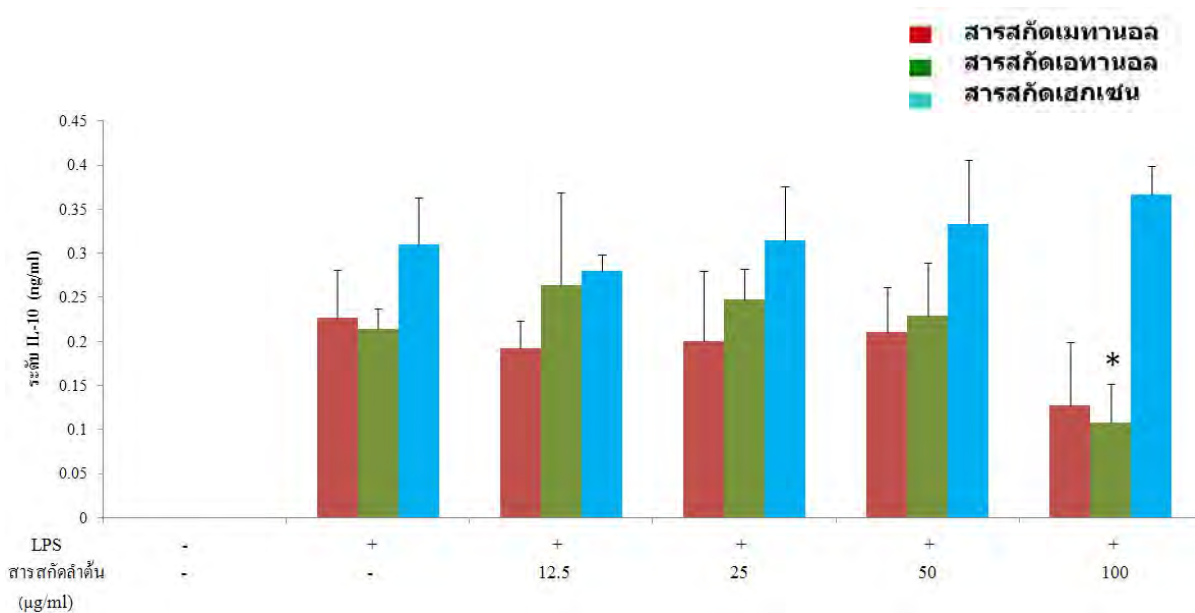
จากการทดลอง พบว่า มีเพียงสารสกัดเฮกเซนจากลำต้นหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับการหลั่ง IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.19) ในขณะที่สารสกัดที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่มีผลต่อการหลั่ง TNF- α (ภาพที่ 4.18) ส่วนสารสกัดเอทานอลจากลำต้นหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.18 กราฟแสดงระดับของ TNF- α (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



ภาพที่ 4.19 กราฟแสดงระดับของ IL-6 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.20 กราฟแสดงระดับของ IL-10 (ng/ml) จาก PBMCs ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะควบคุม และสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอล เอทานอลและเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดจาก cell supernatant ด้วยเทคนิค ELISA (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้ง การทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

4.7 ผลการศึกษากลไกด้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทาง NF-κB signaling pathway ด้วยวิธี Immunocytochemistry และเทคนิค Confocal microscopy

ทำการทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์กับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้นที่ความเข้มข้น 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ใบที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

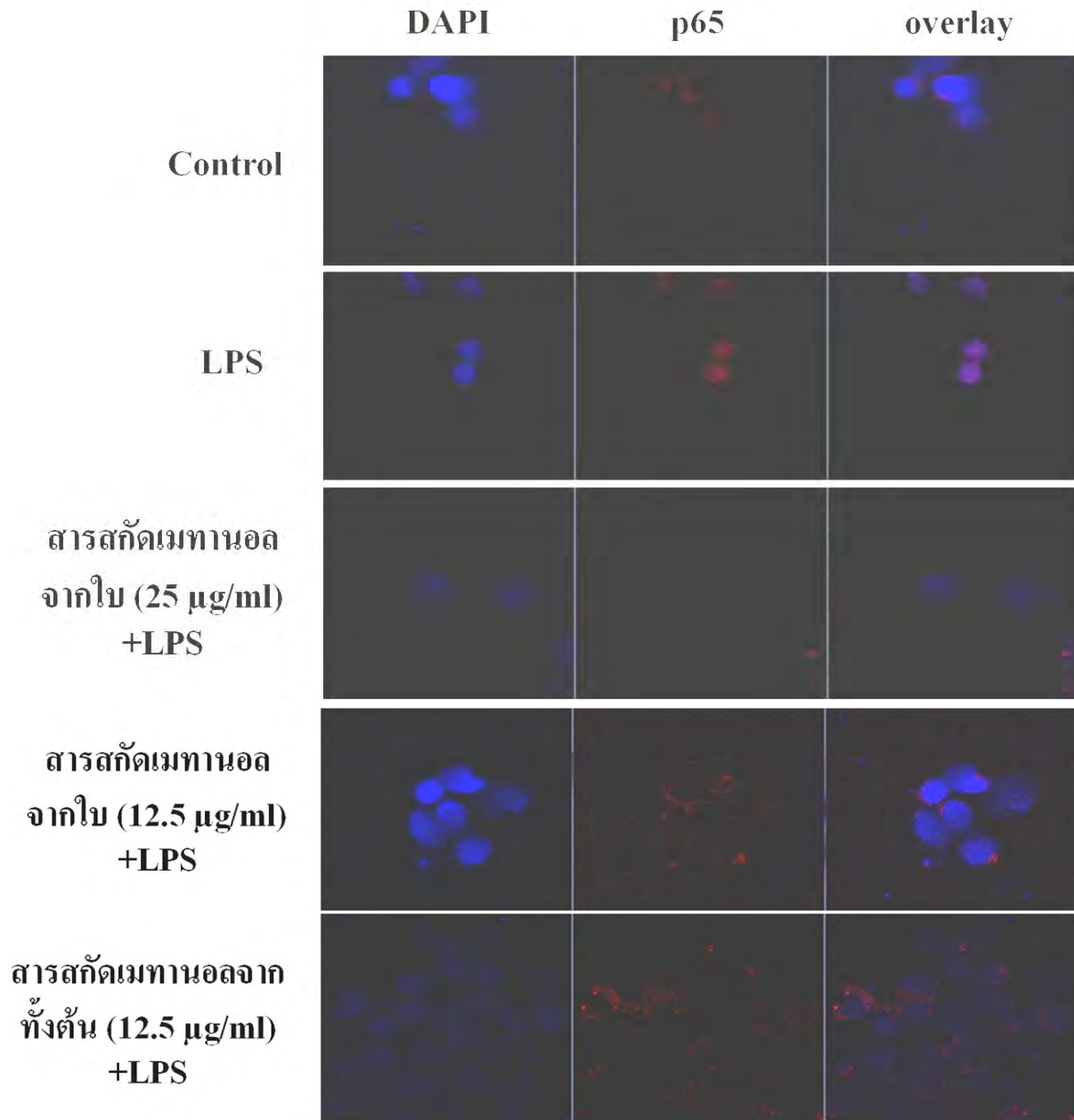
- สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- สารสกัดเฮกเซนจากลำต้นที่ความเข้มข้น 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

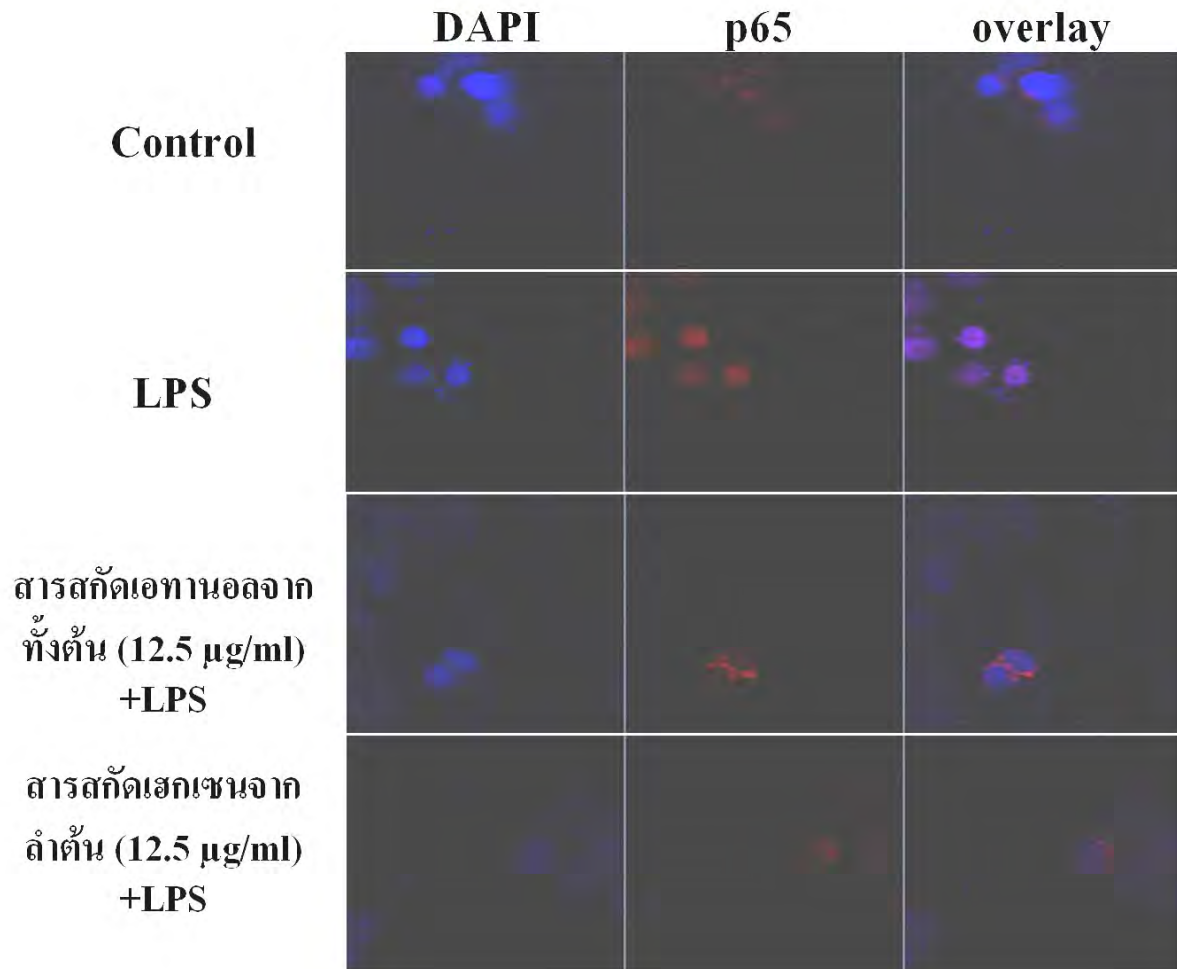
โดยทดสอบกับสารสกัด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาย้อมด้วย primary antibody ซึ่งก็คือ rabbit anti-human p65 antibody และ secondary antibody ซึ่งก็คือ Alexa 555 – conjugated anti-rabbit IgG จากนั้นย้อมด้วย DAPI แล้วนำเซลล์ไปดูด้วย confocal laser scanning microscope ซึ่ง DAPI จะย้อมติดเซลล์

บริเวณนิวเคลียส เห็นเป็นสีน้ำเงิน ถ้าหากเซลล์มี NF- κ B อยู่จะเห็นเป็นสีแดงเนื่องจาก rabbit anti-human p65 antibody จับกับ Alexa Fluor® 555 – conjugated goat anti-rabbit IgG

