

ผลของสารสกัดจากหญ้าแห้งมาต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เม็ด  
เลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล

นางสาวสุภร สุขจำนงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECT OF FIMBRISTYLIS OVATA (BURM.F) KERN EXTRACTS ON INFLAMMATION-  
ASSOCIATED CELL SIGNALING IN MONOCYTIC CELL LINE AND BRAIN ENDOTHELIAL  
CELL LINE

Miss Suporn Sukjamnong

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดจากหญ้าแห้งมาต่อการส่งสัญญาณ  
ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือด  
ขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมอง  
เพาะเลี้ยงชนิดเอนโดธีเลียล

โดย

นางสาวสุภร สุขจำนงค์


สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

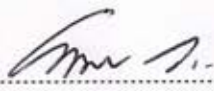
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

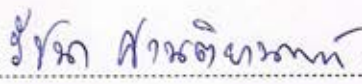
รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


 ..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

 ..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. อัญชลี เจียบฉลาด)

 ..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. ณัฐฐิภา แสงกฤษ)

สุภร สุขจำนงค์ : ผลของสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำม้าต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดธีเลียล. (EFFECT OF FIMBRISTYLIS OVATA(BURM.F) KERN EXTRACTS ON INFLAMMATION-ASSOCIATED CELL SIGNALING IN MONOCYTIC CELL LINE AND BRAIN ENDOTHELIAL CELL LINE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร.รัชนา ศานติยานนท์, 99 หน้า.

การอักเสบเรื้อรังเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรค chronic degenerative diseases ต่างๆ ปัจจุบันมีการพัฒนาการรักษาโรคที่มีสาเหตุจากการอักเสบเรื้อรัง การรักษาทางเลือกหนึ่งคือการใช้พืชสมุนไพรไทยในการรักษา หญ้าแฉ่ำม้า หรือ flatspike sedge มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Fimbristylis ovata (Burm.f.) Kern* พบว่าสามารถใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ อย่างไรก็ดีตามยังไม่มีข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านการอักเสบ การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสกัดหญ้าแฉ่ำม้าด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อวัดการหลั่งและการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ ยีน RAGE รวมทั้งทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดธีเลียล เพื่อวัดการหลั่งและการแสดงออกของยีน cell adhesion molecule ด้วยวิธี ELISA และ RT-PCR จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อทดสอบสารสกัดหญ้าแฉ่ำม้า ความเข้มข้นถึง 100 µg/ml กับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดธีเลียล ผลของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่ามากกว่า 80% และพบว่าสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำม้าสามารถลดการหลั่งและการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 และยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ได้อีกด้วย อีกทั้งเมื่อทดสอบกับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดธีเลียล พบว่าสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำม้าสามารถลดการหลั่งและการแสดงออกของยีน VCAM-1 ได้ด้วย ดังนั้นหญ้าแฉ่ำม้าอาจจะเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังได้

ภาควิชา..... เคมีคลินิก..... ลายมือชื่อนิสิต..... สุภร สุขจำนงค์.....  
สาขาวิชา..... ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์.....  
ปีการศึกษา..... 2554.....



## 5277216637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : FIMBRISTYLIS OVATA (BURM.F.) KERN / INFLAMMATION / INFLAMMATORY CYTOKINES

SUPORN SUKJAMNONG: EFFECT OF FIMBRISTYLIS OVATA(BURM.F) KERN EXTRACTS ON INFLAMMATION-ASSOCIATED CELL SIGNALING IN MONOCYTIC CELL LINE AND BRAIN ENDOTHELIAL CELL LINE. ADVISOR : ASSOC.PROF.RACHANA SANTIYANONT, Ph.D., 99 pp.

Chronic inflammation is a prolonged inflammation process that is a major cause of many chronic degenerative disease. *Fimbristylis ovata (Burm.f.) Kern* or "Ya-sae-ma" has been long used as a traditional medicine for chronic inflammatory diseases. However, there is no scientific data on its anti-inflammatory property. The aim of this study was to investigate the effects of *Fimbristylis ovata* extracts on the secretion of pro-inflammatory cytokines, cell adhesion molecule and the activation of RAGE in LPS-stimulated cells. We evaluated the effect of *Fimbristylis ovata* extracts on cell viability by using MTT assay. Pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules were investigated by RT-PCR and ELISA methods. Upon incubation with *Fimbristylis ovata* extract up to 100 µg/ml cell viability was more than 80%. *Fimbristylis ovata* extracts could inhibit Interleukin-6 level and mRNA expression as well RAGE gene in monocytic cell line. Moreover, the result showed that vascular cell adhesion molecule 1(VCAM-1) secretion and VCAM-1 mRNA expression were decreased when brain endothelial cell were treated with *Fimbristylis ovata* extract. Therefore, the anti-inflammatory activity of *Fimbristylis ovata* extract may be due to their inhibitory actions via RAGE signaling pathway.

Department : .....Clinical Chemistry..... Student's Signature Suporn Sukjammong

Field of Study : ...Clinical Biochemistry  
and Molecular Medicine Advisor's Signature R. Santiyamont

Academic Year : 2011.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมไปถึงการให้ความรู้ คำปรึกษา คำชี้แนะ แนวทางในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในทุกๆด้าน จนกระทั่งงานวิจัยนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ที่กรุณารับเป็น ประธาน กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.อัญชลี เตียบฉลาด ที่กรุณารับเป็น กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.ณัฐสิริกา แสงกฤษฎ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เงินทุนวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช” และ กองทุนคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาฯ ปีงบประมาณ 2553 และทุนพัฒนา วิชาการ จุฬาฯ 100 ปี และทุนโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย จากบัณฑิต วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนผู้ช่วยสอน จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ บุคลากรห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทาง ห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนใน การศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ในคณะสหเวชศาสตร์ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเมื่อ เกิดปัญหาและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด จนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความรัก กำลังใจ และทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
กระบวนการอักเสบผ่านการกระตุ้นตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR4).....	5
ไซโตไคน์.....	7
โรคที่มีพยาธิสภาพเกิดจากการอักเสบ.....	17
หญ้าแฉ่ำ.....	26
สารประกอบฟีนอล.....	27
สารประกอบโพลีฟีนอล.....	27
สารฟลาโวนอยด์.....	28
การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบโพลีฟีนอล.....	30
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ.....	32

บทที่	หน้า
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	33
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	35
วิธีการวิจัย.....	38
การเตรียมสารสกัดหญ้าแฉ่ำ.....	38
การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล.....	39
การเตรียมสารสกัดหญ้าแฉ่ำ.....	40
การทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์..	40
การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการหลั่งไซโตไคน์....	41
การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการแสดงออกของยีน	43
การกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการหลั่ง cell adhesion molecule.....	48
การกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการแสดงออกของยีน.....	49
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	54
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	55
ผลการวิเคราะห์.....	55
ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์.....	55
ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล.....	56
ผลการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการหลั่งไซโตไคน์..	58
ผลการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์.....	63
ผลการกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการหลั่ง cell adhesion molecule.....	69
ผลการกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการแสดงออกของยีน cell adhesion molecule.....	72
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	75



บทที่	ณ	หน้า
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....		75
ข้อเสนอแนะ.....		80
รายการอ้างอิง.....		81
ภาคผนวก.....		92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....		99

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน Reverse transcription.....	44
2	ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน PCR amplification.....	45
3	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน $\beta$ -actin.....	46
4	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน TNF- $\alpha$ .....	46
5	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน IL-6.....	47
6	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน IL-1 $\beta$ .....	47
7	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน RAGE.....	48
8	ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน Reverse transcription.....	51
9	ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน PCR amplification.....	51
10	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน ICAM-1.....	52
11	ขั้นตอน PCR amplification ของยีน VCAM-1.....	52
12	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ U937...	55
13	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ bEnd.3	57
14	ผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 เมื่อเซลล์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ.....	58
15	ผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ เมื่อเซลล์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ.....	60
16	ผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ เมื่อเซลล์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ.....	62
17	การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6(IL-6) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ.....	63
18	ผลการวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ.....	65
19	ผลการวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ.....	67

ตารางที่		หน้า
20	การแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	68
21	การหลั่ง VCAM-1 เมื่อทดสอบเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลด้วยสารสกัดหญ้าแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	70
22	การแสดงออกของ VCAM-1 ในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	72

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการ TLR4 signaling ชนิดที่ต้องอาศัย MyD88.....	6
2	กระบวนการ TLR4 signaling ชนิดที่ไม่ต้องอาศัย MyD88.....	7
3	การทำงานของไซโตไคน์ Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ).....	9
4	การทำงานของไซโตไคน์ Interleukin-6.....	10
5	ส่วนประกอบของ Receptor for Advanced Glycation Endproducts.....	12
6	ประเภทของ Receptor for Advanced Glycation Endproducts.....	13
7	การส่งสัญญาณของ RAGE.....	14
8	RAGE ligand เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง.....	15
9	กระบวนการ canonical NF- $\kappa$ B pathway และ non-canonical NF- $\kappa$ B pathway.....	16
10	ROS และ พยาธิสภาพของสภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวาน.....	19
11	กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง.....	21
12	กลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรค rheumatoid arthritis.....	24
13	ลักษณะของต้นหญ้าแฉี่ม้า.....	27
14	ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบฟีนอล.....	27
15	ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบโพลีฟีนอล.....	28
16	ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์.....	28
17	โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ประเภทต่างๆ.....	29
18	แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ของมนุษย์.....	32
19	แสดงลักษณะของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลของหนู.....	32
20	ลักษณะหญ้าแฉี่ม้าแห้งเมื่อนำไปอบและหลังจากบดเป็นผง.....	38
21	ลักษณะหญ้าแฉี่ม้าที่สกัดด้วยน้ำ.....	38
22	ลักษณะหญ้าแฉี่ม้าที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล.....	39
23	แสดงตารางช่องของ hemocytometer ที่ใช้นับจำนวนเซลล์.....	40
24	หลักการของ MTT assay คือการรีดิวซ์ MTT ไปเป็น formazan.....	41
25	การ run gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel.....	53

ภาพที่	หน้า
26	โปรแกรมถ่ายภาพ agarose gel หลังจากทำ gel electrophoresis..... 53
27	โปรแกรม Gene tool ที่ใช้วัดความเข้มของแถบ DNA..... 54
28	ผลของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อการมีชีวิตของเซลล์ U937..... 56
29	ผลของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อการมีชีวิตของเซลล์ bEnd.3..... 57
30	การหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 59
31	การหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 61
32	การหลั่งไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 63
33	กราฟการแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 64
34	การแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 64
35	กราฟการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$ ใน เซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์..... 66
36	การแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 66
37	กราฟการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 67
38	การแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 68
39	กราฟการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 69
40	การแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 69
41	การหลั่ง VCAM-1 เมื่อทดสอบเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ..... 71

ภาพที่	หน้า
42	กราฟการแสดงออกของยีน VCAM-1 ในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ..... 73
43	การแสดงออกของยีน VCAM-1 ในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ..... 73
44	กระบวนการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-6..... 77
45	กระบวนการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ ..... 78
46	กระบวนการกระตุ้นการผลิต VCAM-1..... 79
47	กลไกที่เป็นไปได้ของการออกฤทธิ์ของหญ้าแฉ่ำมาในการยับยั้งการอักเสบและการยับยั้งการทำหน้าที่ที่ผิดปกติไปของเซลล์เอนโดทีเลียล..... 80
48	กราฟมาตรฐานของ Interleukin-6 โดยวิธี ELISA..... 96
49	กราฟมาตรฐานของ Interleukin-1 $\beta$ โดยวิธี ELISA..... 96
50	กราฟมาตรฐานของ Tumor Necrosis Factor alpha โดยวิธี ELISA..... 97
51	กราฟมาตรฐานของ VCAM-1 โดยวิธี ELISA..... 97
52	กราฟมาตรฐานของ ICAM-1 โดยวิธี ELISA..... 98



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การอักเสบเรื้อรังเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิด chronic degenerative diseases ต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ, โรค rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, โรคมะเร็ง และโรคเบาหวานประเภทที่ 2 เป็นต้น

การอักเสบและการทำหน้าที่ที่ผิดปกติไปของเซลล์เอนโดทีเลียล เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพในโรค systemic lupus erythematosus (1, 2) อีกทั้งเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจซึ่งเกิดจาก endothelial injury ส่งผลให้เกิดการทำหน้าที่ที่ผิดปกติไปของเซลล์เอนโดทีเลียล ซึ่งไปส่งเสริมการอักเสบ โดยเกิดการชักนำเม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะชนิด monocyte และ T-cell และมีการ up-regulation ของ cell adhesion molecule ต่างๆ (1, 3, 4)

การแสดงออกของไซโตไคน์ที่สำคัญคือ Interleukin-6 จะเหนี่ยวนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะ B-cell ซึ่งทำให้เกิดการผลิต autoantibody ปัจจุบันพบว่า ระดับของ IL-6 และ CRP ในกระแสเลือด สามารถใช้ประเมินสภาวะ systemic inflammation ในผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis ได้ (5, 6) รวมทั้งการหลั่ง ไซโตไคน์ เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) , Interleukin-6 (IL-6) ที่เพิ่มขึ้น ยังเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในโรคเบาหวานอีกด้วย ส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease) โรคจอตาเสื่อมจากเบาหวาน (Diabetic retinopathy) โรคไตเสื่อมจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy) เป็นต้น นอกจากนี้ Advanced Glycation End Products (AGEs) เป็นต้นเหตุสำคัญในการก่อพยาธิสภาพทั้งในหลอดเลือดขนาดเล็กและขนาดใหญ่ของโรคเบาหวาน ซึ่งพบว่าการเกิด AGEs ของพลาสมาโปรตีนต่างๆสามารถจับกับตัวรับของ AGEs (RAGE) บนเยื่อหุ้มของเซลล์ endothelial, mesangial, macrophage แล้วกระตุ้น reactive oxygen species (ROS) และ transcription factor เช่น nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ทำให้กระตุ้นการหลั่ง growth factors และไซโตไคน์ที่เป็นปัจจัยหลักในการเกิดการอักเสบเรื้อรังได้ (7-9) และพบว่าการ activation ของตัวรับของ AGEs (RAGE) เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการดำเนินไปของโรคแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจได้ (10, 11) การ activation ของ RAGE จะส่ง cell surface signal กระตุ้นให้เกิดการทำงานของ intracellular pathways ได้แก่ PI3-kinase/AKT, MAPKs และ NF- $\kappa$ B ส่งผลให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆ (12)

ปัจจุบันได้มีการคิดค้นและพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งโดยใช้ specific anti-IL-6 พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดและลด metastasis ในผู้ป่วยโรคมะเร็งบางชนิดได้ (13, 14) รวมทั้งมีการศึกษาในโรค rheumatoid arthritis โดยการขัดขวาง IL-6R โดยใช้ neutralizing monoclonal antibody และ humanized anti-IL-6 receptor antibody (anti-IL-6RAb) พบว่าสามารถใช้ร่วมในการรักษาโรค rheumatoid arthritis, Castleman's disease และ juvenile idiopathic arthritis ได้ (15, 16) ปัจจุบันมีรายงานวิจัยว่าการขัดขวาง TNF- $\alpha$  receptor และใช้ chimeric monoclonal antibody TNF- $\alpha$  สามารถใช้รักษาผู้ป่วยที่มีอาการ diabetic nephropathy ได้ด้วย (17) การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น tocotrienol ซึ่งเป็นกลุ่ม vitamin E มีคุณสมบัติลด TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 และป้องกัน reactive oxygen species ในการกระตุ้น NF-KB p65 subunit expression (18) และในการศึกษาการขัดขวาง TNF- $\alpha$  ในโรค systemic lupus erythematosus พบว่า TNF- $\alpha$  inhibitor สามารถใช้ในการรักษาโรค rheumatoid arthritis ได้อีกด้วย (19, 20) ในโรค acute และ chronic auto-inflammatory diseases การขัดขวางคุณสมบัติของ IL-1 $\beta$  สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ ตัวอย่าง เช่น IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) ได้มีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis และเบาหวานประเภทที่ 2 (21) soluble extracellular domain ของ RAGE สามารถช่วยเป็น potential therapeutic blocker สำหรับรักษาภาวะแทรกซ้อน macrovascular ในโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจ (22) ยารักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้แก่ GLP-1 สามารถลดการแสดงออก mRNA ของ VCAM-1 โดยขัดขวางการแสดงออกของยีน RAGE (23) สมุนไพรจีนบางชนิด มีคุณสมบัติรักษาภาวะอักเสบและโรคหลอดเลือดหัวใจโดยลดการแสดงออกของยีน VCAM-1 (24) สมุนไพรไทย เช่น กระชายเหลืองมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญนี้เกิดจากสารสำคัญคือ flavonoid (25, 26) *Lagerstroemia speciosa* (L) และ *Piper sarmentosum* Roxb มีคุณสมบัติต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ (27, 28) มะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn) ช่วยพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก และยังช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ NK cell อีกด้วย (29)

หญ้าแส้ม้าหรือหญ้ากุหลาบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Fimbristylis ovata* (Burm.f.) Kern พบว่ามีการนำไปใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบตามภูมิปัญญาชาวบ้าน เช่น การอักเสบของ lymph node (adenitis), การติดเชื้อ scrofula, ใช้รักษาโรค syphilis ใช้รักษาอาการไอ และโรคหลอดลมอักเสบ (bronchitis) รวมทั้งใช้รักษาโรคหอบหืดได้ (30, 31) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่

จะศึกษาคุณสมบัติของหญ้าแห้งมาต่อการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบใน เซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าแห้งมา ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการมีชีวิตรอดของ เซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล
2. ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของหญ้าแห้งมา ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการหลั่งไซโตไคน์ ในเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง
3. ศึกษาฤทธิ์ของหญ้าแห้งมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการยับยั้งการทำหน้าที่ที่ ผิดปกติไปของเซลล์เอนโดทีเลียล

### ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาคุณสมบัติของหญ้าแห้งมาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เมทานอล และน้ำ ต่อการหลั่งไซโตไคน์ ได้แก่ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-6 และการแสดงออกของยีน RAGE เมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ให้เกิดการอักเสบ และการแสดงออกของ cell adhesion molecule ได้แก่ ICAM-1 และ VCAM-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์สมอง เพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลให้เกิดการอักเสบ

### ข้อจำกัดของการวิจัย

1. การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง และเซลล์สมองเพาะเลี้ยง ชนิดเอนโดทีเลียล
2. ปริมาณของสารสกัดที่ได้ อาจแตกต่างกันไปตามวิธีการสกัด
3. ผลของสารสกัดที่ได้จากการทดสอบนั้น เป็นผลที่ได้จากหญ้าแห้งมาที่ทำการเก็บ ณ สถานที่ เดียว และในช่วงเวลาเดียว

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงบทบาทของหญ้าแห้งมาในการต่อต้านการอักเสบ
2. องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัยในอนาคต
3. สามารถนำความรู้ไปพัฒนาและส่งเสริมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นการรักษาทางเลือก สำหรับโรคต่างๆ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### การอักเสบ (Inflammation)

การอักเสบ (Inflammation) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อ หรือการฉีกขาดของเนื้อเยื่อต่างๆ เป็นกระบวนการชักนำเม็ดเลือดขาวและเซลล์ที่สำคัญต่างๆ ให้มายังบริเวณที่เกิดการติดเชื้อหรือฉีกขาดนั้น การตอบสนองนี้เป็นลักษณะเฉพาะซึ่งมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหลาย โดยเฉพาะแบคทีเรีย ตัวอย่างการชักนำผ่านระบบ innate immune system ได้แก่ Toll-like receptors (TLRs) และ NOD (nucleotide-binding oligomerization-domain protein)-like receptors (NLRs) เป็นต้น เมื่อเกิดการติดเชื้อขึ้นในร่างกาย กระบวนการรับรู้เบื้องต้นจะเริ่มขึ้นจากเซลล์ macrophage และ mast cell ที่อยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อนั้นจะเริ่มสร้าง inflammatory mediator ต่างๆ รวมถึง chemokine, cytokine, vasoactive amine และ eicosanoid ส่งผลให้เกิดการหลั่ง plasma protein และทำให้เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะชนิด neutrophil ให้เข้ามาถึง extravascular tissue เป็นบริเวณที่เกิดการติดเชื้อหรือฉีกขาดนั้น ซึ่งเซลล์เอนโดทีเลียลของหลอดเลือดซึ่งถูกกระตุ้นจะเลือกให้เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ผ่านออกจากผนังหลอดเลือดได้ ในขณะที่จะป้องกันการผ่านออกของเม็ดเลือดแดงโดยการเลือกนี้เกิดจากการจับกับได้ของ selectin บนเซลล์เอนโดทีเลียล กับ integrin และ chemokine receptor บนเม็ดเลือดขาว ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณ endothelial surface หลังจากนั้น เมื่อเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น เคลื่อนที่มาถึงบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อนั้น จะทำหน้าที่จับกับ pathogen โดยตรง ซึ่งเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ทำหน้าที่กำจัดจุลินทรีย์ โดยจะหลั่ง toxic content ใน granule ได้แก่ reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species, proteinase 3, cathepsin G และ elastase (32)

กระบวนการ acute inflammatory response จะส่งผลให้เกิดการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ และหลังจากนั้นจะเกิดการ resolution และ repair phase โดยพบว่า lipoxin ทำงานต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการ recruitment ของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในขณะที่ส่งเสริมการ recruitment ของเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ซึ่งจะทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายเซลล์ที่ตายแล้ว และยังมี resolvin, protectin, transforming growth factor- $\beta$  และ growth factor ที่สร้างจากเซลล์ macrophage ซึ่งมีส่วนช่วยในการหยุดการอักเสบ รวมถึงการเริ่มต้นของกระบวนการ tissue repair ด้วย

กระบวนการ chronic inflammatory response จะเกิดขึ้นเมื่อกระบวนการ acute inflammatory response ไม่สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้สำเร็จ จะเริ่มจากการแทนที่เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ด้วยเซลล์ macrophage และ T-cell เพื่อมาช่วยในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์นั้น แต่ถ้าหากการทำงานของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ยังไม่สามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้สำเร็จ จะมีกระบวนการ chronic inflammation จะเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งประกอบด้วยการก่อตัวของ granuloma และ tertiary lymphoid tissue นอกจากนี้ chronic inflammation จะเกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลานานแล้ว ยังสามารถเกิดได้ในกรณีต่างๆ เช่น จากการสัมผัสกับ irritant, การเกิด SNPs ใน gene สำคัญๆ, การเกิด reactive oxygen species หรือ reactive nitrogen species เป็นต้น

#### กระบวนการอักเสบผ่านการกระตุ้นตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR4)

เมื่อ lipopolysaccharide (LPS) กระตุ้นตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR4) เป็นการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ โดยจะส่งผลให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆ ที่สำคัญในการอักเสบ ซึ่ง LPS/TLR4 signaling นั้น แยกออกเป็น 2 pathway ได้แก่ MyD88-dependent pathway และ MyD88-independent pathway

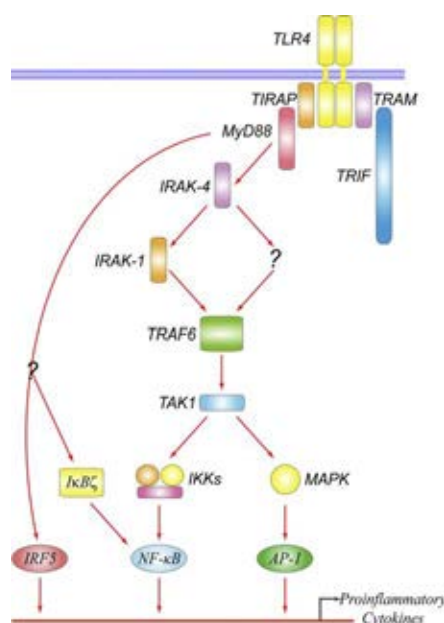
##### 1. กระบวนการที่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88-dependent pathway)

เมื่อเกิดการกระตุ้นตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR4) จะส่งผลให้ MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) กระตุ้น IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4), IRAK-1 และ TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) นำไปสู่การกระตุ้น TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1) และกระตุ้นต่อลงมาที่ MAPK (Mitogen activated protein kinase) และ IKK (IKB kinase) เพื่อส่งสัญญาณให้เกิดการ translocation ของ transcription factor NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF-5 และส่งผลให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆที่สำคัญในการอักเสบ (ภาพที่ 1)

ในกระบวนการ NF- $\kappa$ B, MAPK นั้น พบว่า I-KappaB zeta (IKB $\zeta$ ) และ interferon regulatory factor 5 (IRF5) เป็นปัจจัยหลักที่สำคัญ ของกระบวนการ MyD88 โดย IKB $\zeta$  เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่ง IKB $\zeta$  ทำหน้าที่ร่วมกับ NF- $\kappa$ B p50 subunit ใน promoter region of IL-6 ในการผลิตไซโตไคน์ IL-6 (33)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการกระตุ้นจาก lipopolysaccharide (LPS) สามารถส่งผลต่อการส่งสัญญาณผ่านทาง Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling ได้ด้วย โดยจากงานวิจัยเพื่อศึกษาการส่งสัญญาณของอักเสบที่

ถูกกระตุ้นจาก lipopolysaccharide (LPS) ต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 โดยใช้ suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) ซึ่งเป็น negative feedback regulator สามารถยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ Interleukin-6 เท่านั้น ไม่สามารถยับยั้งไซโตไคน์ชนิดอื่นๆ เช่น TNF- $\alpha$ , granulocyte colony-stimulating factor เป็นต้น โดยจากการศึกษาพบว่าการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-6 เมื่อมีการกระตุ้นจาก LPS จะมีการส่งสัญญาณผ่านทาง Janus kinase (JAK)–signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling เมื่อเกิดการกระตุ้นโดย LPS จะเกิดการตอบสนองผ่านทาง Jak2 และเกิดการตอบสนองโดย stat5 ซึ่งจะทำการ recruit ของ stat5 กับ NF- $\kappa$ B p50 เพื่อไปจับกับบริเวณ promoter ของยีน Interleukin-6 และเกิดการแสดงออกของยีน Interleukin-6 ขึ้น (34)



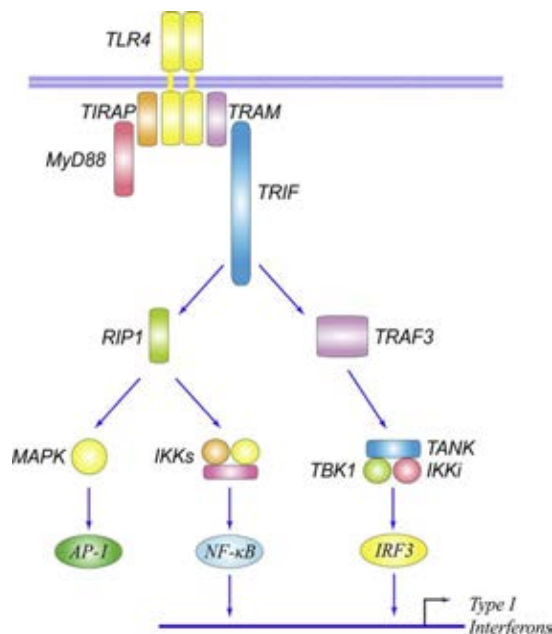
ภาพที่1 กระบวนการ TLR4 signaling ชนิดที่ต้องอาศัย MyD88 (33)