จากการทดลอง พบว่า ในภาวะปกติ NF- κ B จะอยู่บริเวณไซโตพลาซึม (cytoplasm) ของเซลล์ ในรูป inactive form เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า LPS สามารถกระตุ้น การเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่ นิวเคลียส (nuclear translocation) ได้ จึงเห็นบริเวณนิวเคลียสของเซลล์มีสีแดง เพิ่มมากขึ้น แสดงว่า NF- κ B มี activity เพิ่มขึ้น แล้ว NF- κ B จะไปจับกับ NF- κ B binding site บริเวณ promoter ของยีน TNF- α และ IL-6 ทำให้เซลล์หลั่ง TNF- α และ IL-6 ออกมา แต่สารสกัดหุ้มไขมันน้อย สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของ NF- κ B ได้ ทำให้ NF- κ B อยู่บริเวณไซโตพลาซึม ส่งผลให้ NF- κ B activity ลดลง ทำให้เซลล์หลั่ง TNF- α และ IL-6 ออกมาลดลง (ภาพที่ 4.21 และ 4.22)



ภาพที่ 4.21 ภาพแสดงกลไกด้านอักษะของสารสกัดหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทางการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของ NF-κB เมื่อนำเซลล์มาข้อมด้วย rabbit anti-human p65 antibody ตามด้วย Alexa 555 – conjugated anti-rabbit IgG (สีแดง) จากนั้นข้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) แล้วนำเซลล์ ไปดูด้วย confocal laser scanning microscope (Control คือ เซลล์ที่ไม่ถูกทดสอบกับสารสกัดและ ตัวกระตุ้น)



ภาพที่ 4.22 ภาพแสดงกลไกต้านอักเสบของสารสกัดหญ้าหมอน้อยซึ่งผ่านทางการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของ NF-κB เมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงด้วย rabbit anti-human p65 antibody ตามด้วย Alexa 555 – conjugated anti-rabbit IgG (สีแดง) จากนั้นย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) แล้วนำเซลล์ ไปดูด้วย confocal laser scanning microscope (Control คือ เซลล์ที่ไม่ถูกทดสอบกับสารสกัดและ ตัวกระตุ้น)

4.8 ผลของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในส่วนต่างๆ ของหญ้าหมอน้อยที่สกัดจากตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์ไตของมนุษย์ (HEK293) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวัดค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%cell viability) ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งมี เซลล์ที่ทดสอบกับ DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดหญ้าหมอน้อยเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) โดยมี control solvent คือสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้จะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ

- ผลของสารสกัดจากทั้งต้นหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 6.25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 6.25, 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย ทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าสารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยมีค่า IC_{50} ที่ 62.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.23)

- ผลของสารสกัดจากดอกหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293

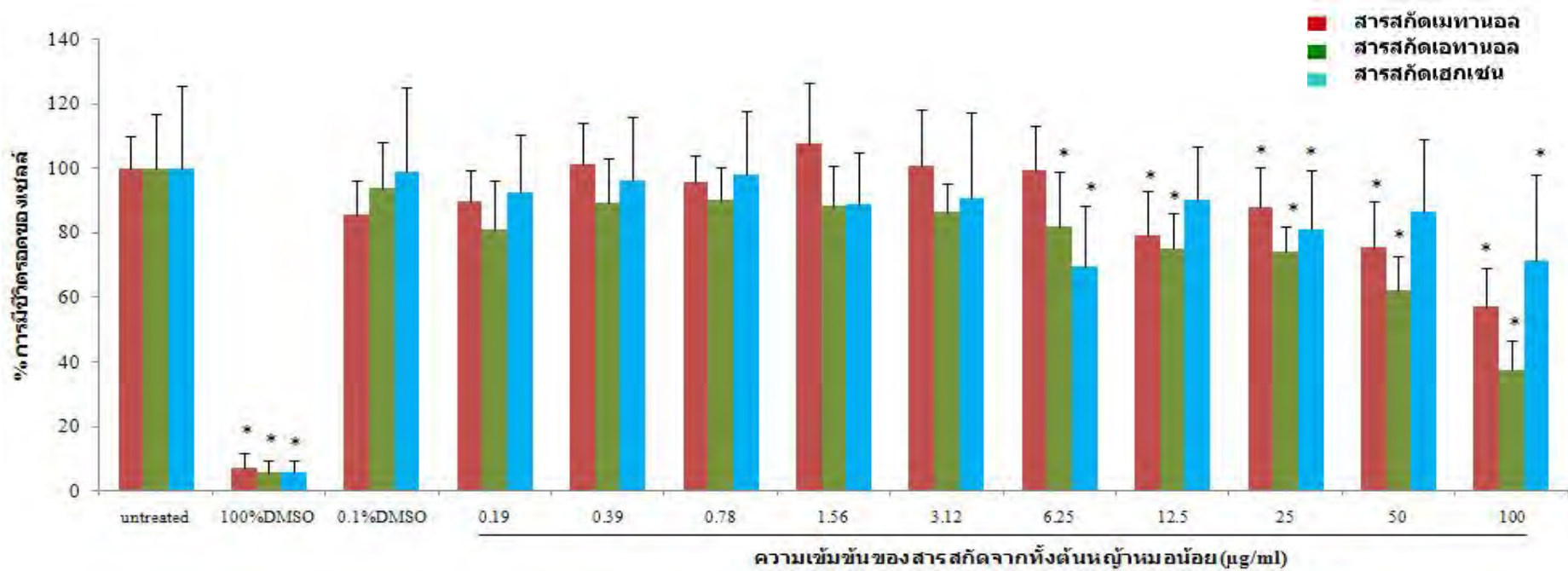
เมื่อทำการศึกษาสารสกัดจากส่วนดอกของหญ้าหมอน้อย พบว่า สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 6.25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกของหญ้าหมอน้อยมีค่า IC_{50} ที่ 33.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.24)

- ผลของสารสกัดจากใบหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293

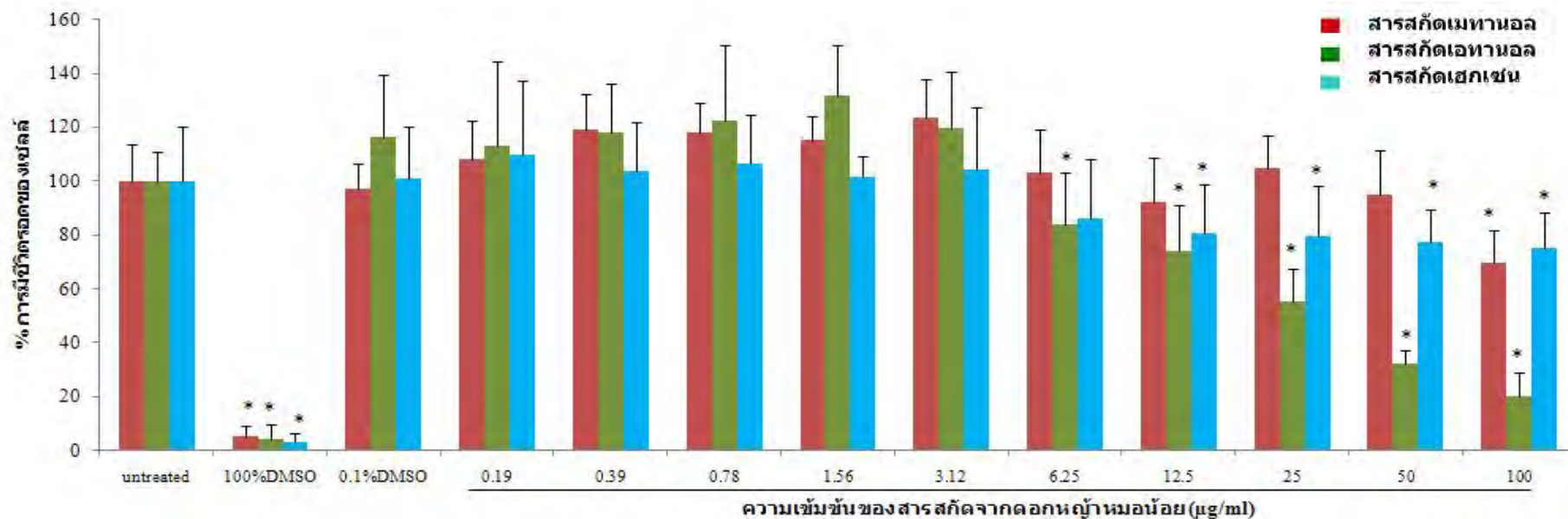
สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารสกัดเอทานอลจากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 12.5, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่สารสกัดเฮกเซนไม่ได้มีผลทำให้ค่าการมีชีวิตของเซลล์ลดลง และพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบของหญ้าหมอน้อยมีค่า IC_{50} ที่ 71.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.25)

- ผลของสารสกัดจากลำต้นหญ้าหมอนน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293

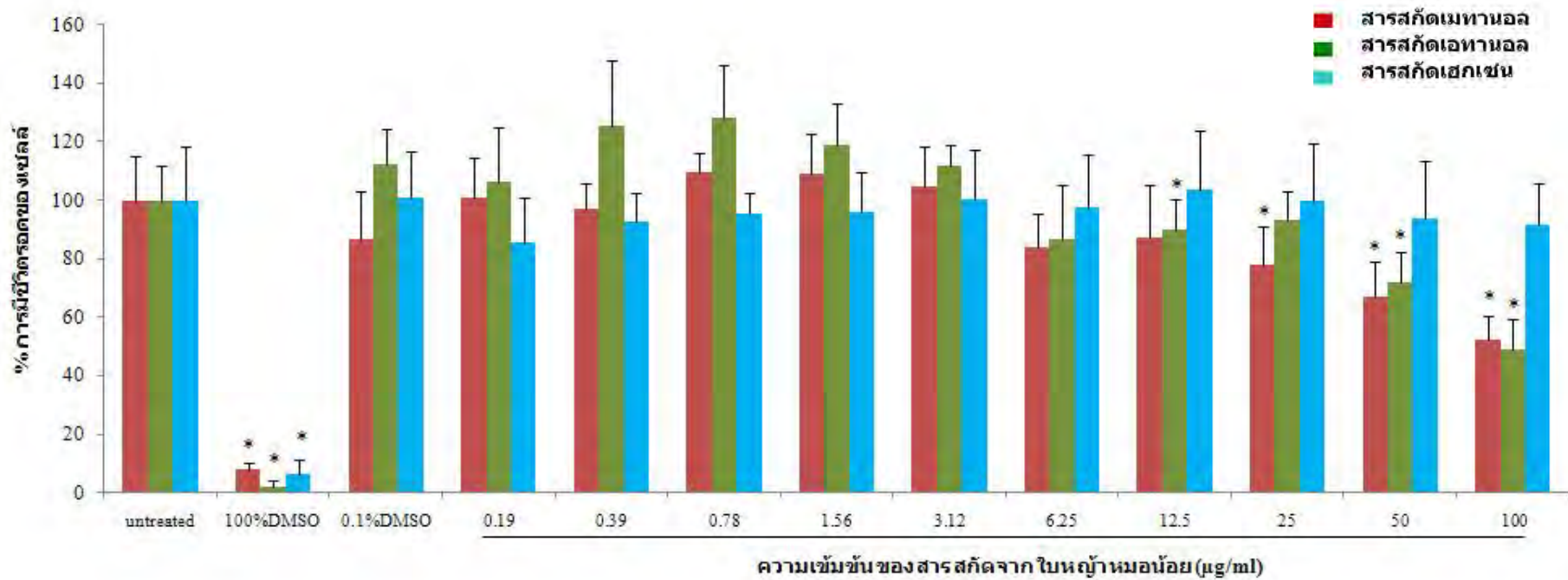
จากการศึกษาส่วนลำต้นของหญ้าหมอนน้อย พบว่า สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.26)