## 2. กระบวนการที่ไม่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88-independent pathway)

MyD88 independent pathway เริ่มจากการกระตุ้น TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) ซึ่งเป็น TIR-containing adaptor protein ที่สำคัญมากในการส่งสัญญาณของ pathway นี้ โดย TRIF จะกระตุ้น TRAF3 (TNF receptor-associated factor3) และส่งผลไปยัง TANK, TBK1, IKKi และกระตุ้น IRF3 ทำให้เกิดการส่งเสริมการกระตุ้นการ transcription ของ target genes คือ type 1 Interferon ได้ และพบว่า TRIF ยังสามารถส่ง



สัญญาณให้ RIP1 (receptor-interacting protein1) นำไปสู่การกระตุ้น NF- $\kappa$ B และช่วยส่งเสริมการกระตุ้นการ transcription ของ target gene ได้เช่นกัน (ภาพที่ 2) (33)



ภาพที่2 กระบวนการ TLR4 signaling ชนิดที่ไม่ต้องอาศัย MyD88 (33)

## ไซโตไคน์

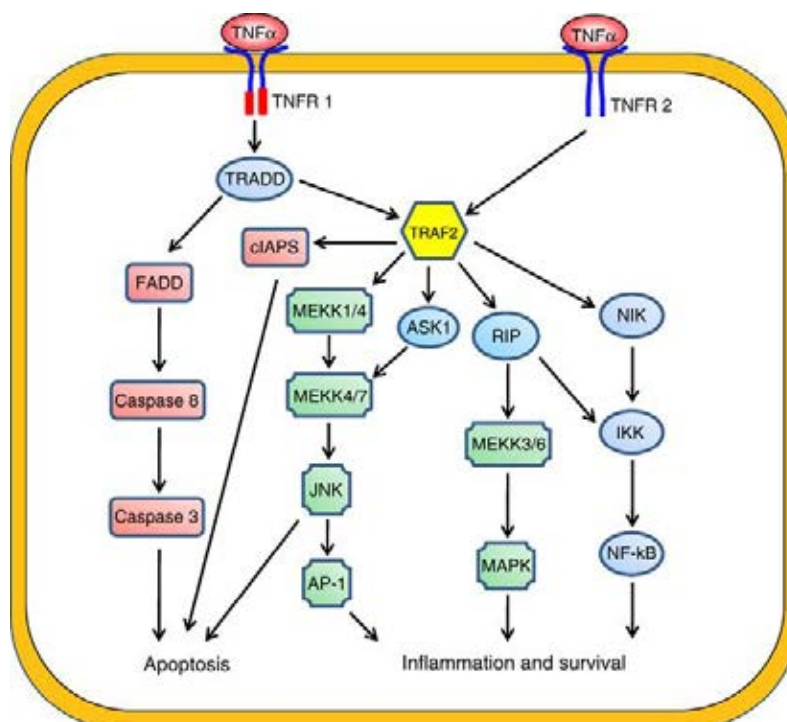
ไซโตไคน์เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ที่ถูกสร้างโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทั้งภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) โดยไซโตไคน์ถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เช่น เชื้อจุลชีพ แอนติเจนแปลกปลอม ซึ่งการกระตุ้นไซโตไคน์หลายๆ ชนิดจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ในช่วงเริ่มต้นของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนั้น ไซโตไคน์จะทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและการ differentiation ของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ส่วนในช่วง effector phase ของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ไซโตไคน์จะกระตุ้นเซลล์ต่างๆ ที่ทำหน้าที่กำจัดเชื้อจุลชีพและแอนติเจน ไซโตไคน์นั้นยังทำหน้าที่ในการกระตุ้นการพัฒนาการของเซลล์ในระบบ hematopoiesis อีกด้วย ไซโตไคน์ประเภทกระตุ้นการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ทำหน้าที่สำคัญ ในกลไกการกระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecule ที่นำไปสู่การชุมนุมของเซลล์หรือสารต่างๆ ให้มาบริเวณที่ต้องการ เพื่อให้มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้น

## Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ )

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) เป็นไซโตไคน์ที่ถูกสร้างโดยเซลล์ macrophage, antigen-stimulated T cell, NK cell และ mast cell โดยยีนของ tumor necrosis factor alpha อยู่บริเวณ chromosome 6p21.3 และมีขนาดประมาณ 3 kilobase ประกอบด้วย 4 exon โดยโปรตีน มากกว่า 80% ที่ถูกสร้างออกมาถูก code อยู่บน exon สุดท้าย

Tumor Necrosis Factor alpha ถูกสร้างออกมาเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 25 kD ประเภท nonglycosylated trans-membrane แล้วเมื่อถูกตัดโดย membrane-associated metalloproteinase จะได้โพลีเปปไทด์ขนาด 17 kD หลังจากนั้นโพลีเปปไทด์ชนิดนี้ 3 สาย จะ polymerize กลายเป็น tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ) ซึ่งมีขนาด 51 kD และออกสู่ระบบไหลเวียนโลหิตหน้าที่สำคัญของ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) คือทำการดึงดูดเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ monocyte มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ และทำหน้าที่กระตุ้น neutrophil และ monocyte เหล่านั้น รวมทั้งกระตุ้น macrophage และ vascular endothelial cell ให้หลั่ง chemokine เพื่อดึงดูดเม็ดเลือดขาวให้มาบริเวณนั้นเพิ่มขึ้นอีกด้วย tumor necrosis factor alpha สามารถจับได้กับ receptor ได้แก่ TNF-R1 (TNF receptor type 1; CD120a; p55/60) และ TNF-R2 (TNF receptor type 2; CD120b; p75/80) พบว่า TNF-R1 สามารถแสดงออกบนเซลล์ส่วนใหญ่ และถูกกระตุ้นโดย tumor necrosis factor alpha ได้ทั้ง membrane-bound และ soluble trimeric form ขณะที่ TNF-R2 พบได้เฉพาะเซลล์ในระบบ immune และตอบสนองต่อ membrane-bound form ของ TNF homotrimer เท่านั้น (ภาพที่ 3)

จากการศึกษา signalling pathway ที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide ต่อการผลิตไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ใน human adipocyte พบว่าเมื่อเกิดการกระตุ้นโดย lipopolysaccharide จะส่งสัญญาณผ่านทาง NF- $\kappa$ B และ p38 MAP Kinase และเกิดการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  (35-37)



ภาพที่ 3 การทำงานของไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (38)

### Interleukin-1 (IL-1)

Interleukin-1 เป็นไซโตไคน์ที่ถูกสร้างโดยเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้น ยีนของ Interleukin-1 อยู่ในกลุ่ม interleukin 1 cytokine family ซึ่งบน chromosome 2 บริเวณ 2q14 เมื่อถูกถอดรหัสออกมาเป็น Interleukin-1 $\alpha$  และ Interleukin-1 $\beta$  เมื่อไซโตไคน์นี้ถูกสร้างขึ้น จะเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 33 kD แล้วจึงถูกตัดเพื่อเกิดเป็น mature protein ที่มีขนาด 17 kD พบว่า Interleukin-1 ชนิดที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบไหลเวียน คือ IL-1 $\beta$

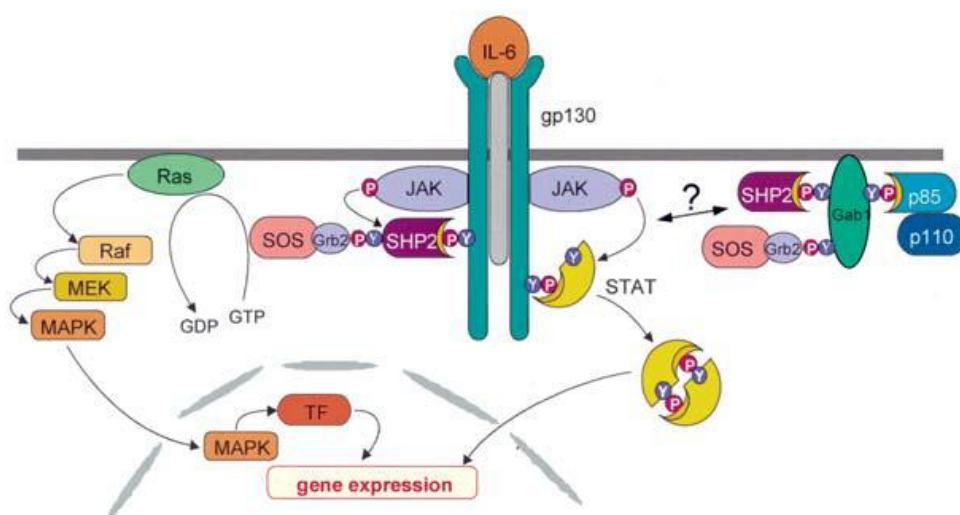
โดยทั่วไปแล้ว Interleukin-1 ทำหน้าที่สำคัญในระบบ innate immune response และเป็นสื่อกลางที่สำคัญของ inflammatory response รวมทั้งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ เช่น cell proliferation, differentiation และ apoptosis อีกทั้ง Interleukin-1 สามารถกระตุ้น cyclooxygenase-2 (PTGS2/COX2) ใน central nervous system (CNS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ inflammatory pain hypersensitivity อีกด้วย (39)

จากการศึกษา signaling pathway ที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide ต่อการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-1 ใน mouse monocytic cell พบว่าเมื่อเกิดการกระตุ้นโดย lipopolysaccharide จะ

ส่งสัญญาณผ่าน NF- $\kappa$ B pathway โดยพบว่าบริเวณ promoter ของ Interleukin-1 beta gene จะมี binding motif สำหรับ NF- $\kappa$ B/Rel, AP-1 และ CREB/ATF (40)

### Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 เป็นไซโตไคน์ ที่ทำหน้าที่หลายอย่าง ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดย macrophage, T-cell และ endothelial cell ยีนของ Interleukin-6 อยู่บน chromosome 7 บริเวณ 7p21 ซึ่งไซโตไคน์ Interleukin-6 มีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2), CTL differentiation factor (CDF), Hybridoma growth factor, Interferon beta-2 (IFN-beta-2) เป็นต้น Interleukin-6 (IL-6) เป็น cytokine ที่อยู่ใน family glycoprotein130 (gp130) ซึ่ง family นี้ ประกอบด้วย IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor(LIF), oncostatin M, cardiotrophin-1, cardiotrophin-like cytokine และ IL-27 ซึ่ง family นี้มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับ regulation ของ acute-phase response ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยการทำงานของไซโตไคน์นี้เกี่ยวข้องกับ signal transducers gp (glycoprotein) 130, LIF receptor และ oncostatin M receptor ซึ่งจะนำไปสู่การ activation ของ JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) และ MAPK (mitogenactivated protein kinase) (ภาพที่ 4) (41, 42)



ภาพที่ 4 การทำงานของไซโตไคน์ Interleukin-6 (42)

ไซโตไคน์ IL-6 มีความสำคัญใน host defense mechanism ทำหน้าที่สำคัญในระบบ innate immunity ผ่านทางกระบวนการอักเสบและไซโตไคน์ IL-6 มีความสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง acute phase protein ในเซลล์ตับ รวมทั้งช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของ myeloid

hematopoietic cell เพื่อกระตุ้นให้เป็นเม็ดเลือดขาวประเภท neutrophil รวมทั้งไซโตไคน์ IL-6 สามารถส่งเสริมการกระตุ้นการเจริญของ T-cell ได้อีกด้วย (39, 43)

## Adhesion molecule

### Intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)

Intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) หรือ Cluster of Differentiation 54 (CD54) ถูก encode จาก ICAM-1 gene ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 19 โดยยีนนี้ encode โกลโคโปรตีน ซึ่งแสดงออกบน endothelial cell , leukocyte, epithelial cell และ fibroblasts ICAM-1 อยู่ใน กลุ่ม immunoglobulin superfamily (IgSF) โครงสร้างของ ICAM-1 ประกอบด้วย extracellular Iglike domain 5 ส่วน, transmembrane segment 1 ส่วน และ short cytoplasmic tail จากการศึกษพบว่า ICAM-1 มีหน้าที่สำคัญในการ recruitment เม็ดเลือดขาว โดยผ่านทาง การ interaction กับ leukocyte-expressed integrin

ICAM-1 สามารถถูกกระตุ้นโดยไซโตไคน์ เช่น interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ICAM-1 สามารถแสดงออกได้บนเซลล์ vascular endothelium, macrophage และเม็ดเลือดขาว ICAM-1 เป็น ligand สามารถจับได้กับ integrin ที่พบบนเม็ดเลือดขาว เช่น ICAM-1/LFA-1 ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการ transmigrate เข้าสู่เนื้อเยื่อ หน้าที่สำคัญของ ICAM-1 ได้แก่ ควบคุมเสถียรภาพของ cell-cell interaction และทำให้เกิดความสะดวกรในการที่เม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนที่ผ่านเอนโดทีเลียล (leukocyte endothelial transmigration) การเพิ่มขึ้นของ ICAM-1 พบได้ในการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน และปัจจุบันพบว่า ICAM-1 เป็นทางเข้าของการเข้าสู่เซลล์ของ human rhinovirus อีกด้วย (44, 45)

### Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) หรือ cluster of differentiation 106 (CD106) ถูก encode จากยีน VCAM-1 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 โดย promoter region ของยีน VCAM-1 ประกอบด้วย functional tandem NF-KB (nuclear factor-kappa B) site นอกจากนี้พบว่า VCAM-1 เป็น endothelial ligand สำหรับ integrin  $\alpha 4\beta 7$  และ VLA-4 (Very Late Antigen-4 หรือ  $\alpha 4\beta 1$ ) ซึ่งแสดงออกอยู่บนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear, eosinophil, lymphocyte, monocyte และ basophil

เมื่อ endothelial cell ถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ จะส่งผลให้ VCAM-1 แสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่ง VCAM-1 เกี่ยวข้องกับการ adhesion ของเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocyte, monocyte, eosinophil และ basophil ให้ยึดเกาะกับ vascular endothelium และ VCAM-1 มักจะทำหน้าที่ในกระบวนการ leukocyte-endothelial cell signal transduction และมีบทบาทในกระบวนการดำเนินไปของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง และโรค rheumatoid arthritis อีกด้วย (46)

พบว่า leukocyte adhesion molecule มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด atherosclerosis โดยพบว่า VCAM-1 มีบทบาทสำคัญในช่วง initiation ของการดำเนินไปของโรค ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการ recruitment เซลล์เม็ดเลือดขาว monocyte ให้มายังบริเวณเส้นเลือด รวมถึงการ interaction ของ VCAM-1 ยังส่งผลต่อ monocyte/macrophage activation (47, 48)

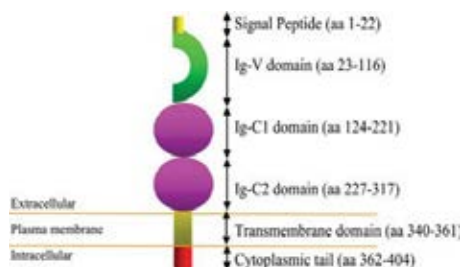
Neovascularization (NV) มีบทบาทสำคัญในโรคต่างๆ เช่น neovascularization ในตา จากการศึกษาพบว่าพบว่าการแสดงออกของ VCAM-1 และ oxidative stress มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้เกิด severe neovascularization ในการดำเนินโรคของโรคเบาหวาน (49)

### Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)

RAGE เป็น receptor บนผิวเซลล์ ซึ่งเป็นสมาชิกของ immunoglobulin superfamily ซึ่งเป็น type I membrane protein คือ membrane-protein ที่เป็น single pass ซึ่งส่วน NH<sub>2</sub>-terminus อยู่ด้านนอกของเซลล์ และ COOH-terminus อยู่ด้านใน cytoplasmic side ของเซลล์

RAGE เป็น multiligand receptor ซึ่งถูก encode ใน region ของ major histocompatibility complex Class III ส่วนประกอบของ RAGE มี 3 ส่วน (ภาพที่ 5) ได้แก่

1. ส่วนที่ใช้ในกระบวนการ signal transduction ซึ่งประกอบด้วย V-type domain ซึ่งทำหน้าที่เป็น ligand-binding module 1 domain และ C-type domain 2 domain
2. ส่วน transmembrane spanning helix 1 ส่วน
3. ส่วน cytoplasmic tail มีความสำคัญสำหรับ intracellular signaling คาดว่าสามารถจับกับ diaphanous-1 เพื่อทำให้เกิด cellular migration ได้

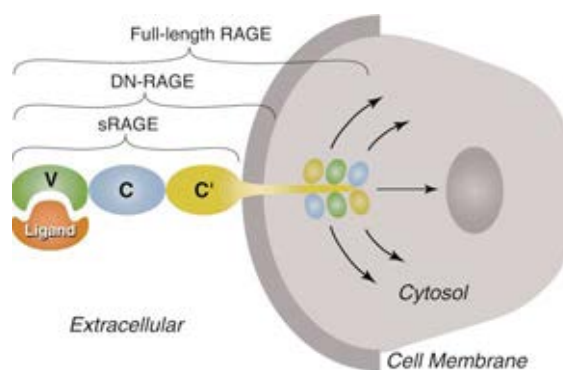


ภาพที่ 5 ส่วนประกอบของ Receptor for Advanced Glycation Endproducts (50)



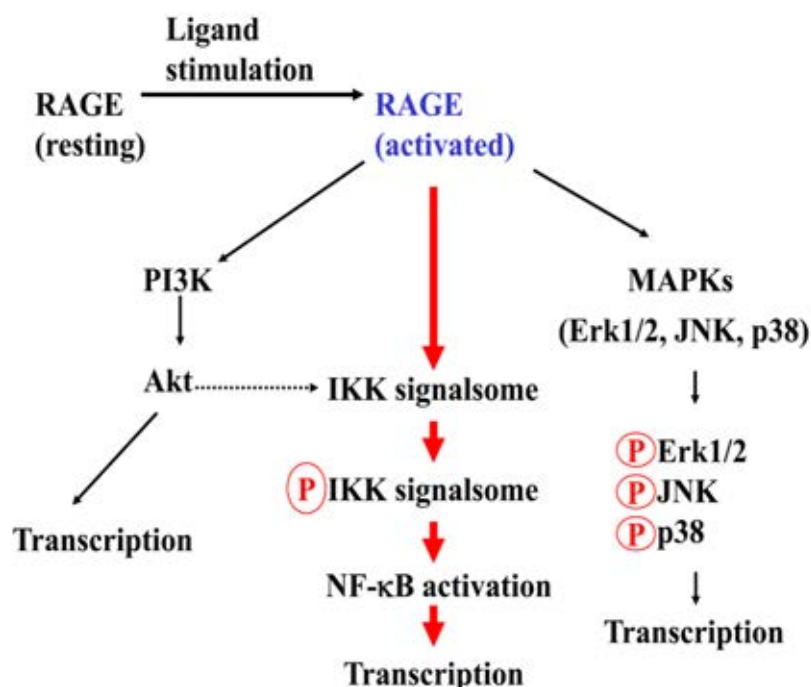
การแสดงออกของ RAGE พบว่าแสดงออกได้ 3 แบบ (ภาพที่ 6) คือ

1. Full-length RAGE (fl RAGE) มีส่วนประกอบครบทั้ง 3 ส่วน
2. DN-RAGE (dominant negative RAGE) ประกอบด้วยส่วน Extracellular และส่วนที่เป็น transmembrane domain
3. Soluble RAGE (sRAGE) ประกอบด้วยเฉพาะส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular) คือส่วน V,C,C' ซึ่งเกิดจาก proteolytic cleavage ของ fl-RAGE และจาก alternative mRNA splicing



ภาพที่ 6 ประเภทของ Receptor for Advanced Glycation Endproducts (51)

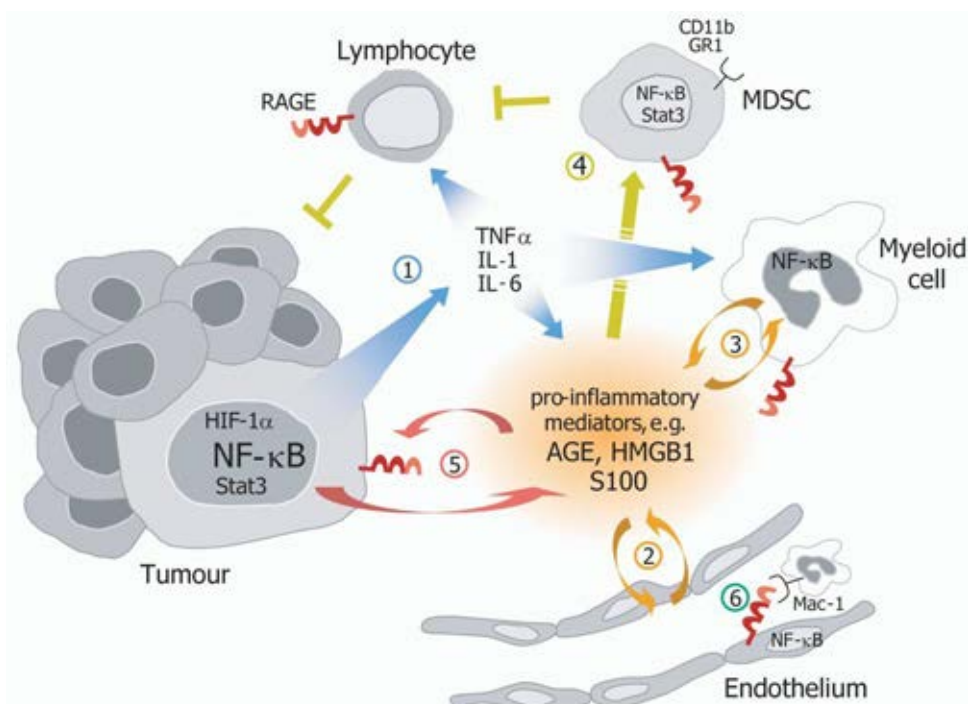
พบการแสดงออกของ RAGE ในระดับต่ำๆ ใน differentiated adult cells ในสภาวะปกติ แต่ใน mature lung type-I pneumocytes จะแสดงออกในระดับที่สูงมากกว่าในเซลล์ปกติอื่นๆ RAGE เป็น pattern recognition receptor (PRR) ซึ่งสามารถจับได้กับ endogenous ligand หลายชนิด การจับกันของ ligand กับ RAGE ชักนำไปให้เกิด cellular signaling ต่างๆ การกระตุ้นของ RAGE จะส่ง cell surface signal ให้เกิดการทำงานของ intracellular pathway ต่างๆ ได้แก่ PI3-kinase/AKT, MAPKs และกระตุ้น transcription factor NF- $\kappa$ B (ภาพที่ 7) ซึ่งนำไปสู่การสร้าง pro-inflammatory cytokine ต่างๆ และเป็นสาเหตุของการอักเสบเรื้อรังตามมา นอกจากนี้พบว่า RAGE signaling เกี่ยวพันกับโรคต่างๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน, โรคหลอดเลือดแดงแข็ง, โรค arthritis, และโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (52, 53)



ภาพที่ 7 การส่งสัญญาณของ RAGE (53)

RAGE เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง โดยสามารถแสดงออกได้บนเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง ได้แก่ tumour cell, endothelial cell, myeloid cell, myeloid derived suppressor cell (MDSC) และ เซลล์เม็ดเลือดขาว รวมถึง dendritic cell และ neuron โดย signalling pathway ที่ผ่านทาง RAGE เมื่อถูกกระตุ้นโดย ligand ต่างๆ เช่น advanced glycation end products (AGEs), high-mobility group protein B1(HMGB1), S100 protein เป็นต้น สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อกันระหว่างเซลล์ ในช่วง neoplastic transformation และ malignant progression ได้ รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการสร้าง pro-inflammatory cytokine เช่น TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 ได้ (ภาพที่ 8)

การจับกันของ RAGE และ RAGE ligand สามารถกระตุ้น endothelial และ myeloid cell ส่งผลให้เกิดการ recruitment ของ myeloid derived suppressor cell (MDSCs) ทำให้ยับยั้ง T cell และ natural killer cell ส่งผลให้เกิด T cell tolerance ได้ (54)



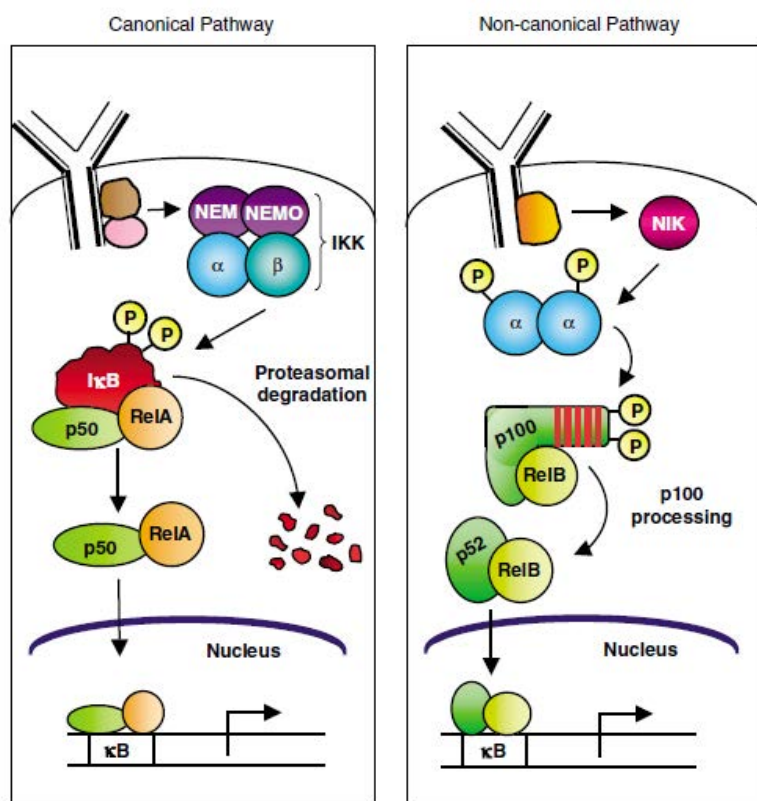
ภาพที่ 8 RAGE ligand เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง (54)

จากการศึกษา กระตุ้นเซลล์ต่างๆ ด้วย RAGE ligand พบว่าการกระตุ้น RAGE เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ reactive oxygen species โดยเอ็นไซม์ superoxide dismutase (SOD) มี activity ลดลง รวมถึง reactive oxygen species สามารถส่งเสริมให้เพิ่มการสร้าง advanced glycation end products (AGEs) ได้เช่นกัน (55) พบว่าการกระตุ้น RAGE และ oxidative damage มีความสำคัญในโรค chronic degenerative diseases มากมาย ได้แก่ โรคเบาหวาน ประเภทที่ 2, โรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจ และเมื่อ RAGE ถูกกระตุ้น จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น transcription factor NF-κB และพบว่ามีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการผลิต TNF-α โดยถูกกระตุ้นผ่านการสร้าง reactive oxygen species อีกด้วย (56, 57)

### Transcription factor NF-κB

Nuclear factor kappa B หรือ NF-κB เป็น transcription factor ที่สำคัญในกระบวนการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ในระหว่างการอักเสบ โดยกลไกที่สำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ NF-κB คือ classical หรือ canonical NF-κB pathway และ non-canonical NF-κB pathway กระบวนการ classical หรือ canonical NF-κB pathway พบว่าในสถานะที่ไม่ถูกกระตุ้น NF-κB dimer ได้แก่ p50/RelA(p65) จะอยู่ใน cytoplasm โดยจับอยู่กับ inhibitory protein คือ

IKB molecule คือ  $IKB\alpha$  โดยเมื่อมี ligand เช่น  $TNF-\alpha$ , IL-1, LPS มาจับกับ receptor บนผิวเซลล์ (เช่น tumor necrosis factor-receptor (TNF-R) หรือ Toll-like receptor) จะเกิดการ recruit adaptor (เช่น TRAFs และ RIP) มาจับกับ cytoplasmic domain ของ receptor บนผิวเซลล์นั้น ซึ่ง adaptor เหล่านี้จะกระตุ้น IKK complex ซึ่งประกอบด้วย  $\alpha$  และ  $\beta$  catalytic subunit และ molecules ของ regulatory scaffold NEMO หลังจากนั้น IKK จะทำหน้าที่ phosphorylate คือเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IKB ที่ตำแหน่ง serine residue 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะนำไปสู่ K48 ubiquitination และการ degradation โดย proteasome หลังจากนั้น NF- $\kappa$ B จะเคลื่อนเข้าสู่ nucleus ก่อให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (ภาพที่ 9) (58)



ภาพที่ 9 กระบวนการ canonical NF- $\kappa$ B pathway และ non-canonical NF- $\kappa$ B pathway (58)

กระบวนการ non-canonical (alternative) pathway เป็นกระบวนการที่เกิดจากการกระตุ้น p100/RelB complex ซึ่งเกิดในช่วงการพัฒนา B-cell และ T-cell organ ซึ่ง pathway นี้สามารถถูกกระตุ้นได้จาก receptor signal ได้แก่ Lymphotoxin B (LTb), B-cell activating factor (BAFF), CD40, LPS, lymphotoxin receptors, latent membrane protein-1(LMP1) และเนื่องจากกระบวนการนี้ทำงานโดย IKK complex ที่ประกอบด้วย  $IKK\alpha$  2 subunit ซึ่งไม่ใช่ NEMO ใน non-canonical pathway นี้เกิดจากการกระตุ้นของ NF- $\kappa$ B-inducing kinase หรือ

NIK ซึ่งจะทำให้การ phosphorylate คือเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IKK $\alpha$  complex ซึ่งส่งผลให้เกิดการ phosphorylate ให้กับ serine residue 2 ตำแหน่งซึ่งติดอยู่กับ ankyrin repeat C-terminal IKB domain ของ p100 นำไปสู่การปลดปล่อย p52/RelB complex ให้เป็นอิสระ และเข้าสู่นิวเคลียส ก่อให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (58, 59)

## โรคที่มีพยาธิสภาพเกิดจากการอักเสบ

### โรคเบาหวาน

โรคเบาหวานเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเมตาบอลิซึม ซึ่งผู้ป่วยโรคเบาหวานจะมีระดับกลูโคสในเลือดสูง โดยสาเหตุเกิดจากความผิดปกติของการหลั่ง insulin จากตับอ่อน (60) โรคเบาหวานประเภทที่สำคัญ ได้แก่ โรคเบาหวานประเภทที่ 1 มีสาเหตุเกิดจาก beta cell ของตับอ่อนถูกทำลายจาก autoimmune หรือการติดเชื้อไวรัสบางชนิด และโรคเบาหวานประเภทที่ 2 มีสาเหตุเกิดจากการดื้อต่อ insulin (61) โรคแทรกซ้อนเรื้อรังต่างๆ ซึ่งเกิดจากโรคเบาหวาน เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) โรคจอตาเสื่อม (Diabetic retinopathy) โรคไตเสื่อม (Diabetic nephropathy) เป็นต้น มีสาเหตุหลักเกิดจาก chronic hyperglycemia และพบว่า advanced glycation end products (AGEs) เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อพยาธิสภาพทั้งที่หลอดเลือดขนาดเล็กและขนาดใหญ่ในโรคเบาหวาน ซึ่ง AGEs ของพลาสมาโปรตีนต่างๆ สามารถจับกับตัวรับของ AGEs (RAGE) บนเยื่อหุ้มของเซลล์ endothelial, mesangial และ macrophage แล้วกระตุ้น reactive oxygen species (ROS) และ transcription factor เช่น nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ทำให้มีการหลั่ง growth factor และ cytokine ต่างๆ เช่น Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) , Interleukin-6 (IL-6) ตามมา และยังมีกระบวนการแสดงออกของ adhesion molecule ต่างๆ ได้แก่ ICAM-1 , VCAM-1 , MCP-1 , PAI-1 ซึ่งกลไกต่างๆ เหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยในการเกิดการอักเสบเรื้อรังได้ (7-9)

### การเกิดพยาธิสภาพของภาวะแทรกซ้อนทางไตจากโรคเบาหวาน

เมื่อเกิดภาวะแทรกซ้อนทางไตจากโรคเบาหวาน จะมีการอักเสบเพิ่มขึ้น มีการดึงดูดและรวบรวม macrophage ในไตมากขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และเกี่ยวข้องกับ การพัฒนา renal fibrosis และ albuminuria การเพิ่มจำนวนของ macrophage จะถูกควบคุมโดย colony stimulating factor-1(CSF-1) และการกระตุ้น macrophage เกี่ยวข้องกับ oxidative stress, P38 MAPK signaling pathway และ c-Jun amino terminal kinase ซึ่งนำไปสู่การ

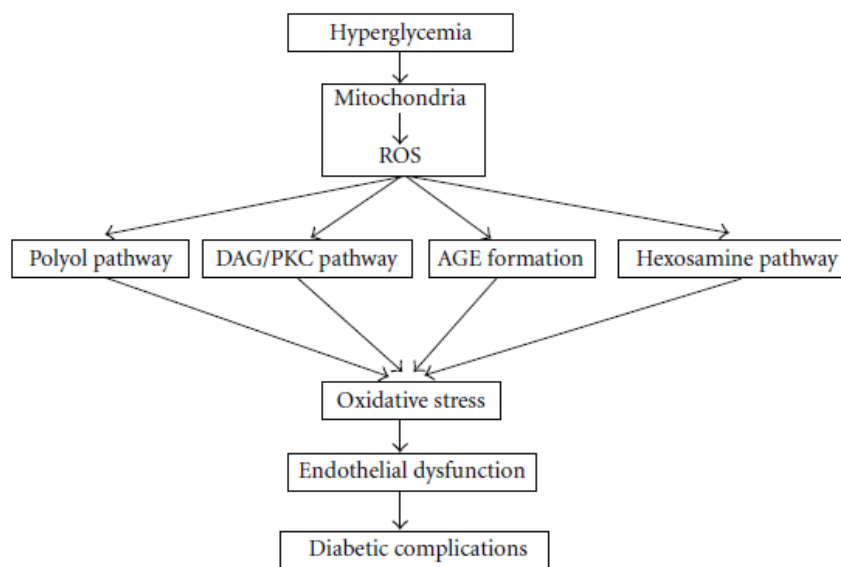
กระตุ้น transcription factors nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) และ activation protein-1 ทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  (62)

เซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นจะเพิ่มการผลิต reactive oxygen species, reactive nitrogen species, matrix metalloproteinase, mitogenic growth factors, tissue factor และ profibrotic cytokines (TGF- $\beta$ ) (62) Transforming growth factor  $\beta$ -1(TGF- $\beta$ ) เกี่ยวข้องกับการพัฒนาในระยะ early diabetic nephropathy ซึ่งภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และ Angiotensin II เป็นสาเหตุหลักของ de novo synthesis ของ transforming growth factor  $\beta$ -1 นำไปสู่การ accumulation ของ extracellular matrix (63) ภาวะแทรกซ้อนทางไตในโรคเบาหวานเกี่ยวข้องกับ PKC, NF- $\kappa$ B และ MAPK นำไปสู่การอักเสบเพิ่มขึ้น พยาธิสภาพจากภาวะแทรกซ้อนทางไต ได้แก่ มีภาวะ proteinuria, เกิดการ mesangium expansion, nephromegaly และสุดท้ายทำให้เกิด glomerular sclerosis (8) มีการเพิ่มขึ้นของ TNF- $\alpha$ , IL-6 และ IL-18 (64, 65) TNF- $\alpha$  เป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลาย glomerular endothelial และขัดขวาง glomerular permeability barrier นำไปสู่การเกิด albuminuria การกระตุ้น monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ของ TNF- $\alpha$  ทำให้เกิดการสะสมเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภท polymorphonuclear และ monocyte นอกจากนั้น TNF- $\alpha$  ยังมีคุณสมบัติ procoagulant และกระตุ้นการ apoptosis (66) อีกทั้ง TNF- $\alpha$  ยังเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อ insulin เพราะ TNF- $\alpha$  สามารถขัดขวางการ auto-phosphorylation ที่ tyrosine residues ของ insulin receptor(IR) และขัดขวางการ induction of serine phosphorylation ของ insulin receptor substrate-1(IRS-1) (67) ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไต พบว่ามีการผลิตไซโตไคน์ ได้แก่ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN-gamma, IL-2 และ chemokine ได้แก่ MCP-1 ในซีรัมที่สูงขึ้น (68) ผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 มี Th17 cell ในระบบไหลเวียนเลือดเพิ่มขึ้น และพบว่า PBMCs ผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 มีการผลิต IL-17 สูงขึ้นด้วย (69)

### พยาธิสภาพทางไตเกี่ยวข้องกับ Reactive Oxygen Species (ROS)

มีการศึกษาผลของ reactive oxygen species (ROS) ต่อการพัฒนาและดำเนินไปของพยาธิสภาพของไตในผู้ป่วยเบาหวาน สาเหตุของ oxidative damage ในไตนั้น ได้แก่ oxidative phosphorylation และการ uncoupling ของ respiratory chain โดย mitochondrial respiratory chain พบว่าการสร้าง ROS เกิดได้หลายทาง ได้แก่ glycolysis pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase, sorbitol pathway, advanced glycation, NAD(P)H oxidase, xanthine

oxidase และ uncoupling ของ NOS (70) ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเกี่ยวข้องกับ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถกระตุ้น pathway ต่างๆ รวมไปถึง polyol pathway, DAG/PKC pathway และ AGE formation ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ oxidative stress เพิ่มขึ้น นำไปสู่ endothelial dysfunction ได้ (ภาพที่ 10) (7)



ภาพที่10 ROS และ พยาธิสภาพของสภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวาน (7)

### พยาธิสภาพทางไตเกี่ยวข้องกับ Advanced glycation end products (AGEs)

ผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 จะมี advanced glycation end products (AGEs) เพิ่มขึ้น AGEs สามารถจับกับ RAGE ซึ่งพบใน tubular epithelial cell, mesangial cell และ podocyte ในไตและนำไปสู่การกระตุ้น NF-KB pathway และกระตุ้นการหลั่ง proinflammatory cytokine และการแสดงออกของ adhesion molecule ให้มากขึ้น (71) และ endothelial dysfunction เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคเบาหวาน โดยภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจะกระตุ้นให้เพิ่ม ROS และนำไปสู่ endothelial dysfunction ได้ (72, 73) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานจะพบค่า E-selectin, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ในระดับที่สูงกว่า baseline ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและ AGEs สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 และ VCAM-1 ใน mesangial cell ได้ (62) และพบว่า proinflammatory biomarker และ adhesion molecule เช่น CRP, sVCAM-1, PAI-1, IL-18, AGEs และ MCP-1 เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไต (74)

ผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 ที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไต พบว่า adiponectin ในพลาสมาจะสูงขึ้น และมี vascular dilatation ลดลง ทำให้เกิด vascular endothelial dysfunction (75) และ marker ที่สำคัญที่แสดงถึง endothelial cell damage อีกชนิดหนึ่งคือ plasma von Willebrand factor (vWF) และ thrombomodulin (TM) ซึ่งพบว่ามียกระดับสูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไต (76)