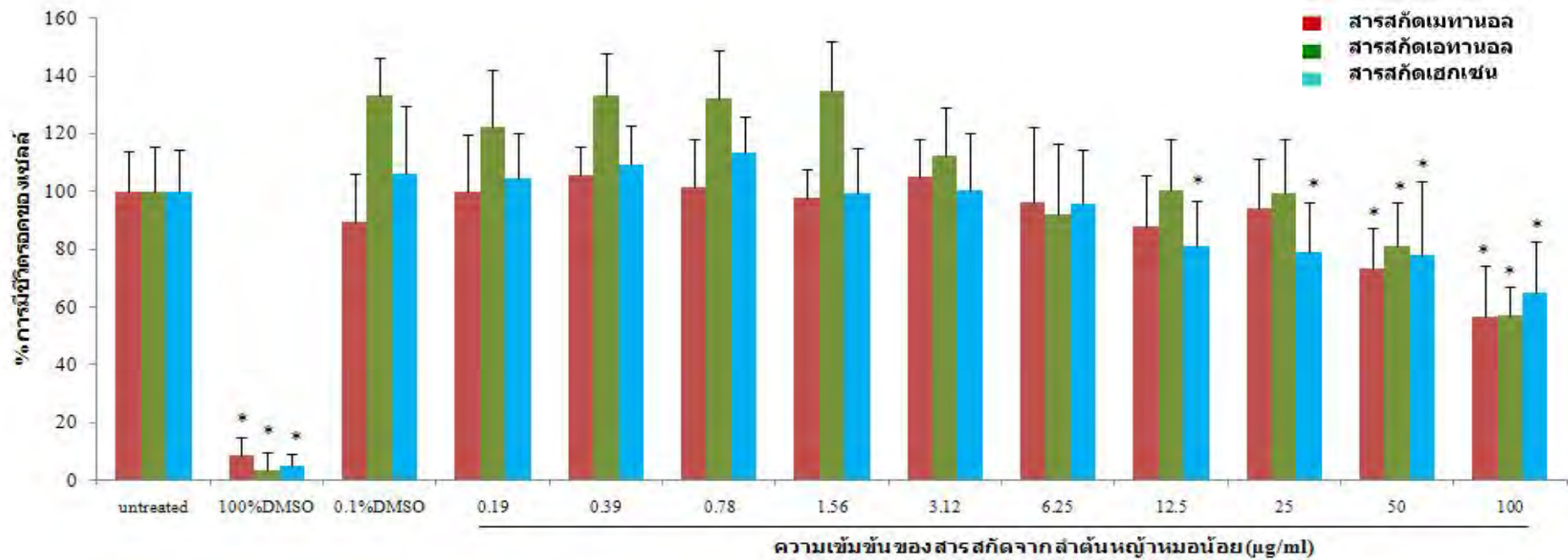
ภาพที่ 4.23 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.24 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.25 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.26 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

4.9 ผลของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในส่วนต่างๆของหญ้าหมอน้อยที่สกัดจากตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (HuH7) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวัดค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%cell viability) ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งมีเซลล์ที่ถูกทดสอบกับ DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดหญ้าหมอน้อยเป็น กลุ่มควบคุมลบ (negative control) โดยมี control solvent คือสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.1เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้จะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ

- ผลของสารสกัดจากทั้งต้นหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการมีชีวิตของเซลล์ HuH7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่สารสกัดเมทานอลและสารสกัดเฮกเซน ไม่ได้ส่งผลให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ลดลง (ภาพที่ 4.27)

- ผลของสารสกัดจากดอกหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7

เมื่อทำการศึกษาสารสกัดจากส่วนดอกของหญ้าหมอน้อย พบว่า สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกของหญ้าหมอน้อยมีค่า IC_{50} ที่ 37.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.28)

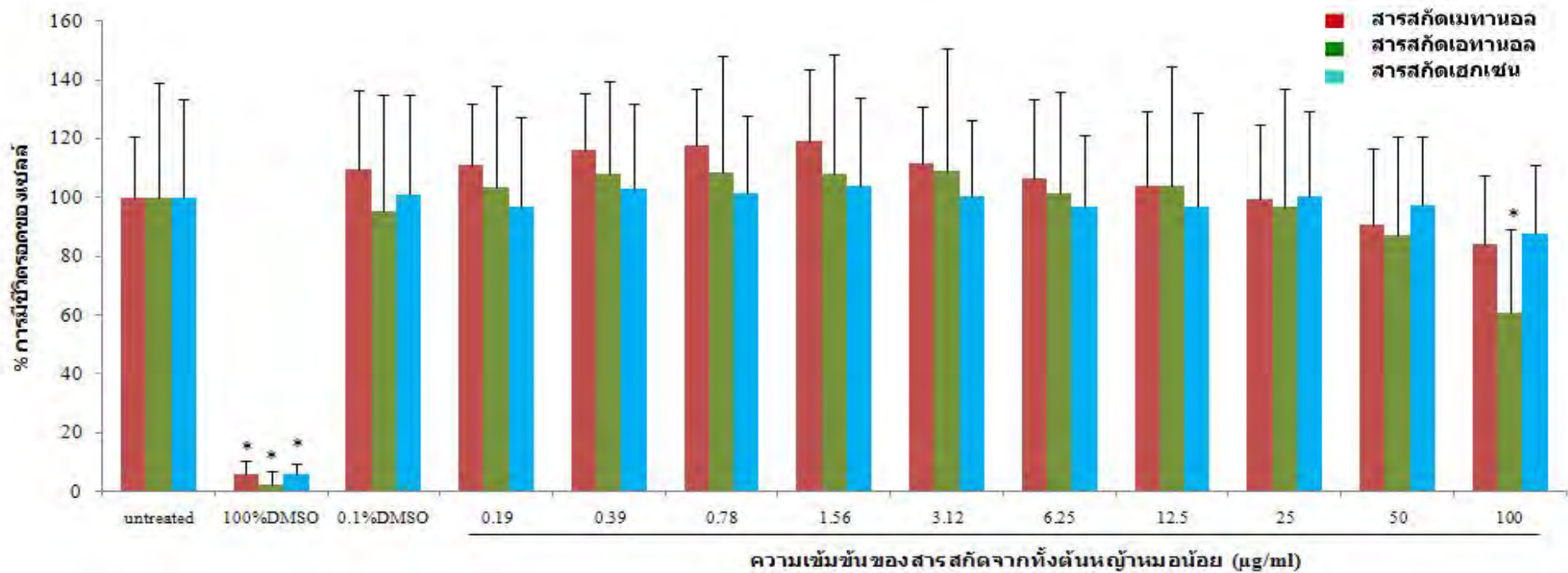
- ผลของสารสกัดจากใบหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7

สารสกัดเอทานอลจากใบของหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการมีชีวิตของเซลล์ HuH7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่สารสกัดเมทานอลและสารสกัดเฮกเซน ไม่ได้ส่งผลให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ลดลง และพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบของหญ้าหมอน้อยมีค่า IC_{50} ที่ 75.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.29)

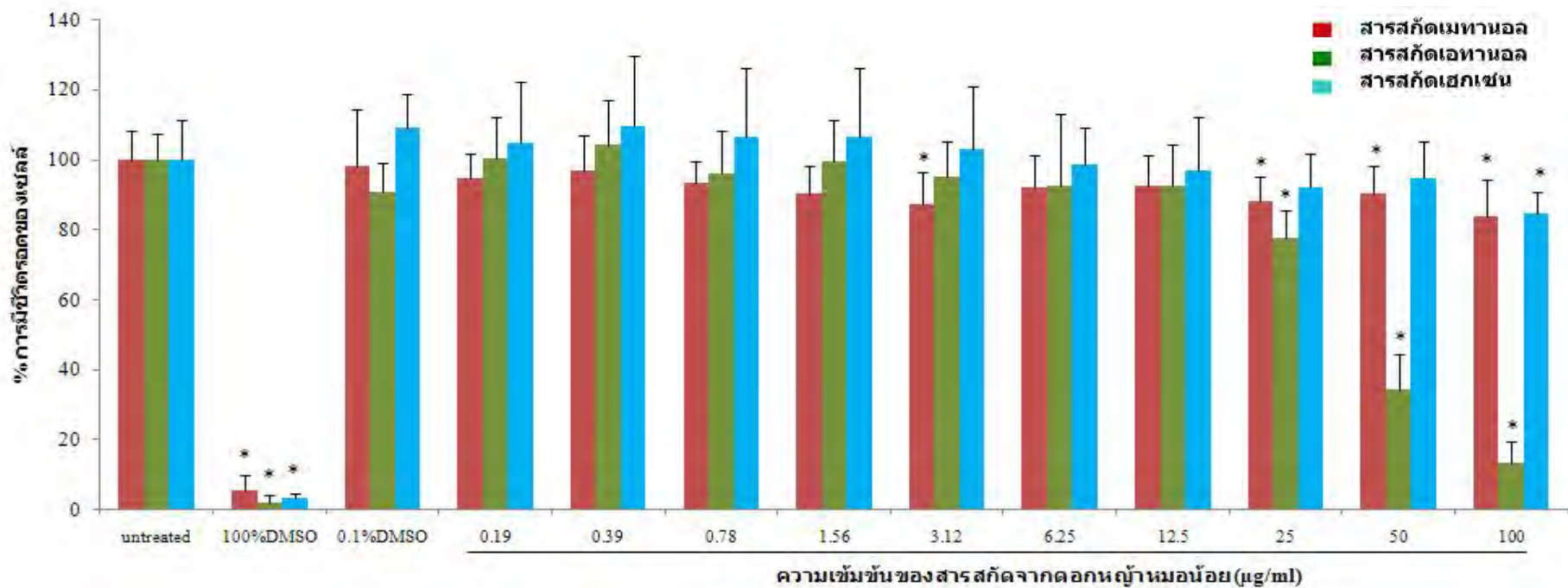
- ผลของสารสกัดจากลำต้นหญ้าหมอน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7

จากการศึกษาส่วนลำต้นของหญ้าหมอน้อย พบว่า สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่า

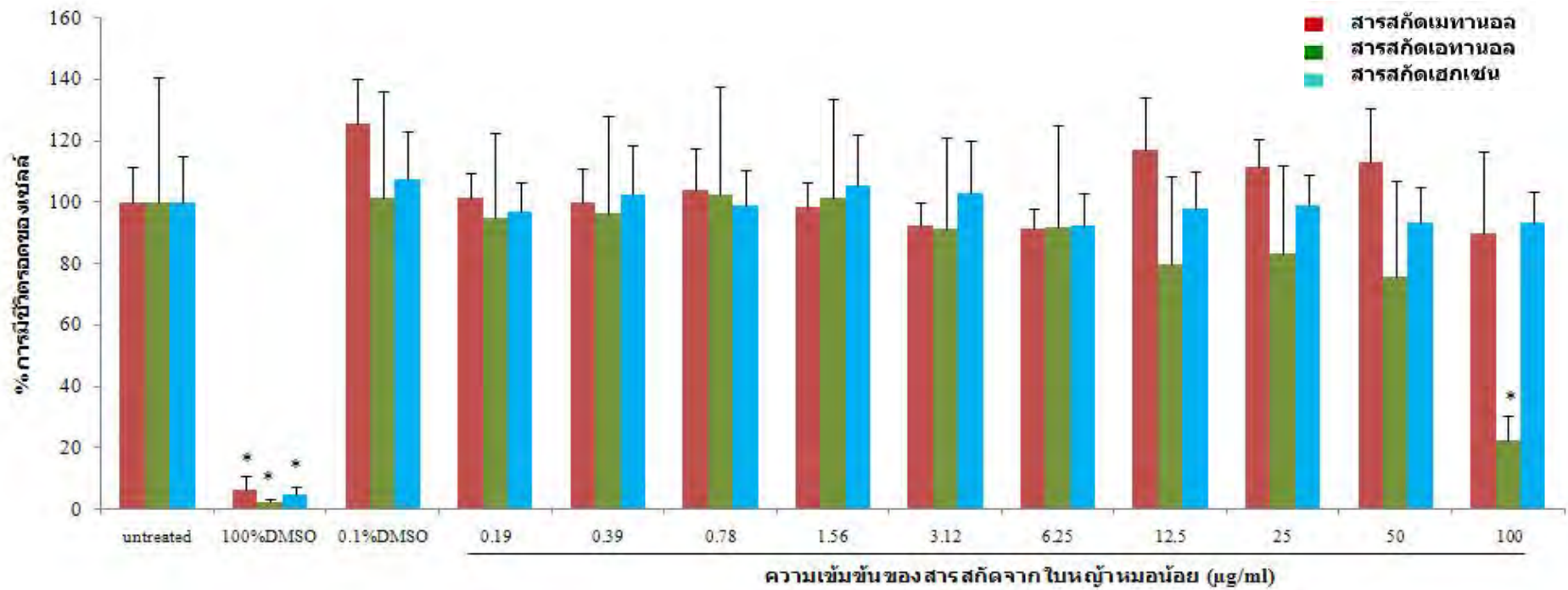
การมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่สารสกัดเห็กเซนไม่ได้ส่งผลให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ลดลง (ภาพที่ 4.30)



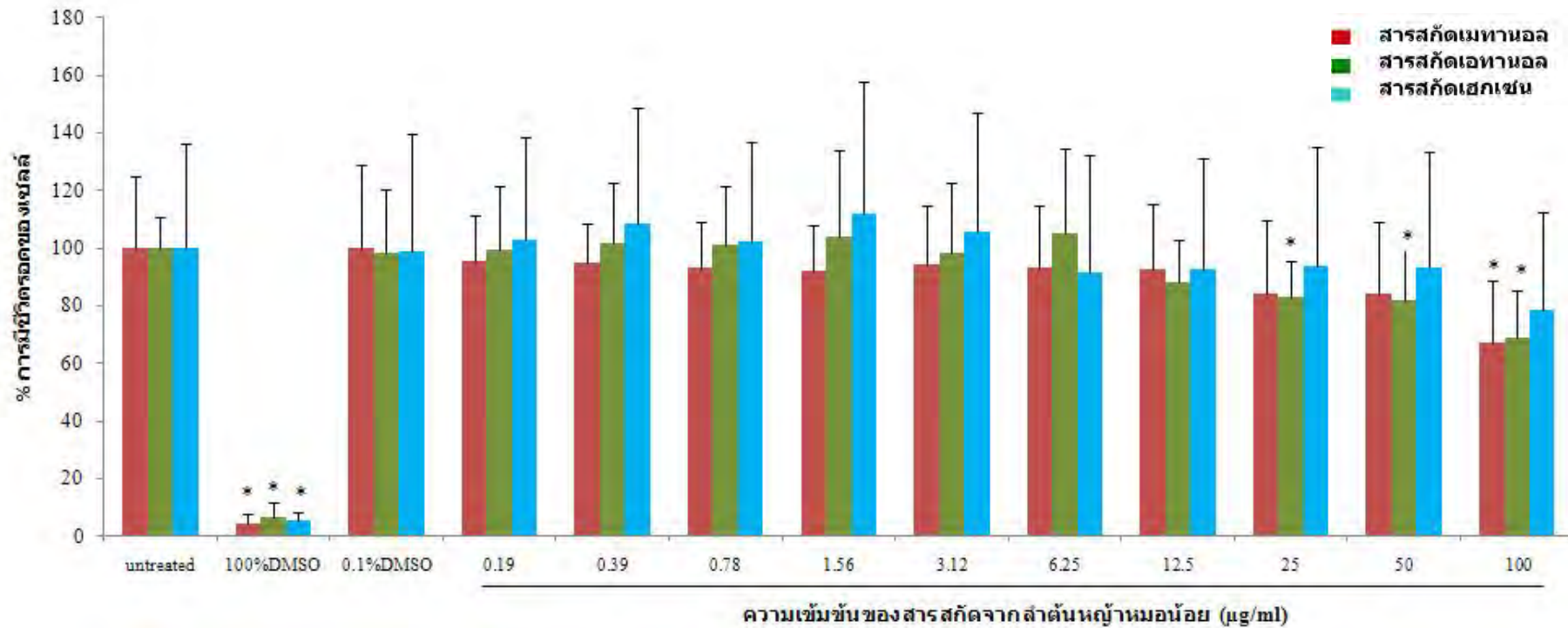
ภาพที่ 4.27 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.28 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.29 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากใบของหญ้าหมอนน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)



ภาพที่ 4.30 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HuH7 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากลำต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 0.19 -100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบด้วย MTT assay (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) (* คือ $P < 0.05$)

สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล

- ผลของสารสกัดหญ้าหมอนน้อยต่อการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ของ

PBMCs

สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้น (12.50 µg/ml) และใบ (12.50 และ 25 µg/ml), สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้น (6.25 µg/ml) และสารสกัดเฮกเซนจากลำต้น (12.50 µg/ml) สามารถลดระดับ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีสารสกัดใดเลยที่มีผลต่อระดับ TNF- α อย่างมีนัยสำคัญ

- ผลของสารสกัดหญ้าหมอนน้อยต่อการหลั่ง anti-inflammatory cytokine ของ

PBMCs

สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้น (6.25 µg/ml) เพิ่มการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้น, ดอก และใบ (100 µg/ml) และสารสกัดเอทานอลจากดอก (25 µg/ml), ใบ (50 µg/ml) และลำต้น (100 µg/ml) ยับยั้งการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

- ผลของสารสกัดหญ้าหมอนน้อยต่อ NF- κ B signaling pathway

สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้น (12.50 µg/ml) และใบ (12.50 และ 25 µg/ml), สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้น (6.25 µg/ml) และสารสกัดเฮกเซนจากลำต้น (12.50 µg/ml) สามารถลดระดับ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B

- ผลของสารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 และ

HuH7

สารสกัดเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน จากทั้ง 4 ส่วนของหญ้าหมอนน้อยทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 และ HuH7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

การประเมินความเป็นพิษสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (PBMCs)

สารสกัดเมทานอลและ เฮกเซน ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pratheeshkumar และคณะในปี 2010 พบว่า สารสกัดเมทานอลจากส่วนใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อยในสัตว์ทดลอง [128] ในปี 2010 มีรายงานว่า Latha และคณะได้ศึกษาความเป็นพิษของหญ้าหมอน้อย โดยศึกษา ความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxic) พบว่า สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลองและ brine shrimp ทั้งยังไม่ทำให้อวัยวะใดๆ ของหนูทดลองมีการเปลี่ยนแปลง [129] แต่ผู้วิจัยพบว่า สารสกัดเอทานอลจากดอกของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบและทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

การศึกษาฤทธิ์และกลไกต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยในเซลล์ PBMCs โดยวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค sandwich - ELISA

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยในเซลล์ PBMCs ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ LPS เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ เนื่องจากเมื่อ LPS จับกับ TLR4 บนเซลล์ของเม็ดเลือดขาว จะเกิดการส่งสัญญาณต่อไปยัง NF- κ B signaling pathway ทำให้ NF- κ B เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส แล้วไปจับกับ NF- κ B binding site ที่ตำแหน่ง promoter ของยีน TNF- α และ IL-6 ทำให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ เช่น TNF- α และ IL-6 ขึ้นมา ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการทดสอบสารสกัดกับเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อจะดูว่าสารสกัดจากหญ้าหมอน้อย

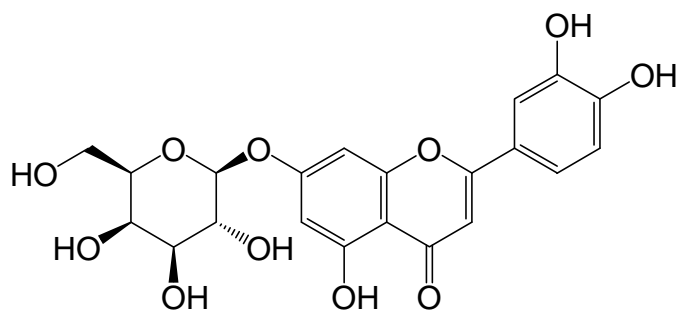
สามารถลดการไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบหรือเพิ่มการสร้างไซโตไคน์ที่ด้านการอักเสบได้หรือไม่ จากผลการศึกษา พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเฮกเซนจากลำต้นของหญ้าหมอน้อย สามารถลดระดับของไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ นั่นก็คือ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pratheeshkumar และคณะ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยสามารถลดระดับ IL-6 ของ macrophage ในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญ [13] แต่ที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดที่สามารถลดระดับ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญกลับไม่มีผลต่อระดับ TNF- α นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดเมทานอล เอทานอลและ เฮกเซนจากหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้นต่ำๆ ไม่มีผลต่อการหลั่ง IL-10 เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม (LPS) ยกเว้นสารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มการหลั่ง IL-10 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ด้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปกลับพบว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกและใบของหญ้าหมอน้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลจากดอกและใบของหญ้าหมอน้อย ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยับยั้งการหลั่ง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อาจเป็นเพราะว่าที่ความเข้มข้นสูงๆ อาจมีสารบางอย่างที่ยับยั้งการสร้าง IL-10

แต่สารสกัดที่สามารถลดระดับ IL-6 ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปกลับไม่ส่งผลต่อระดับของ IL-6 อาจจะเป็นเพราะ สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงๆ อาจมีสารออกฤทธิ์บางชนิดที่ทำให้เกิดการอักเสบในปริมาณมาก หรือ มีสารบางชนิดในปริมาณสูงที่ไปบดบัง (masking) การทำงานของสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในการลดระดับ IL-6 ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต โดยต้องแยกสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดออกมาเป็นส่วนๆ และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยขบวนการ Thin Layer Chromatography (TLC) แล้วนำไประบุชนิดของสารด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) แล้วนำสารที่แยกออกมาแต่ละส่วนไปทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ เพื่อที่จะได้รู้ว่าสารตัวไหนที่ทำหน้าที่ด้านการอักเสบอย่างแท้จริง

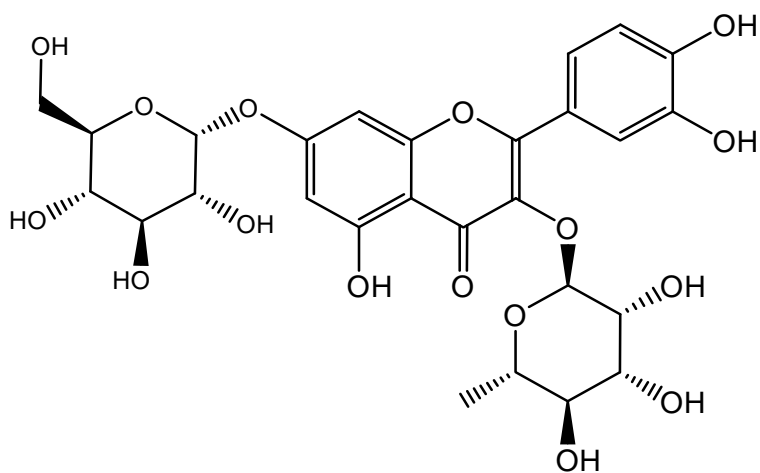
ในภาวะปกติเมื่อร่างกายเกิดภาวะอักเสบ จะเกิดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α และ IL-6 ออกมาและ เมื่อมีการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันก็ต้องมีกลไกที่ยับยั้งการตอบสนองตามมาเพื่อไม่ให้เกิดการตอบสนองมากเกินไป ซึ่งอาจทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อตนเองได้ จึงเกิดการสร้าง anti-inflammatory cytokine คือ IL-10 ออกมา IL-10 ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างไซโตไคน์เหนี่ยวนำการอักเสบต่างๆ เช่น IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF และ TNF- α ในระดับของ gene transcription [130-133] มีการศึกษา พบว่า IL-10 ลดการสร้าง TNF- α และ IL-6 โดยการ stabilize I κ B- α ส่งผลให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและทำงานได้ จึงทำให้เกิดการสร้าง TNF- α และ IL-6 ลดลง [134] สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า IL-10 เมื่อจับกับตัวรับจะส่งสัญญาณผ่านทาง JAK/STAT pathway ซึ่งไปยับยั้งสัญญาณใน NF- κ B signaling pathway [80]