Glomerular infiltration เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของภาวะแทรกซ้อนทางไตในโรคเบาหวาน เม็ดเลือดขาวจะแสดงออก Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule-1 (LECAM-1) ในกระบวนการแรกขง leukocyte-endothelial cell interaction ของการชักนำเม็ดเลือดขาวมาที่ glomeruli พบว่า LECAM-1 gene polymorphism เป็น genetic risk factor ของการเกิดพยาธิสภาพทางไตของโรคเบาหวานได้ (77) และพบว่า endothelial cell selective adhesion molecule (ESAM) แสดงออกที่บริเวณ tight junction บน vascular endothelial cell และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ vascular permeability ปัจจุบันพบว่าภาวะน้ำตาลในเลือดสูงสามารถลดการแสดงออกของ ESAM และเพิ่ม glomerular endothelial permeability ได้ (78) ผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไตพบว่า glomerular VEGF (vascular endothelial growth factor) mRNA expression สูงขึ้นในช่วงแรกของภาวะแทรกซ้อนทางไต (79) ในขณะที่ VEGF expression จะสูงขึ้นในผู้ที่มีสภาวะแทรกซ้อนทางไต ส่งผลให้ชักนำสภาวะ endothelial cell proliferation และ endothelial dysfunction (80) ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจะทำให้เกิด vascular endothelial dysfunction โดยลดการแสดงออก endothelial nitric oxide synthase (eNOS) นำไปสู่การลดการผลิต NO ซึ่งเป็นสาร vasodilatory ที่สำคัญซึ่งสร้างโดย endothelium และพบว่า eNOS uncoupling ใน vascular endothelial dysfunction นำไปสู่การเพิ่ม ROS และเพิ่มการหลั่ง proinflammatory mediator และ adhesions molecule (81) สภาวะแทรกซ้อนทางไตจะมี renal functional change ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของการเกิด urinary albumin excretion (82) ในผู้ป่วยเบาหวานพบว่าระดับ high sensitivity (hs) CRP, hsTNF- $\alpha$ , VCAM-1 และ E-selectin มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกับ urinary albumin excretion rate (AER) (83)

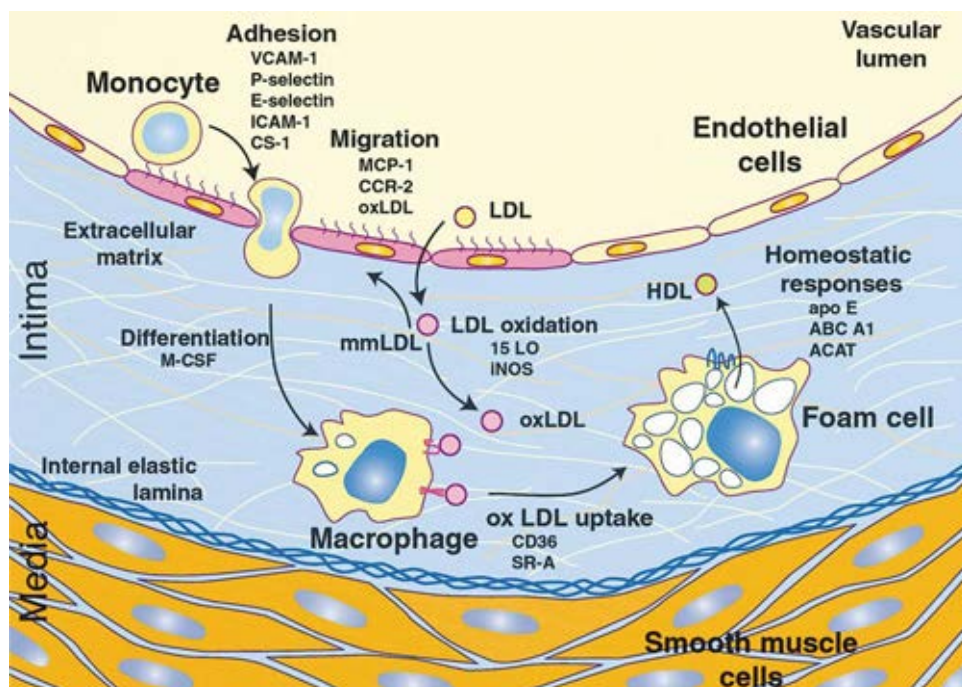
### การเกิดพยาธิสภาพในโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis)

ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) คือ ภาวะที่มีความผิดปกติของผนังหลอดเลือดแดง มี plaque เกิดขึ้นภายในหลอดเลือดแดง เชื่อว่าเกิดจากขบวนการ chronic inflammation อันเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการบาดเจ็บของหลอดเลือด จากนั้นหลอดเลือด



แดงจะเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่าง endothelial cell, เม็ดเลือดขาว, เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และ เกร็ดเลือด โดยมี growth factor และ cytokine ที่เซลล์เหล่านี้สร้างขึ้นมา จะไปกระตุ้นให้ endothelial cell ให้เกิดการอักเสบ จนมีการก่อตัวของ plaque ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่ง plaque ประกอบด้วย fat, cholesterol, calcium และส่วนประกอบอื่นๆภายในหลอดเลือด ทำให้เกิดการตีบตันของหลอดเลือด อาจเกิดผลร้ายแรง เช่น หัวใจวาย และเสียชีวิตได้ (84)

การอักเสบเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของสภาวะ atherogenesis ซึ่งพบว่าการบาดเจ็บของเซลล์เอนโดทีเลียล เกี่ยวข้องกับการเกิด endothelial dysfunction ซึ่งไปส่งเสริมการอักเสบ และเกิดการ recruitment ของเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocyte และ T-cell และมีการแสดงออกของ adhesion molecules ต่างๆเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการ rolling, adhesion และ migration ของเม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณ arterial wall และเกิดการ differentiation, proliferation และ activation ของ macrophage และ smooth muscle cell และพบการ expression ของ scavenger receptor บน macrophage และเกิดการ oxidation ของ LDL และเกิด foam cell ขึ้น (ภาพที่ 11) และเกิดเป็น plaque โดยการ recruitment ของเซลล์ต่างๆอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นมีการหลั่ง matrix metalloproteinases (MMP) ทำให้ fibrous cap บาง และเกิดการแตกของ plaque และเกิด thrombosis ขึ้น (3, 4)



ภาพที่ 11 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (84)

โรคหลอดเลือดแดงแข็งเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบอย่างเรื้อรังบริเวณ specific arterial เช่น branche, bifurcation และ curvature โดยบริเวณต่างๆเหล่านี้มี specific molecule จากบน endothelium ซึ่งจะตอบสนองเพื่อเกิดการ adherence, migration และ accumulation ของ monocyte และ T cell พบว่า adhesion molecule ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสำหรับ glycoconjugate และ integrin ที่อยู่บน monocyte และ T cell ได้แก่ selectin, intercellular adhesion molecule และ vascular-cell adhesion molecule

Molecule ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนของ leukocyte ผ่าน endothelium เช่น platelet-endothelial-cell adhesion molecule, ทำหน้าที่ในการ conjunction กับ chemoattractant molecule ที่ถูกสร้างโดย endothelium, smooth muscle และ monocyte เช่น monocyte chemotactic protein 1, osteopontin และ modified LDL เพื่อดึงดูด monocyte และ T cell เข้าสู่ artery

ลักษณะของการไหลในหลอดเลือดเป็นสิ่งสำคัญในกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน เช่น ยีนสำหรับ intercellular adhesion molecule 1, platelet-derived growth factor B chain และ tissue factor 83 ใน endothelial cell และการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อลด shear stress ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงในกระแสเลือดเป็นสิ่งสำคัญในการส่งเสริมให้บริเวณใดของหลอดเลือดมีแนวโน้มที่จะมีแผล การ rolling และ adherence ของ monocyte และ T cell เกิดขึ้นที่บริเวณเหล่านี้เป็นผลมาจากการ up-regulation ของ adhesion molecules บนเซลล์ endothelium และเม็ดเลือดขาว เกิดการ chemotaxis โดยการทำงานของ chemokine และการสะสมของ macrophage ในริ้วไขมัน การกระตุ้น monocyte และ T cells นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ receptors บนผิวเซลล์ เช่น mucin-like molecule จับกับ selectin, integrin จับกับ adhesion molecule ที่เป็น immunoglobulin superfamily และ receptor จับกับ chemoattractant molecule การจับกันของ ligand-receptor เหล่านี้ ส่งผลต่อการกระตุ้น mononuclear cell และเหนี่ยวนำการ proliferation ของเซลล์ (57) เซลล์ monocyte และ macrophage ที่ถูกกระตุ้นสามารถทำร้ายเซลล์ endothelial cell ที่อยู่ใกล้เคียงโดยการสร้าง reactive oxygen specie และ hydrolytic enzyme ต่างๆ ซึ่งสามารถกระตุ้นการ proliferation ของ smooth muscle cell รวมทั้ง macrophage สามารถหลั่ง platelet-stimulating factor และเกิดการยึดเกาะกันของ platelet นำไปสู่การทำร้าย epithelium ซึ่งเป็นสาเหตุของการ release ของ agent ที่ส่งเสริมการ proliferation ของ smooth muscle cell (85)

## การเกิดพยาธิสภาพในโรค rheumatoid arthritis

โรค rheumatoid arthritis พบว่าการ activation และ proliferation ของ synovial lining และการแสดงออกของ inflammatory cytokines ที่สำคัญคือ Interleukin-6 รวมถึง chemokine จะเหนี่ยวนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะ B cell ซึ่งทำให้เกิดการผลิต autoantibody ในโรค rheumatoid arthritis (5, 6)

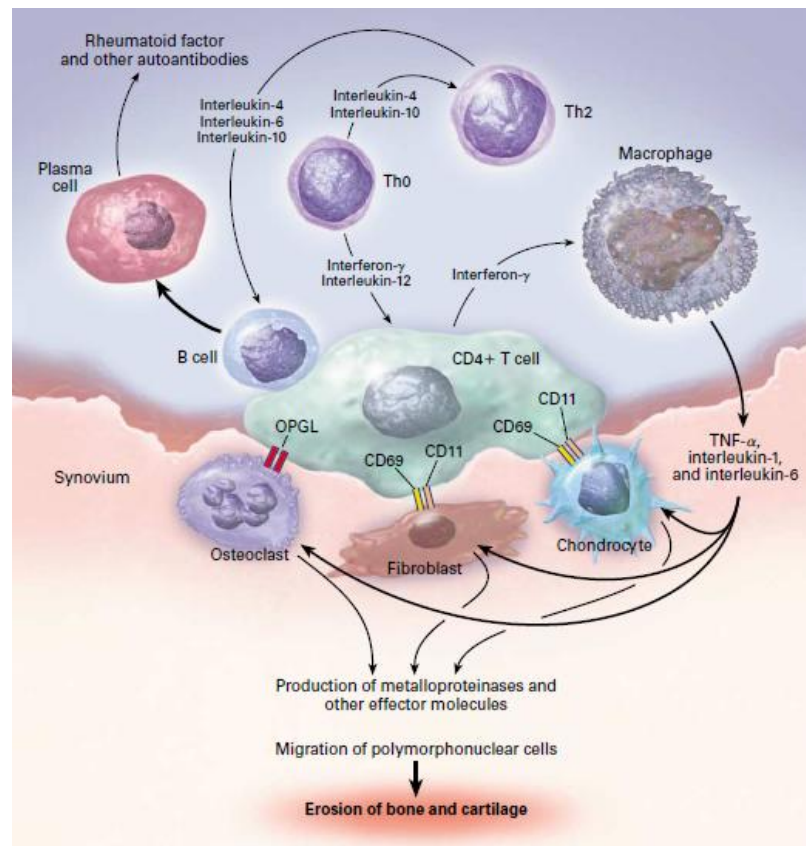
โรค rheumatoid arthritis พบว่า เซลล์ monocyte, macrophage, fibroblast และ T cell หลังไซโตไคน์ต่างๆมากมาย ซึ่งไซโตไคน์ส่วนใหญ่เหล่านี้ ได้แก่ TNF- $\alpha$  และ interleukin-1 สามารถตรวจพบได้ใน synovial fluid ของผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis ทั้งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  และ interleukin-1 เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทหลักในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรค rheumatoid arthritis ระดับความเข้มข้นของไซโตไคน์ทั้ง 2 ตัวนี้ในซีรัมและ synovial fluid สูงขึ้นในผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis นอกจากนี้ TNF- $\alpha$  และ interleukin-1 จะกระตุ้นศักยภาพของ mesenchymal cell เช่น synovial fibroblast, osteoclast และ chondrocyte ในการหลั่ง tissue-destroying matrix metalloproteinase

Interleukin-1 และ TNF- $\alpha$  ยับยั้งการผลิต tissue inhibitor ของ metalloproteinase โดย synovial fibroblast กลไกทั้งหมดนี้ทำให้เกิดการบาดเจ็บของ joint ขึ้น ซึ่งโรค rheumatoid arthritis นี้อธิบายลักษณะตามการ progressive ของ joint damage ซึ่งเกิดจากกลไกต่างๆ การกร่อนของ cartilage และกระดูกเกี่ยวข้องกับการ formation ของ proliferating ของ pannus บริเวณผิวสัมผัสระหว่าง pannus กับ cartilage จะพบ activated macrophages และ synovial fibroblasts ที่หลั่ง matrix metalloproteinase และ cathepsin

Interleukin-1 และ TNF- $\alpha$  จะกระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecule บน endothelial cell และเพิ่มการ recruitment ของ neutrophil เข้าสู่ joint แล้ว neutrophil จะหลั่ง elastase และ proteases ทำให้เกิดการ degrade ของ proteoglycan ใน superficial layer ของ cartilage การพองลงของ proteoglycan ทำให้ immune complex สามารถ precipitate ใน superficial layer ของ collagen และเซลล์ chondrocyte และ synovial fibroblast หลั่ง matrix metalloproteinase เมื่อถูกกระตุ้นโดย interleukin-1, TNF- $\alpha$  หรือ CD4+ T cell ที่ถูกกระตุ้น (ภาพที่ 12)

matrix metalloproteinase โดยเฉพาะ stromelysin และ collagenase เป็น enzyme ที่สลาย connective-tissue matrix และเป็น mediator หลักของการบาดเจ็บของ joint ในโรค

rheumatoid arthritis จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า CD4+ T cell ที่ถูกกระตุ้น จะนำไปสู่การเกิด osteoclastogenesis และเป็นสาเหตุของการบาดเจ็บของ joint ได้ (86)



ภาพที่ 12 กลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรค rheumatoid arthritis (86)

ในปัจจุบันมีการศึกษาการรักษาโรค rheumatoid arthritis โดยการมุ่งเน้นการยับยั้งผ่านไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  เป็นเป้าหมายหลักในการรักษาโรค rheumatoid arthritis โดยได้มีการศึกษาในการทดลองทางคลินิกเกี่ยวกับการใช้ anti-TNF- $\alpha$  therapy ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรค rheumatoid arthritis เรื้อรัง โดยในการศึกษาวิจัยหลายงานวิจัยได้ทดลองใช้ chimeric anti-TNF- $\alpha$  antibody แสดงถึงผลดีทางคลินิก clinical (87)

### การเกิดพยาธิสภาพของโรค systemic lupus erythematosus หรือ SLE

โรค systemic lupus erythematosus เป็น autoimmune disease ซึ่งมีการผลิต autoantibodies ต่อ antigen ในนิวเคลียส ซึ่ง autoantibodies เหล่านี้ ส่งผลให้เกิดการก่อตัวและรวมกันเป็น immune complex เกิดเป็นตะกอนสะสมในเนื้อเยื่อ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ นำไปสู่พยาธิสภาพต่างๆของโรค

การอักเสบเรื้อรังมีบทบาทสำคัญในผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus อย่างมาก ปัจจุบันพบว่า ภาวะ endothelial injury และ endothelial dysfunction สามารถถูกเหนี่ยวนำได้จาก stress, viruse, toxin เช่น homocysteine, immune complexe, complement activation และภาวะ oxidative stress ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย SLE และความบกพร่องในการกำจัด immune complexe และ complement activation มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรค SLE (1, 2)

จากการศึกษาที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันทำให้ทราบว่า การ recognition ของ nucleic acid motif โดย Toll-like receptor มีบทบาทสำคัญทั้งการ activation ของ antinuclear B cell และในการดำเนินไปของโรค พบว่าหลังจากมีการก่อตัวของ immune complex จะเกิดการ endosomal localization ของ Toll-like receptors (TLRs), TLR3, 7 และ 9 ซึ่งบทบาทของ B-cell receptor ในการนำส่ง nuclear antigen ไปสู่ส่วน intracellular คือยอมให้เกิดการกระตุ้น TLR โดย endogenous nucleic acid (88)

### แนวทางการรักษาโรคที่มีพยาธิสภาพจากการอักเสบเรื้อรัง

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยการรักษาโรคที่มีสาเหตุเกิดจากการอักเสบเรื้อรังมากขึ้น โดยมุ่งเน้นไปที่การส่งสัญญาณผ่านทางไซโตไคน์ โดยเฉพาะ tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ได้มีการศึกษาใช้การยับยั้ง TNF- $\alpha$  receptor และใช้ chimeric monoclonal antibody TNF- $\alpha$  เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีอาการแทรกซ้อนทางไต (17) การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น tocotrienol ซึ่งอยู่ในกลุ่ม vitamin E มีคุณสมบัติลด TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 และป้องกัน reactive oxygen species ในการกระตุ้น NF- $\kappa$ B p65 subunit expression (18) และในการศึกษาการขัดขวาง TNF- $\alpha$  พบว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรค systemic lupus erythematosus รวมทั้ง TNF- $\alpha$  inhibitor สามารถใช้ในการรักษาโรค rheumatoid arthritis ได้ด้วย (19, 20) ในโรค acute และ chronic auto-inflammatory disease พบว่าการขัดขวางคุณสมบัติของ IL-1 $\beta$  สามารถความรุนแรงของโรคได้ ตัวอย่าง เช่น IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) ได้มีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis และเบาหวานประเภทที่ 2 (21) soluble extracellular domain ของ RAGE สามารถช่วยเป็น potential therapeutic blocker สำหรับรักษาภาวะแทรกซ้อน macrovascular ในโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจ (22) ยารักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ได้แก่ GLP-1 สามารถลดการแสดงออก mRNA ของ VCAM-1 โดยขัดขวางการแสดงออกของยีน RAGE (23)

สาร flavonoid เช่น apigenin สามารถลดการแสดงออกของ adhesion molecule และ junctional molecules ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- $\alpha$  ใน endothelial cell ได้(89) สมุนไพรไทย เช่น กระจ่างหรือมีคุณสมบัติด้านการอักเสบ และ มะระขี้นก หรือ *Momordica charantia* Linn (bitter melon) ทำให้ immune system ดีขึ้น ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง cervical ซึ่งมะระขี้นกสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ NK cell ในผู้ป่วยได้ (29) สมุนไพรไทยหลายชนิดสามารถต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งพบว่าคุณสมบัติที่สำคัญเหล่านี้เกิดจากสารสำคัญได้แก่ flavonoid และ polyphenol (25-28)

### หญ้าแฉ่ำน้ำ หรือ *Fimbristylis ovata* (Burm.f.) Kern

หญ้าแฉ่ำน้ำอยู่ใน Family Cyperaceae มี common name ว่า Flatspike Sedge และ Flat-Spike Rush มีชื่อเรียกพื้นบ้านของไทย ได้แก่ หญ้าแฉ่ำน้ำ และ หญ้ากุกหมู (90) มี synonym (91) ได้แก่

- *Abildgaardia monostachya* (L.) Vahl
- *Abildgaardia ovata* (Burm. f.) Kral
- *Cyperus monostachyos* L.
- *Carex ovate* Burm.f.
- *Fimbristylis monostachya* (L.) Hassk.

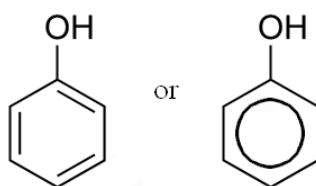
หญ้าแฉ่ำน้ำเป็นพืชที่มีการนำไปใช้โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ใช้รักษาการอักเสบของ lymph node (adenitis), การติดเชื้อ scrofula, ใช้รักษาโรคsyphilis ใช้รักษาอาการไอ และโรคหลอดลมอักเสบ (bronchitis) รวมทั้งใช้รักษาโรคหอบหืดได้ (30, 31) ต้นหญ้าแฉ่ำน้ำ เป็นพืชล้มลุก ก้านมีความสูงประมาณ 6-40 เซนติเมตร ดอกอยู่ที่ยอดของก้าน มีลักษณะรูปทรงไข่ ยาว 6-15 มิลลิเมตร กว้าง 3-6 มิลลิเมตร กลีบอัดแน่น (ภาพที่ 13) พบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีรายงานพบว่าพืชใน Family Cyperaceae มีสารออกฤทธิ์จำพวก phenolic compound, flavonoid, tannin, alkaloid, glycosides, protein, amino acid, และ saponin (92, 93)



ภาพที่ 13 ลักษณะของต้นหญ้าแฉ่ำน้ำ

### สารประกอบฟีนอล (Phenols หรือ phenolics)

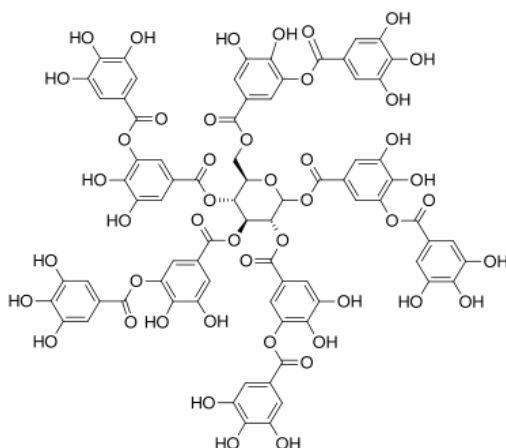
สารประกอบฟีนอล เป็นสารประกอบทางเคมีซึ่งประกอบด้วย hydroxyl group ( $\text{—OH}$ ) จับอยู่กับ aromatic hydrocarbon group โดย phenols ธรรมดาที่สุดคือ carboic acid มีสูตรโมเลกุล คือ  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$  (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบฟีนอล (94)

### สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenols)

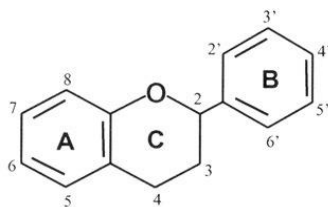
สารประกอบโพลีฟีนอล เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างจากธรรมชาติเป็นหลัก แต่ก็สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ สารอินทรีย์นี้ประกอบด้วยโครงสร้าง phenol หลายๆหน่วย (ภาพที่ 15) จำนวนและลักษณะโครงสร้างจะทำให้คุณสมบัติทางการยภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ เช่น metabolic, toxic, therapeutic เป็นต้น นั้นแตกต่างกัน



ภาพที่ 15 ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบโพลีฟีนอล (94)

### สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

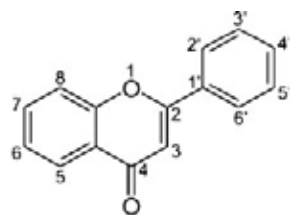
ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบ polyphenol ที่พบส่วนมากในพืช ผัก ผลไม้ ประกอบด้วย carbon 15 อะตอม โดยโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน benzene 2 วงเชื่อมต่อกันกับสาย carbon chain ที่มี carbon 3 อะตอม โดยมีอะตอม carbon หนึ่งเชื่อมต่อกับอะตอม carbon ของวงแหวน benzene และอะตอม carbon อีกหนึ่งอะตอมต่อกับ oxygen bridge จึงทำให้เกิดวงแหวนตรงกลางขึ้น โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids แสดงในภาพที่ 16



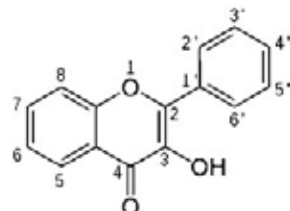
ภาพที่ 16 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์ (94)

ฟลาโวนอยด์มีประเภทต่างๆ ได้แก่ flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanols, isoflavones, anthocyanidins (94) โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 17

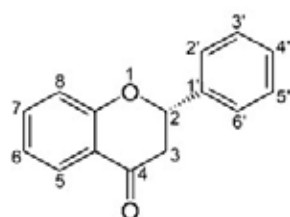




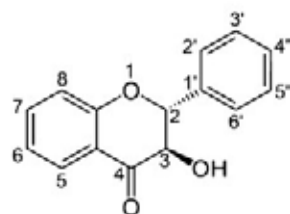
Flavones



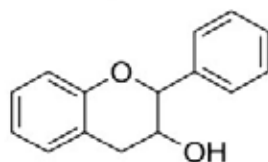
Flavonols



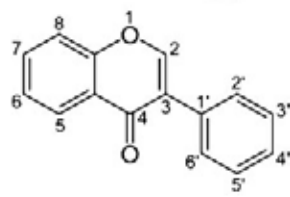
Flavanones



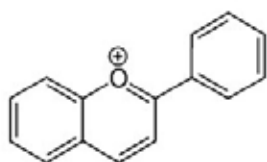
Flavanonols



Flavanols



Isoflavones



Anthocyanidins

ภาพที่ 17 โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ประเภทต่างๆ (94)

## การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารประกอบโพลีฟีนอล

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารประกอบโพลีฟีนอลอย่างมากมาย สารประกอบโพลีฟีนอลเป็นพฤกษเคมี (phytochemical) ที่พบมากในอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากพืช การบริโภค polyphenol เพิ่มมากขึ้นแสดงให้เห็นว่าช่วยป้องกันจากโรคที่มีการอักเสบ เพราะสารประกอบโพลีฟีนอลสามารถออกฤทธิ์ anti-inflammatory และคุณสมบัติ vasculoprotective ได้ จากการศึกษาสาร polyphenol ได้แก่ resveratrol, epigallocatechin gallate, curcumin และ quercetin โดยเมื่อให้สัตว์ทดลองกินหรือให้โดยการฉีด (systemic administration) สารจำพวกนี้สามารถต่อต้าน nuclear factor KB-dependent gene expression และกระตุ้น phase II antioxidant และ detoxifying protein ได้ สภาวะที่ถูกป้องกันโดย polyphenol นี้ ได้แก่ inflammatory colitis และ acute pancreatitis พบว่า Polyphenols ยังสามารถลด schaemia-reperfusion injury และ endotoxemic sepsis ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดำเนินของ multiple organ dysfunction ใน severe acute pancreatitis (95)

มีการพัฒนาการรักษาโรค inflammatory bowel diseases (IBD) ด้วยสาร polyphenol ซึ่งโรค inflammatory bowel diseases (IBD) เป็นโรคที่มีสาเหตุการเกิดได้หลากหลาย เช่น environmental factor, gut microflora, immunity และ genetic predisposition ซึ่งอาการแทรกซ้อนที่รุนแรงที่สุด ก็คือการพัฒนาไปเป็น colon cancer พบว่าในโรค inflammatory bowel diseases (IBD) จะมี immune homeostasis และ intestinal mucosa barrier integrity เสื่อมลง พบว่าการใช้ pure polyphenolic compound และ natural polyphenolic plant extract สามารถช่วยลด intestinal inflammation ได้ (96)