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากหญ้าหมอนน้อยออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งกลไกการทำงานของ NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในกระบวนการสร้างไซโตไคน์เหนี่ยวนำการอักเสบ โดยสารสกัดทำให้ NF- κ B เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้ลดลง ส่งผลให้การสร้างไซโตไคน์เหนี่ยวนำการอักเสบมีปริมาณลดลง ผู้วิจัยคาดว่าระดับ IL-6 ที่ลดลง โดยผ่านทางกรยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส มีสาเหตุจากสารสำคัญในใบของหญ้าหมอนน้อย ได้แก่ luteolin 7-O-glucoside, quercetin 7-O-glucoside 3-O-rhamnoside ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม terpenoid และ flavonoid ตามลำดับ มีการศึกษา พบว่า luteolin 7-O-glucoside (ภาพที่ 5.1) สามารถลด NF- κ B transcription activity ใน เนื้อเยื่อลำไส้ได้(intestinal epithelial cells) [101] และพบว่า luteolin สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-6 ในเซลล์ murine macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ [135] นอกจากนั้นยังสามารถลด IL-6 ในสมองหนูทดลองด้วยการยับยั้ง JNK signaling pathway และยับยั้ง AP-1 ซึ่งเป็น transcription factor สำหรับ IL-6 [136, 137] การศึกษาของ Odontuya และคณะ พบว่า luteolin สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้สร้าง tromboxane B₂ และ leukotriene B₄ ซึ่งเป็น proinflammatory mediator และยับยั้งการสร้าง arachidonic acid ด้วย [138] ส่วนการศึกษาของ Gabriel และคณะพบว่า luteolin ยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ใน RAW 254.7 macrophage cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ [139] ในส่วนของ quercetin 7-O-glucoside 3-O-rhamnoside (ภาพที่ 5.2) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและ pro-apoptotic ใน lung carcinoma cell line [113] นอกจากนั้น งานวิจัย ยังพบว่าสามารถยับยั้งการ

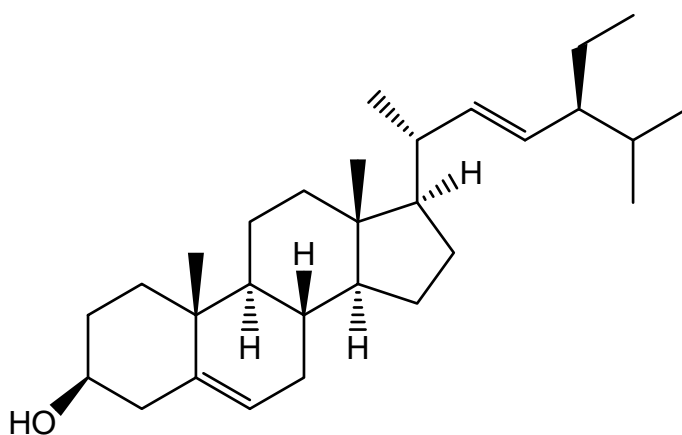
แสดงออกของ iNOS (inducible nitric oxide synthase) ในระดับ mRNA และโปรตีน โดยยับยั้งการทำงานของ NF- κ B และ STAT-1 ซึ่งเป็น transcription factor ของ iNOS ทำให้สร้าง NO ออกมาน้อยลง [140] สารออกฤทธิ์ในส่วนของลำต้น คือ stigmasterol (ภาพที่ 5.3) เป็นสารในกลุ่ม phytosterol มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง IL-4 และ histamine ทำให้ลดอาการแพ้ตามฤดูกาลได้ (seasonal allergy) และพบว่า มีผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากมีฤทธิ์ควบคุม IL-6 ส่งผลป้องกัน lung ต่อภาวะ dysfunction ต่างๆ นอกจากนั้นยังสามารถลดระดับ LDL ได้ [141] สารออกฤทธิ์ด้านอีกเสบที่พบทั้งต้นของหญ้าหมอน้อย คือ lupeol acetate, beta-amyrin acetate อยู่ในกลุ่ม triterpenoid ,chlorogenic acid และ apigenin [10, 142, 143] lupeol acetate (ภาพที่ 5.4) ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง TNF- α และลดจำนวนเซลล์ที่ผลิต iNOS ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับไซโตไคน์เหนี่ยวนำการอักเสบ [110] การศึกษาของ Mohammad และคณะ พบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหนูทดลองโดยยับยั้งการทำงานของ NF- κ B และ IKK α รวมถึงยับยั้งการย่อยสลาย (degradation) และ phosphorylation ของ I κ B α ในหนูทดลอง [114] ส่วน beta-amyrin acetate (ภาพที่ 5.5) สามารถเพิ่มจำนวนของ murine macrophage และมีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยยับยั้งการสร้าง NO [109] นอกจากนั้น ยังสามารถยับยั้ง IL-1 และเก็บสะสม (restore) ระดับ IL-10 ในลำไส้หนู และลดระดับ COX-2 โดยยับยั้ง NF- κ B และ CREB signaling pathway [144] ตัวต่อไปคือ chlorogenic acid (ภาพที่ 5.6) เป็น natural polyphenol ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านมะเร็ง [115] นอกจากนั้นยังสามารถลด mutagenic และ genotoxic จาก nitrosourea และ ป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอถูกทำลายได้ [145] ทั้งยังลดการสร้าง IL-1, TNF, IL-6 IFN- γ และ chemokine ได้ [108] สารตัวสุดท้ายคือ apigenin (ภาพที่ 5.7) เป็นสารในกลุ่ม flavonoid มีโครงสร้างคล้ายกับ luteolin ทำหน้าที่ยับยั้ง inflammatory mediator เช่น NO และ PGE₂ (prostaglandin E₂) [146] มีงานวิจัย พบว่า apigenin ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยป้องกัน I κ B degradation และยับยั้ง IKK ใน macrophage ของหนูทดลอง [111]



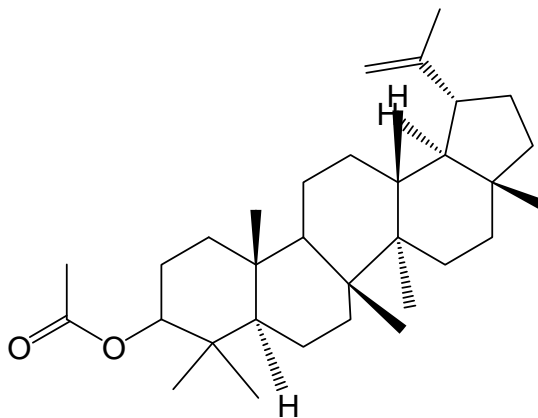
ภาพที่ 5.1 โครงสร้างของ Luteolin 7-O-glucoside



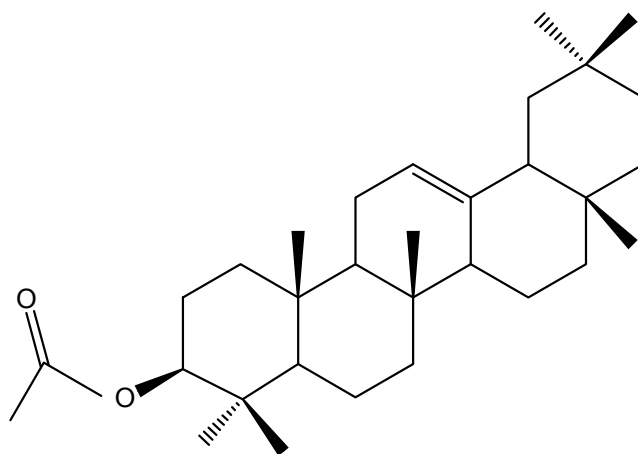
ภาพที่ 5.2 โครงสร้างของ Quercetin 7-O-glucoside 3-O-rhamnoside



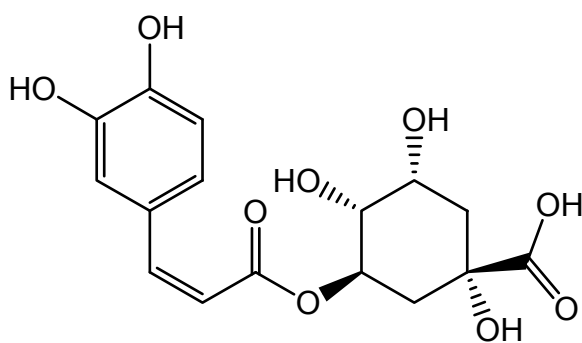
ภาพที่ 5.3 โครงสร้างของ Stigmasterol



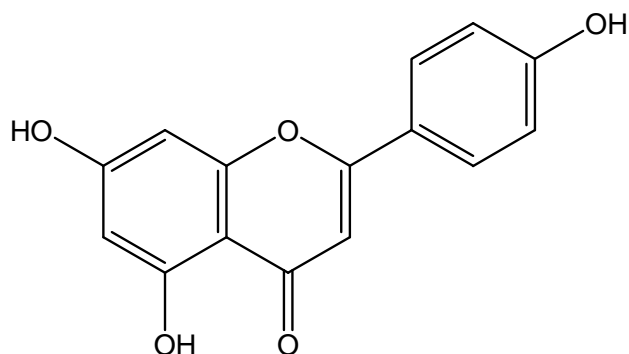
ภาพที่ 5.4 โครงสร้างของ Lupeol acetate



ภาพที่ 5.5 โครงสร้างของ Beta-amyrin acetate



ภาพที่ 5.6 โครงสร้างของ Chlorogenic acid



ภาพที่ 5.7 โครงสร้างของ Apigenin

ถึงแม้ว่าสารสกัดจากเห็ดหมอนน้อยจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผ่านทางการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส และยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ทำให้ระดับของไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ คือ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ส่งผลต่อ TNF- α เนื่องจากกระบวนการถอดรหัสของยีน (gene transcription) บางครั้งต้องอาศัยการทำงานของ transcription factor หลายชนิด และ transcription factor ก็มีความจำเพาะในแต่ละยีนแตกต่างกันไป รวมถึง TNF- α และ IL-6 มีตำแหน่งสำหรับ transcription factor ที่เหมือนกัน คือ NF- κ B แต่ก็มี transcription factor ที่ต่างกัน คือ lipopolysaccharide induced TNF- α factor (hLITAF) เมื่อ hLITAF ไปจับกับตำแหน่งที่จำเพาะบนยีน TNF- α จะนำไปสู่การหลั่ง TNF- α [147] จากเหตุผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ TNF- α ไม่ได้ขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงของระดับ IL-6

การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดหมอนน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 และ HuH7

การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดหมอนน้อยต่อค่าการมีชีวิตรอดของ HuH7 ซึ่งเป็นเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เป็นมะเร็งตับ และ HEK293 ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็นมะเร็งไต พบว่า สารสกัดจากเห็ดหมอนน้อยจากทุกตัวทำลายของทั้ง 4 ส่วนของเห็ดหมอนน้อยทำให้เซลล์ HuH7 และ HEK293 มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง สรุปได้ว่า สารสกัดเห็ดหมอนน้อยจากตัวทำลาย เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นมะเร็ง

ตับและมะเร็งไต ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Kuo และคณะ ที่ทำการแยกสารสำคัญจากสารสกัดเอทานอลจากส่วนลำต้นของหญ้าหมอนน้อย พบสารสำคัญที่ค้นพบใหม่ 2 ตัวซึ่งอยู่ในประเภท terpenoid ชนิด sesquiterpene lactones ซึ่งก็คือ vernolide-A และ vernolide -B เมื่อนำสาร 2 ตัวนี้มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์ต่อไปนี้ KB (มะเร็งในช่องปาก), DLD-1 (มะเร็งลำไส้ใหญ่), NCI-661 (มะเร็งปอดขนาดใหญ่) และ Hela (มะเร็งปากมดลูก) [117] นอกจากนี้การศึกษานี้ของ Pratheeshkumar และคณะ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากหญ้าหมอนน้อยยับยั้ง การ metastasis ในปอด ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย B16F-10 melanoma cells ในหนูทดลองได้ โดยยับยั้ง lung tumor formation และ lung metastasis [112]

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยในอนาคตควรแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) และนำไประบุชนิดของสารด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อ PBMCs เพื่อที่จะทราบได้ว่าสารสำคัญตัวไหนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบอย่างแท้จริง
2. ศึกษากลไกต้านการอักเสบของสารสกัดในการยับยั้ง NF- κ B nuclear translocation เพื่อที่จะทราบข้อมูลที่แท้จริงว่าสารสกัดไปยับยั้งกระบวนการใดใน NF- κ B signaling pathway

รายการอ้างอิง

- [1] Medzhitov, R., and Janeway, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunological Reviews. 173 (2000):89-97.
- [2] Elenkov, I., and Chrousos, G. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. Trends in Endocrinology and Metabolism. 10 (1999):359-68.
- [3] Fearon, D., and Locksley, R. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science(Washington). 272 (1996):50.
- [4] ASJr B. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annual Review Immunology. 14 (1996):649-83.
- [5] Abou-Raya, A., and Abou-Raya, S. Inflammation: a pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. Autoimmunity Reviews. 5 (2006):331-7.
- [6] Curry, J. et al. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. Archives of Pathology & Laboratory Medicine.(2009).
- [7] Firestein, G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature. 423 (2003):356-61.
- [8] Linton, M., and Fazio, S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. International Journal of Obesity. 27 (2003):S35-S40.
- [9] ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สมุนไพรพื้นบ้าน(5). บริษัท ประชาชน จำกัด. 2543.
- [10] Iwalewa, E., Iwalewa, O., and Adeboye, J. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of Vernonia cinerea less leaf. Journal of ethnopharmacology. 86 (2003):229-34.
- [11] Latha, R., Geetha, T., and Varalakshmi, P. Effect of Vernonia cinerea Less flower extract in adjuvant-induced arthritis. General pharmacology. 31 (1998):601-6.
- [12] Kumar, P., and Kuttan, G. Vernonia cinerea L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 31 (2009):94-102.
- [13] Pratheeshkumar, P., and Kuttan, G. Modulation of immune response by Vernonia cinerea L. inhibits the proinflammatory cytokine profile, iNOS, and COX-2

- expression in LPS-stimulated macrophages. Immunopharmacology and Immunotoxicology. (2010):1-11.
- [14] Abbas, A., and Lichtman, AH. Cellular and molecular immunology 6th ed: University of California-San Francisco: 2010.
- [15] Horton, R. et al. Gene map of the extended human MHC. Nature Reviews Genetics. 5 (2004):889-99.
- [16] Goodwin, K., Viboud, C., and Simonsen, L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. Vaccine. 24 (2006):1159-69.
- [17] Gress, R., and Deeks, S. Reduced thymus activity and infection prematurely age the immune system. Journal of Clinical Investigation. (2009).
- [18] Linton, P., and Dorshkind, K. Age-related changes in lymphocyte development and function. Nature immunology. 5 (2004):133-9.
- [19] Bouman, A., Heineman, M., and Faas, M. Sex hormones and the immune response in humans. Human reproduction update. 11 (2005):411.
- [20] Gleeson, M., Nieman, D., and Pedersen, B. Exercise, nutrition and immune function. Journal of sports sciences. 22 (2004):115-25.
- [21] L mmermann, T., and Sixt, M. The microanatomy of T-cell responses. Immunological Reviews. 221 (2008):26-43.
- [22] Corthesy, B., Gaskins, H., and Mercenier, A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. Journal of Nutrition. 137 (2007):781S.
- [23] Sasseville, V., and Diters, R. Impact of infections and normal flora in nonhuman primates on drug development. International League of Associations for Rheumatology. 49 (2008):179.
- [24] Hoffmann, J., Kafatos, F., Janeway, Jr C., and Ezekowitz, R. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 284 (1999):1313.
- [25] Aderem, A., and Underhill, D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annual Review of Immunology. (2003).
- [26] Janeway, Jr C., and Medzhitov, R., editors. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. Seminars in Immunology.(1998).
- [27] Medzhitov, R., and Janeway, C. Innate immunity. New England Journal of Medicine. 343 (2000):338.

- [28] Steinman, R., and Hemmi, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. From Innate Immunity to Immunological Memory. Current Topics in Microbiology and Immunology. (2006):17-58.
- [29] Mak, T., and Saunders, M. The immune response: basic and clinical principles. Shock. 27 (2007):220.
- [30] Imler, J., and Hoffmann, J. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. Current Opinion In Microbiology. 3 (2000):16-22.
- [31] Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J., and Hoffmann, J. The dorsoventral regulatory gene cassette *spz/tzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell. 86 (1996):973-83. [28] Ulevitch R., Tobias P. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Current opinion in immunology. 11 (1999):19-22.
- [32] Williams, M., Rodriguez, A., Kimbrell, D., and Eldon, E. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. The European Molecular Biology Organization Journal. 16 (1997):6120-30.
- [33] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 388 (1997):394-7.
- [34] Akira S., and Takeda, K. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology. 4 (2004):499-511.
- [35] Nishiya, T., and DeFranco, A. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. Journal of Biological Chemistry. 279 (2004):19008.
- [36] Ulevitch, R., and Tobias, P., Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Current opinion in immunology. 11(1999):19-22.
- [37] Takeda, K., and Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. International immunology. 17 (2005):1.
- [38] Schumann, R. et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science. 249 (1990):1429.

- [39] Wright, S., Ramos, R., Tobias, P., Ulevitch, R., and Mathison, J. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 249 (1990) :1431.
- [40] Lu, Y., Yeh, W., and Ohashi, P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 42 (2008):145-51.
- [41] O'Garra, A., and Vieira, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. Nature Reviews Immunology. 7 (2007):425-8.
- [42] Elenkov, I. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Annals of the New York Academy of Sciences. 1024 (2004):138-46.
- [43] Luft, P., Oostingh, G., Gruijthuijsen, Y., Horejs-Hoeck, J., Lehmann, I., and Duschl, A. Patulin influences the expression of Th1/Th2 cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells and T cells through depletion of intracellular glutathione. Environmental toxicology. 23 (2008):84-95.
- [44] Minami, K. et al. Negative feedback regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. Blood. 106 (2005):1685.
- [45] Okamoto, T., Iwata, S., Ohnuma, K., Dang, N., and Morimoto, C. Histamine H1-receptor antagonists with immunomodulating activities: potential use for modulating T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine imbalance and inflammatory responses in allergic diseases. Clinical & Experimental Immunology. 157 (2009):27-34.
- [46] Hotamisligil, G. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 444 (2006):860-7.
- [47] Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M., and Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nature Reviews Immunology. 7 (2007):678-89.
- [48] Majno, G., and Joris, I. Cells, tissues, and disease: principles of general pathology. Oxford University Press. (2004).
- [49] Serhan, C. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. Annual Review of Immunology. 25 (2007).

- [50] Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nature Reviews Immunology. 6 (2006):173-82.
- [51] Serhan, C., and Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nature immunology. 6 (2005):1191-7.
- [52] Marie, C., Pitton, C., Fitting C, and Cavaillon, J. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGF) of interleukin-8 production by LPS-and/or TNF - activated human polymorphonuclear cells. Mediators of inflammation. 5 (1996):334.
- [53] Drayton, D., Liao, S., Mounzer, R., and Ruddle, N. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. Nature immunology. 7 (2006):344-53.
- [54] Coussens, L., and Werb, Z. Inflammation and cancer. Nature. 420 (2002):860-7.
- [55] Shacter, E., and Weitzman, S. Chronic inflammation and cancer. Oncology. 16 (2002):217-26.
- [56] Fox J., and Wang, T. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. Journal of Clinical Investigation. 117 (2007):60-9.
- [57] Karin, M. NF- κ B and cancer: mechanisms and targets. Molecular carcinogenesis. 45 (2006):355-61.
- [58] Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., and Matias-Guiu, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. Virchows Archiv. 446 (2005):475-82.
- [59] JLi, L., Kamata, H., and Karin, M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death: a new approach to cancer therapy. The Journal of Clinical Investigation. 115 (2005):2625-32.
- [60] Tedgui, A., and Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiological reviews. 86 (2006):515.
- [61] McInnes, I., and Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nature Reviews Immunology. 7 (2007):429-42.
- [62] Brennan, F., and McInnes, I. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. The Journal of clinical investigation. 118 (2008):3537.
- [63] Reljic R., Stylianou E., Balu S., Ma J. Cytokine interactions that determine the outcome of mycobacterial infection of macrophages. Cytokine. (2010).

- [64] Huret, J., Dessen, P., and Bernheim, A. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. Nucleic Acids Research. 31 (2003) :272-4.
- [65] Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell. 53 (1988):45-53.
- [66] Jue, DM., Sherry, B., Luedke, C., Manogue, KR., and Cerami, A. Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. Biochemistry. 29 (1990):8371-7.
- [67] Payvandi, F. et al. Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-[alpha], IL-1 [beta], and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. Cellular immunology. 230 (2004):81-8.
- [68] Rocca, B., and FitzGerald, G. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. International immunopharmacology. 2 (2002):603-30.
- [69] Lin, W., and Yeh, W. Implication of Toll-like receptor and Tumor Necrosis Factor [alpha] Signaling in Septic shock. Shock. 24 (2005):206.
- [70] Hussain, S., Hofseth, L., and Harris, C. Radical causes of cancer. Nature Reviews Cancer. 3 (2003):276-85.
- [71] Leung, L., and Cahill, C. TNF and neuropathic pain - a review. Journal of Neuroinflammation. (2010).
- [72] Kary, S. et al. New onset or exacerbation of psoriatic skin lesions in patients with definite rheumatoid arthritis receiving tumour necrosis factor antagonists. Annals of the rheumatic diseases. 65 (2006):405.
- [73] Scott, D., and Kingsley, G. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. The New England journal of medicine. 355 (2006):704.
- [74] Mocellin, S., Rossi, C., Pilati, P., and Nitti, D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. Cytokine & growth factor reviews. 16 (2005):35-53.
- [75] Dinarello, C. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annual review of immunology. 27 (2009):519-50.
- [76] Tanaka, Y., Nakayamada, S., and Okada, Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. Current Drug Targets-Inflammation 38; Allergy. 4 (2005):325-8.

- [77] Polgar, A. et al. Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Medical Science Monitor. 6 (2000):13-8.
- [78] Rose-John, S., and Neurath M. IL-6 trans-Signaling: The Heat Is On. Immunity. 20 (2004):2-4.
- [79] Dinarello, C. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. Chest. 112 (1997):321S.
- [80] Tak, P., and Firestein, G. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. Journal of Clinical Investigation. 107 (2001):7-12.
- [81] Blankenstein, T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. Current Opinion In Immunology. 17 (2005):180-6.
- [82] Abbas, A. Cellular and molecular immunology 6th ed: University of California-San Francisco. 2010.
- [83] Sweet, M., and Hume, D. Endotoxin signal transduction in macrophages. Journal of leukocyte biology. 60 (1996):8.
- [84] Van Lenten, B., and Fogelman, A. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor-alpha. The Journal of Immunology. 148 (1992):112.
- [85] Hayden, M., Ghosh, S. Shared principles in NF-[kappa] B signaling. Cell. 132 (2008):344-62.
- [86] Lee, KM. et al. Spinal NF- kB activation induces COX 2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. European Journal of Neuroscience. 19 (2004):3375-81.
- [87] Li, Z., and Nabe, I G. A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. Molecular and cellular biology. 17 (1997):6184.
- [88] Chen, Z. et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. Genes & development. 9 (1995):1586.

- [89] Han, Z., Boyle, D., Manning, A., and Firestein, G. AP-1 and NF- κ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. Autoimmunity. 28 (1998):197-208.
- [90] Hart, LA., Krishwan, VL., Addock, IANM., Barnes, PJ., and Chung K. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappa B, in asthma. American journal of respiratory and critical care medicine. 158 (1998):1585.
- [91] Neurath, MF. et al. Cytokine Gene Transcription By NF - κ B Family Members in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 859 (1998):149-59.
- [92] Collins, T., and Cybulsky, MI. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? Journal of Clinical Investigation. 107 (2001):255-66.
- [93] Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature immunology. 8 (2001):675-80.
- [94] Yin, MJ., Yamamoto, Y., and Gaynor, RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase. Nature. 396 (1998):77-80.
- [95] Yamamoto, Y., Yin, MJ., Lin, KM., and Gaynor, RB. Sulindac inhibits activation of the NF- κ B pathway. Journal of Biological Chemistry. 274 (1999):27307.
- [96] Aljada, A. et al. Increased I {kappa} B expression and diminished nuclear NF- {kappa} B in human mononuclear cells following hydrocortisone injection. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 84 (1999):3386.
- [97] Kang, B., Chung, S., and Kim, T. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by parthenolide, a predominant sesquiterpene lactone in *Tanacetum parthenium*: involvement of nuclear factor-[kappa] B. Immunology Letters. 77 (2001):159-63.
- [98] Whan Han, J. et al. Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo oxygenase 2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF- κ B. British journal of pharmacology. 133 (2001):503-12.
- [99] Hwang, BY. et al. Kaurane diterpenes from *Isodon japonicus* inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 production and NF- κ B activation in LPS-stimulated macrophage RAW264. 7 cells. Planta Med. 67 (2001):406-10.

- [100] Mazor, RL., Menendez, IY., Ryan, MA., Fiedler, MA., and Wong, HR. Sesquiterpene lactones are potent inhibitors of interleukin 8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. Cytokine. 12 (2000):239-45.
- [101] Kim, JS., and Jobin, C. The Flavonoid Luteolin Prevents LPS-Induced NF- κ B Signaling and Gene Expression by Blocking I κ B Kinase Activity in Intestinal Epithelial Cells and Bone Marrow-derived Dendritic Cells. Immunology. 2005.
- [102] Kirtikar. Indian medicinal plants. 1980:1313-4,22-23.
- [103] เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). พิมพ์ครั้งที่ 2. 2523.
- [104] Donrawee, L., Sainatee, P., Prapas, P., Thanyaluck, S., Araya, Y., and Richard, B. Vernonia cinerea Less. supplementation and strenuous exercise reduce smoking rate: relation to oxidative stress status and beta-endorphin release in active smokers. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 7 (2010).
- [105] สรศักดิ์ เหลี้ยวไชยพันธ์. การศึกษากิจกรรมเคมีของหญ้าหมอน้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต.สาขาวิชาเภสัชเวท.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.2528 .
- [106] Stewart LK. et al. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. Metabolism. 57 (2008):S39-S46.
- [107] Sundararaman, P., and Djerassi, C. A convenient synthesis of progesterone from stigmasterol. The Journal of Organic Chemistry. 42 (1977):3633-4.
- [108] Krakauer, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 24 (2002):113-9.
- [109] El-Desouky, SK., and Gamal-Eldeen, AM. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of some constituents from the floral buds of Syringa patula. Pharmaceutical Biology. 47 (2009):872-7.
- [110] Daniel L. et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel. Journal of Inflammation. 7 (2010).

- [111] Liang, YC., Huang, YT., Tsai, SH., Lin-Shiau, SY., Chen, CF., and Lin, JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis. 20 (1999):1945.
- [112] Pratheeshkumar, P., and Kuttan, G. Vernonia cinerea Less. Inhibits Tumor Cell Invasion and Pulmonary Metastasis in C57BL/6 Mice. Integrative Cancer Therapies. (2010).
- [113] Nguyen, T., Tran, E., Nguyen, T., Do, P., Huynh, T., and Huynh, H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. Carcinogenesis. 25 (2004):647.
- [114] Saleem, M., Afaq, F., Adhami, VM., and Mukhtar, H. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. Oncogene. 23 (2004):5203-14.
- [115] Kono, Y. et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1335(1997):335-42.
- [116] Mazumder, U., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P., and Roy, S. Evaluation of anti-inflammatory activity of Vernonia cinerea Less. extract in rats. Phytomedicine. 10 (2003):185-8.
- [117] Kuo, YH. et al. Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide-A and-B, from Vernonia cinerea. Chemical & pharmaceutical bulletin. 51(2003):425-6.
- [118] Wongwiwatthananukit, S., Benjanakaskul, P., Songsak, T., Suwanamajo, S., and Verachai, V. Efficacy of Vernonia cinera for smoking cessation. Journal Health Research. 23 (2009):31-6.
- [119] Simonsen, H. et al. In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. Journal of ethnopharmacology. 74 (2001):195-204.
- [120] Adeboye, J., Asije, W., and Awe, S. Diuretic and antidiuretic activity of the leaf extracts of Vernonia cinerea (Less)(Fam. Compositae). Phytotherapy research. 11 (1997):454-6.
- [121] ภิรมย์ กมลรัตน์กุลและคณะ. หลักการทำวิจัยให้สำเร็จ. 2542.

- [122] Aiura, K. et al. Interaction with Autologous Platelets Multiplies Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Production in Mononuclear Cells. Journal of Infectious Diseases. 175 (1997):123.
- [123] Conti, P. et al. Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist. Immunology. 73 (1991):450.
- [124] Eleftheriadis, T., Antoniadis, G., Liakopoulos, V., Kartsios, C., Stefanidis, I., and Galaktidou, G. Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (LPS) TNF and IL-8 production by human peripheral blood mononuclear cells. International urology and nephrology. 42 (2010):181-5.
- [125] Hofmann, H., Pyrc, K., Van Der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., and Hofmann, S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102 (2005):7988.
- [126] Tolnai, S. A method for viable cell count. Methods in Cell Science. 1 (1975):37-8.
- [127] Werts, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nature immunology. 2 (2001):346-52.
- [128] Pratheeshkumar, P. and Kuttan, G. Ameliorative action of Vernonia cinerea L. on cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress in mice. Inflammopharmacology. 18 (2010):1-11.
- [129] Latha, LY., Darah, I., Jain, K., and Sasidharan, S. Toxicity study of Vernonia cinerea. Pharmaceutical Biology. 48 (2010):101-4.
- [130] Cassatella, M., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M., and Constantin, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. The Journal of experimental medicine. 178 (1993):2207.
- [131] de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C., and de Vries, J. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. The Journal of experimental medicine. 174 (1991):1209.

- [132] D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. The Journal of experimental medicine. 178 (1993):1041.
- [133] de Waal Malefyt, R., Yssel, H., and de Vries, J. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. The Journal of Immunology. 150 (1993):4754.
- [134] Shames, BD. et al. Interleukin-10 stabilizes inhibitory kB-[alpha] in human monocytes. Shock. 10 (1998):389.
- [135] Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T., and Roussos, C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 296 (2001):181.
- [136] Dendorfer, U., Oettgen, P., and Libermann, TA. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. Molecular and cellular biology. 14 (1994):4443.
- [137] Waetzig, V. et al. c Jun N terminal kinases (JNKs) mediate pro inflammatory actions of microglia. Glia. 50 (2005):235-46.
- [138] Odontuya, G., Houtt, J., and Houghton, P. Structure activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. Phytotherapy Research. 19 (2005):782-6.
- [139] Harris, GK., Qian, Y., Leonard, SS., Sbarra, DC., and Shi, X. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. The Journal of nutrition. 136 (2006):1517.
- [140] H m I inen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., and Moilanen, E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-kB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-kB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. Mediators of inflammation. 2007.

- [141] Gould R. Plant Sterols. Nutri News NO. 123
- [142] Misra, T., Singh, R., Srivastava, R., Pandey, H., Prasad, C., and Singh, S. A New Triterpenoidal from *Vernonia cinerea*. Planta Med. 59 (1993):458–60.
- [143] Zhu, H., Tang, Y., Min, Z., and Gong, Z. Bioactive constituents from whole herbs of *Vernonia cinerea* (II)]. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica. 34 (2009):2765.
- [144] Vitor, C., Figueiredo, C., Hara, D., Bento, A., Mazzuco, T., and Calixto, J. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, and amyirin, in a mouse model of colitis. British journal of pharmacology. 157 (2009):1034-44.
- [145] Aeschbacher, H., and Jaccaud, E. Inhibition by coffee of nitrosourea-mediated DNA damage in mice. Food and chemical toxicology. 28 (1990):633-7.
- [146] Raso, GM., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., and Di Carlo, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. Life sciences. 68 (2001):921-31.
- [147] Tang, X., Fenton, MJ., and Amar, S. Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF- promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100 (2003):4096.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

AF-04-09

ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

1. ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

2. ชื่อผู้วิจัย นางสาวจิตติพร เหล่าสิม ตำแหน่ง นิสิต

3. สถานที่ติดต่อผู้วิจัย

(ที่ทำงาน) 154 อาคารจุฬาพัฒน์1 ถนนพระราม1 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม.10330

(ที่บ้าน) 22/38 ซอยเพชรเกษม69 แขวงหนองค้างพลู เขตหนองแขม กรุงเทพฯ 10160

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-218-1089

โทรศัพท์ที่บ้าน 02-8074-174

โทรศัพท์มือถือ 084-343-9387

E-mail : berry_jt@hotmail.com

ขอเรียนเชิญท่านเข้าร่วมในการวิจัย ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย มีความจำเป็นที่ท่านควรทำความเข้าใจเกี่ยวกับงานวิจัยนี้ กรุณาใช้เวลาในการอ่านข้อมูลต่อไปนี้อย่างละเอียดรอบคอบ และสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมหรือข้อมูลที่ไม่ชัดเจนได้ตลอดเวลา รายละเอียดโครงการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. โครงการวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับทดสอบหาฤทธิ์ต้านการอักเสบและกลไกต้านการอักเสบในสารหญ้าหมอน้อย ซึ่งศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและกลไกต้านการอักเสบในสารสกัดหญ้าหมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

3. การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ศึกษาในผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยเพศชาย 10 คน และ เพศหญิง 10 คน อายุระหว่าง 20 – 40 ปี ซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดที่สภากาชาดไทย หรือ นิสิตและบุคลากรคณะ สหเวชศาสตร์ที่มีสุขภาพดี ซึ่งในระหว่างนั้นต้องมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการเจ็บป่วยใดๆ โดยอาศัยการซักถามข้อมูลจากแบบสอบถาม

Inclusion criteria

1. ประชากรชายหรือหญิงอายุระหว่าง 20 – 40 ปีที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

AF-04-09

2. สุขภาพทั่วไปสมบุรณ์ดี ไม่เป็นไข้หวัด เจ็บคอ ปวดศีรษะ ไม่มีภาวะเจ็บป่วยหรืออยู่ระหว่างรับประทานยาใดๆที่ใช้รักษาโรค โดยเฉพาะยาแก้อักเสบ หรือยาปฏิชีวนะ ต้องหยุดยาแล้วอย่าง
3. ไม่มีโรคประจำตัวที่เป็นอุปสรรคต่องานวิจัย ดังต่อไปนี้
 - โรคอักเสบ เช่น ตับอักเสบ, สะเก็ดเงิน
 - โรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน, มะเร็ง
 - โรคติดเชื้อ เช่น เอดส์, ตับอักเสบ
 - โรคทางภูมิคุ้มกัน เช่น ภูมิแพ้ , Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

Exclusion criteria

1. ประชากรที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
2. มีประวัติการดื่มสุรามากหรือบ่อยครั้ง และมีประวัติการสูบบุหรี่
3. อยู่ในภาวะตั้งครรภ์

4. กระบวนการการวิจัย

4.1 คณะผู้วิจัยจะหาผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยโดยการทำป้ายประกาศ ประชาสัมพันธ์ งานวิจัย

4.2 ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยยินยอมเข้าร่วมวิจัยด้วยความสมัครใจ มีสิทธิถอนตัวเมื่อใดก็ได้โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล ซึ่งจะไม่มีผลกระทบใดๆต่อผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยทั้งสิ้น โดยผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยยินยอมให้เจาะเลือดที่แขน 2 ครั้ง ครั้งแรกจำนวน 25 ซี.ซี (5 ช้อนชา) และครั้งที่ 2 จำนวน 5 ซี.ซี (1 ช้อนชา) ห่างจากครั้งแรกมากกว่า 1 สัปดาห์

4.3 ความเสี่ยงที่อาจเกิดจากการวิจัยนี้ การเจาะเลือดในปริมาณ 25 ซี.ซี (5 ช้อนชา) และ 5 ซี.ซี (1 ช้อนชา) นั้นเป็นจำนวนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณเลือดทั้งหมดในร่างกาย ซึ่งไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ เว้นเพียงแต่อาจเกิดรอยช้ำบริเวณที่เจาะเลือดซึ่งไม่มีความเจ็บปวดและหายได้เองภายใน 7 –10 วัน อุปกรณ์เจาะเลือดใช้ครั้งเดียวทิ้งจึงปลอดภัยต่อโรคที่ติดต่อทางเลือด และมีอาจารย์ที่ปรึกษาและผู้วิจัย สังกัดคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นนักเทคนิคการแพทย์ที่มีใบประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์เลขที่ ทน 2865 และทน 9847 เป็นผู้เจาะเลือด หากเกิดความผิดปกติหรือผลข้างเคียงขณะเจาะเลือด คณะผู้วิจัยจะทำการปฐมพยาบาลและทำการรักษาต่อไปโดยคณะผู้วิจัยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด

AF-04-09

4.4 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตัวอย่างเลือดที่เก็บทั้งหมดจะถูกทำลายโดยไม่นำกลับไปใช้ในงานวิจัยอื่น

5. ผู้วิจัยจะให้ข้อมูลแก่ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยโดยการให้อ่านข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และผู้วิจัยจะอธิบายรายละเอียดรวมถึงกระบวนการวิจัยให้ทราบโดยละเอียด

6. การวิจัยครั้งนี้ไม่มีการจ่ายค่าตอบแทนผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

7. ผลงานวิจัยจะนำเสนอเฉพาะผลการทดลองที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว โดยที่ข้อมูลส่วนตัวและข้อมูลอื่นๆของท่านจะถูกเก็บไว้เป็นความลับเฉพาะคณะผู้วิจัย

8. ผลงานวิจัยจะถูกส่งไปให้ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยได้รับทราบ หากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยต้องการรับทราบผลงานวิจัย

9. ผลงานวิจัยนี้ทำให้เกิดองค์ความรู้เพื่อไปต่อยอดงานวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรไทยสำหรับลดการอักเสบในโรคต่างๆ ซึ่งไม่มีผลข้างเคียงหรือผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามข้อมูลดังกล่าวสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-8147 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th”

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาว์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ภาคผนวก ข

หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ทำที่คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

เลขที่ ประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย.....

ข้าพเจ้า ซึ่งได้ลงนามทำหนังสือนี้ ขอแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าหมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

ชื่อผู้วิจัย นางสาวฐิติพร เหล่าสิม

ที่อยู่ติดต่อ 154 อาคารจุฬาพัฒน์1 ถนนพระราม1 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม.10330

โทรศัพท์ 02-2181081

ข้าพเจ้า **ได้รับทราบ**รายละเอียดเกี่ยวกับที่มาและวัตถุประสงค์ในการทำวิจัย รายละเอียดขั้นตอนต่างๆ ที่จะต้องปฏิบัติหรือได้รับการปฏิบัติ ความเสี่ยง/อันตราย และประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยเรื่องนี้ โดยได้อ่านรายละเอียดในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัยโดยตลอด และ**ได้รับคำอธิบาย**จากผู้วิจัย **จนเข้าใจเป็นอย่างดีแล้ว**

ข้าพเจ้าจึง**สมัครใจ**เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ตามที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย โดยข้าพเจ้ายินยอมให้ผู้วิจัยทำการเจาะเลือดจำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งแรกเจาะเป็นจำนวน 25 ซีซี(5 ซ้อนชา) และครั้งที่สองเจาะเป็นจำนวน 5 ซีซี (1 ซ้อนชา)โดยเจาะห่างกันเป็นเวลามากกว่าหนึ่งสัปดาห์ เพื่อนำเลือดมาทดสอบกับสารสกัดหญ้าหมอน้อยเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ และนำมาทดสอบกลไกต้านการอักเสบของสารสกัดหญ้าหมอน้อย

ข้าพเจ้ามีสิทธิ**ถอนตัว**ออกจากการวิจัยเมื่อใดก็ได้ตามความประสงค์ **โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล** ซึ่งการถอนตัวออกจากการวิจัยนั้น จะไม่มีผลกระทบในทางใดๆ ต่อข้าพเจ้าทั้งสิ้น

ข้าพเจ้าได้รับคำรับรองว่า ผู้วิจัยจะปฏิบัติต่อข้าพเจ้าตามข้อมูลที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และข้อมูลใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับข้าพเจ้า ผู้วิจัยจะ**เก็บรักษาเป็นความลับ** โดยจะนำเสนอข้อมูลการวิจัยเป็นภาพรวมเท่านั้น ไม่มีข้อมูลใดในการรายงานที่จะนำไปสู่การระบุตัวข้าพเจ้า และจะทำลายเลือดทิ้งหลังสิ้นสุดการวิจัย

หากข้าพเจ้า**ไม่ได้รับการปฏิบัติตรงตามที่ได้ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย** ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนได้ที่คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสาขา

บ้าน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท
 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-8147 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail:
 eccu@chula.ac.th

ข้าพเจ้าได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญต่อหน้าพยาน ทั้งนี้ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารชี้แจง
 ผู้เข้าร่วมการวิจัย และสำเนาหนังสือแสดงความยินยอมไว้แล้ว

ลงชื่อ.....

(นางสาวฐิติพร เหล่าสีม)

ผู้วิจัยหลัก

ลงชื่อ.....

(.....)

ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(.....)

พยาน

ภาคผนวก ค

แบบสอบถามงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้า
หมอน้อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

Subject No.....

ชื่อ (นาย/นาง/นางสาว).....นามสกุล.....

เพศ.....

อายุ.....ปี วัน/เดือน/ปีเกิด..... เบอร์

โทรศัพท์.....

ให้ทำเครื่องหมาย ในช่องว่าง ที่กำหนดให้

1. ท่านมีอาการไม่สบาย เป็นไข้หวัด เจ็บคอ ปวดศีรษะ

ใช่ ไม่ใช่

2. ท่านรับประทานยาแก้อักเสบ หรือยาปฏิชีวนะ ภายใน 7 วันที่ผ่านมา

ใช่ ไม่ใช่

3. ท่านมีประวัติการเป็นโรคดังต่อไปนี้หรือไม่

3.1 โรคอักเสบ เช่น ตับอักเสบ, สะเก็ดเงิน

มี ไม่มี

3.2 โรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน, มะเร็ง

มี ไม่มี

3.3 โรคติดเชื้อ เช่น เอดส์, ตับอักเสบ

มี ไม่มี

3.4 โรคทางภูมิคุ้มกัน เช่น ภูมิแพ้, Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

มี ไม่มี

4. ท่านอยู่ในภาวะตั้งครรภ์

ใช่ ไม่ใช่

5. ท่านมีประวัติการดื่มสุรา

ใช่ ไม่ใช่

6. ท่านมีประวัติการสูบบุหรี่

ใช่ ไม่ใช่แบบสอบถามนี้อ้างอิงจากแบบสอบถามคุณสมบัติของผู้บริจาคเลือดสภากาชาดไทย โดยคัดเลือก
มาเป็นบางข้อเพื่อให้ตรงกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ภาคผนวก ง

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. MTT assay

1. MTT stock solution reagents 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MTT dye 5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 1 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm เพื่อแยกตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออกไป และเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. สารละลายสำหรับละลายตะกอน formazan

100 % DMSO

2. ELISA assay

1. 1xDPBS, pH 7.2

เตรียมจาก 10xDPBS 100 มิลลิลิตร ในน้ำ Milli Q 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Wash buffer (0.05 % Tween-20)

เติม Tween-20 500 ไมโครลิตร ใน 1xDPBS, pH 7.2 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Block buffer (1% BSA)

ชั่ง BSA 0.5 กรัม ละลายใน 1xDPBS, pH 7.2 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. Diluent (0.05% Tween-20, 0.1%BSA)

เตรียมจาก 1%BSA 5 มิลลิลิตร ใน 1xDPBS, pH 7.2 50 มิลลิลิตร เติม Tween-20 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Immunocytochemistry assay

1. 1xPBS

เตรียมจาก 10xPBS 100 มิลลิลิตร ในน้ำ Milli Q 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Permeabilize solution

ชั่ง BSA 2.5 กรัม ละลายใน 1xPBS 50 มิลลิลิตร เติม triton x-100 250 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก จ

คำอธิบายสำหรับคำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิจัย

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	คำอธิบาย
%	เปอร์เซ็นต์
/	Per
μ	Micro
μl	Microlitre
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ASA	Acetylsalicylic acid
BSA	Bovine serum albumin
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTLs	Cytotoxic T-cells
DAPI	4',6-diamidino-2'-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's phosphate buffer saline
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
GGT	Gamma-glutamyltransferase

คำย่อ	คำอธิบาย
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney cell line
hLITAF	lipopolysaccharide induced TNF- α factor
HRP	Horseradish peroxidase
HuH7	Hepato cellular carcinoma cell line
IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50%
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
JAK	Janus kinase
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligram
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Millilitre
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogram

คำย่อ	คำอธิบาย
NK	Natural killer cell
NO	Nitric oxide
°C	องศาเซลเซียส
<i>P</i>	P-value
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffer saline
PMT	Photomultiplier tube
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Standard error of mean
SLE	Systemic lupus erythematosus
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T reg	Regulatory T-cell
TGF- β	Transforming growth factor - beta
Th	T helper cells
TNF	Tumor necrosis factor
Tween-20	Polyxyethylene-20 sorbitan monolaurate
U	Unit
v/v	Volume by volume
VEGF	Vascular endothelial growth factor

คำย่อ

α

β

γ

คำอธิบาย

Alpha

Beta

Gamma

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิติพร เหล่าสิม สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552