สาร phenolic compound มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิด metastasis ของมะเร็ง ซึ่งเป็นการแพร่กระจายของ cancer cell จาก primary neoplasm ไปสู่อวัยวะและเนื้อเยื่ออื่นๆ ทำให้เกิด secondary tumor ขึ้น Metastasis ของมะเร็งเป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง ซึ่งกระบวนการ metastasis ประกอบด้วย cell-cell attachment, tissue barrier degradation, migration, invasion, cell-matrix adhesion และ angiogenesis โดยจากการศึกษาพบว่าสาร phenolic compound ประเภทที่สำคัญคือ สาร flavonoid จากการศึกษาพบว่าสาร flavonoid เป็น natural inhibitor ของ invasion และ metastasis ของมะเร็ง ได้แก่ luteolin, apigenin, myricetin, tangeretin, kaempferol, glycitein, licoricidin, daidzein และ naringenin (94)

สาร phenolic compound มีคุณสมบัติในการป้องกัน oxidative damage และการอักเสบ ในโรคที่เกิดจาก age-related neurodegenerative เช่น Alzheimer's Disease (AD) ได้ จากการศึกษาพบว่า curcumin มีความสามารถออกฤทธิ์ antioxidant และ anti-inflammatory ซึ่งช่วยป้องกัน neurotoxic และ genotoxic agent ซึ่งจะช่วยป้องกัน neuropathology ได้ (97)

การศึกษารูทีด้านการอักเสบของ dietary phenolic compound ในโรคที่เกี่ยวข้องกับ chronic intestinal inflammation ซึ่งมีพยาธิสภาพเกิดจากการ dysfunction ของ intestinal mucosa เช่น การลดลงของ tight junction barrier function และการ overproduction ของ pro-inflammatory mediator ได้แก่ cytokine, chemokine และ adhesion molecule ซึ่งเกี่ยวข้องกับ immune dysregulation พบว่าสาร phenolic compound สามารถ downregulate inflammatory response โดยผ่านทางกระบวนการ post-transcriptional regulatory ได้ (98)

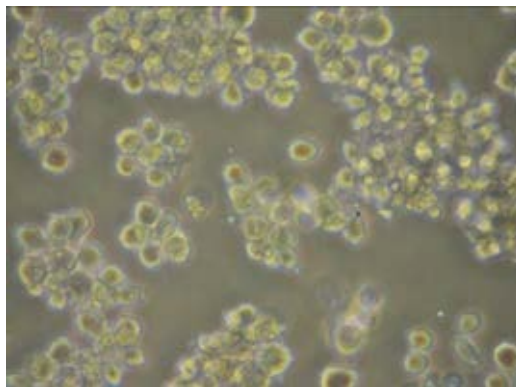
### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

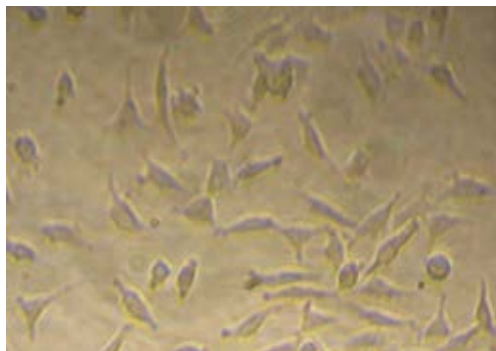
1. เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบ มี 2 ชนิด คือ

1.1 เซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ของมนุษย์ U937 (ภาพที่ 18)



ภาพที่18 แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ของมนุษย์ U937 (100x)

1.2 เซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลของหนู bEnd.3 (ภาพที่ 19)



ภาพที่19 แสดงลักษณะของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลของหนู bEnd.3 (100x)

2. สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

สมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดสอบ คือ หญ้าแฉ่ำน้ำ *Fimbristylis ovata* (Burm.f.) Kern ซึ่งเพาะปลูกที่บ้านของรองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ กรุงเทพมหานคร และทำการยืนยันพันธุ์พืชโดยพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย voucher specimen เลขที่ 013431BCU

## เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20 °C freezer	Sanyo, ญี่ปุ่น
-80°C deep freezer	ilshin Lab, เนเธอร์แลนด์
4°C refrigerator	Sanyo, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
24 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
96 well plate high binding	Corning, สหรัฐอเมริกา
96 well plate medium binding	Corning, สหรัฐอเมริกา
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autoclave	Hirayama, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 µl	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autopipette 2-20 µl	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autopipette 10-100 µl	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autopipette 101-1000 µl	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Beaker (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Cell culture flask (25 cm <sup>3</sup> )	Corning, สหรัฐอเมริกา
Cell culture flask (75 cm <sup>3</sup> )	Corning, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Beckman Coulter, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา

CO <sub>2</sub> incubator	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Corning, สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette (5, 10 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	Biorad, สหรัฐอเมริกา
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Evaporator	Genevac, สหรัฐอเมริกา
Flask (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Freeze dryer	Thermo Electron, สหรัฐอเมริกา
Gel Doc system	Syngene, สหราชอาณาจักร
Glass bottles (500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Incubator shaker	INFORS HT, สวิตเซอร์แลนด์
Inverted microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow	Labconco, สหรัฐอเมริกา
Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้
Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
Microtube 1.5 ml	Hycon, สหรัฐอเมริกา
Multichannel pipette 20-200 µl	Gilson, ฝรั่งเศส

pH meter	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Plate shaker	Desaga, เยอรมนี
Rotary evaporator	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Serological pipette (1, 5, 10, 25 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Sterile syringes filter	Corning, สหรัฐอเมริกา
Tip (10, 20µl)	Sorenson, สหรัฐอเมริกา
Tip (100, 200 µl)	Gilson, ฝรั่งเศส
Tip (1000 µl)	Hycon, สหรัฐอเมริกา
Volumetric flask (100, 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	FinePCR, เกาหลีใต้
Waterbath	Memmert, เยอรมนี

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Agarose gel	Research Organics, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	PAA Laboratories, ออสเตรเลีย
DEPC	Bio Basic, แคนาดา
dNTP	Fermentus, แคนาดา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO) molecular grade	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Di-sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Bio Basic, แคนาดา
DNA Ladder	Fermentus, แคนาดา

DNase enzyme	Promega, สหรัฐอเมริกา
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Ethyl alcohol	Merck, เยอรมนี
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Human IL-1 $\beta$ ELISA kit	R&D Diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Human IL-6 ELISA kit	R&D Diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Human TNF- $\alpha$ ELISA kit	R&D Diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Methyl alcohol	Merck, เยอรมนี
Mouse ICAM-1 DuoSet ELISA kit	R&D Diagnostic, สหรัฐอเมริกา
Mouse VCAM-1 DuoSet ELISA kit	R&D Diagnostic, สหรัฐอเมริกา
3-(4,5-dimethyl-triazolyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)	Bio Basic, แคนาดา
Oligo dT(17) primer	Bio Basic, แคนาดา
Penicillin-Streptomycin	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Phosphate buffered saline(10X)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride (KCl)	Bio Basic, แคนาดา
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Bio Basic, แคนาดา
Roswell Park Memorial Institute medium-1640	



(RPMI-1640)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Reverse transcriptase Improm-II™	Promega, สหรัฐอเมริกา
Ribonuclease Inhibitor	Fermentus, แคนาดา
Sodium chloride (NaCl)	Bio Basic, แคนาดา
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, เยอรมนี
Sodium nitrite (NaNO <sub>2</sub> )	Merck, เยอรมนี
Specific primer	Bio Basic, แคนาดา
Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, เยอรมนี
<i>Taq</i> DNA Polymerase, recombinant	Fermentus, แคนาดา
TRIZOL® Reagent	Favorgen Biotech Corp, ไต้หวัน
Trypan blue	The British Drug Houses, อังกฤษ
Trypsin	JR Scientific, สหรัฐอเมริกา
Tween20	Bio Basic, แคนาดา

## วิธีการวิจัย

### 1. การเตรียมสารสกัดหญ้าแฉ่ำ

1.1 นำหญ้าแฉ่ำน้ำหนัก 3 กิโลกรัม ล้างให้สะอาด ตัดให้สั้นและนำไปอบใน laboratory drying oven ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5 วัน โดยหมั่นกลับให้หญ้าแฉ่ำแห้งอย่างสม่ำเสมอ เมื่อหญ้าแฉ่ำแห้งดีแล้ว บดให้เป็นผงเพื่อจะนำไปสกัดต่อไป (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ลักษณะหญ้าแฉ่ำแห้งเมื่อนำไปอบและหลังจากบดเป็นผง

1.2 สกัดหญ้าแฉ่ำด้วยน้ำที่อัตราส่วน 1:10 โดยนำหญ้าแฉ่ำแห้งจำนวน 100 กรัมต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง และกรองส่วนสารละลาย (ภาพที่ 21) นำไประเหิดแห้ง (lyophilization) และเก็บรักษาที่ -20 °C จนกว่าจะทำการทดลอง



ภาพที่ 21 ลักษณะหญ้าแฉ่ำที่สกัดด้วยน้ำ

1.3 สกัดหญ้าแฉ่ำด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราส่วน 1:10 โดยนำหญ้าแฉ่ำแห้งจำนวน 50 กรัมแช่ในเอทานอล 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเขย่านาน 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยเติมเอทานอล 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเขย่านาน 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C นำสารสกัดใหม่รวมกับสารสกัดที่เก็บไว้มา

กรอง (ภาพที่ 22) แล้วนำไประเหยแห้งโดยใช้ Rotary evaporator เก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะทำการทดลอง

1.4 สกัดหญ้าแห้งด้วยเมทานอล 95% ที่อัตราส่วน 1:10 โดยนำหญ้าแห้งจำนวน 50 กรัมแช่ในเมทานอล 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเขย่านาน 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  และสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยเติมเมทานอล 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเขย่านาน 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นำสารสกัดใหม่รวมกับสารสกัดที่เก็บไว้มากรอง แล้วนำไประเหยแห้งโดยใช้ Rotary evaporator เก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะทำการทดลอง



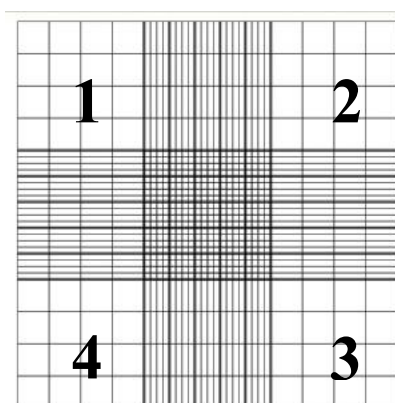
ภาพที่ 22 ลักษณะหญ้าแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล

## 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล

2.1 เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ (U937) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 ที่เสริมด้วย fetal bovine serum (FBS) 10 % และ Penicillin-Streptomycin 1% (Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ก่อนทำการทดลอง ทำการเปลี่ยนแปลงเซลล์เป็น macrophage ด้วย phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 10 ng/ml (99)

2.2 เลี้ยงเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล (bEnd.3) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เสริมด้วย fetal bovine serum (FBS) 10 % และ Penicillin-Streptomycin 1% (Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

2.3 การนับจำนวนเซลล์ ย้อมสีเซลล์ด้วยสี Trypan blue โดยเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่า คือ ใช้สี Trypan blue ปริมาตร 90  $\mu$ l ต่อเซลล์ปริมาตร 10  $\mu$ l และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที นับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer ในการนับเซลล์ จะนับเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะไม่ติดสี และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งจะติดสีน้ำเงิน นับในช่องนับเม็ดเลือดขาว 1, 2, 3 และ 4 ดังรูป แล้วทำการคำนวณเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรวม โดยจะต้องมีเซลล์รอดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถนำมาใช้ทำการทดสอบได้



ภาพที่ 23 แสดงตารางช่องของ hemocytometer ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ (100) ทำการคำนวณเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{dilution factor}}{\text{จำนวนช่องที่นับ} \times \text{ปริมาตรพื้นที่ที่ใช้นับ}}$$

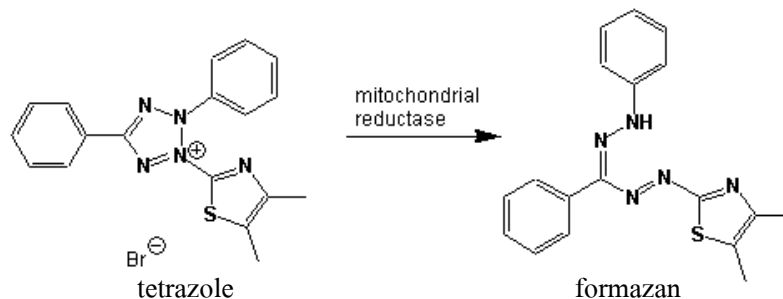
### 3. การเตรียมสารสกัดหญ้าแฉ่ม้า

นำสารสกัดหญ้าแฉ่ม้าแห้ง 100 มิลลิกรัม ละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ stock solution สารสกัดหญ้าแฉ่ม้าที่มีความเข้มข้น 100 mg/ml และเมื่อทำการทดสอบจึงเจือจาง stock solution ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.19  $\mu$ g/ml

### 4. การทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ม้าต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ของเซลล์ U937 และ bEnd.3

ทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ม้าต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ U937 และ bEnd.3 โดยใช้หลักการของ MTT assay (ภาพที่ 24) คือ เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต จะสามารถรีดิวซ์ 3-(4,5-dimethyl-triazolyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ให้กลายเป็นตะกอน formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งทำให้ละลายด้วยตัว

ทำละลาย เช่น dimethylsulfoxide (DMSO) แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 500-600 นาโนเมตร (101, 102)



ภาพที่ 24 หลักการของ MTT assay คือการรีดิวซ์ MTT ไปเป็น formazan

4.1 นับจำนวนเซลล์ แล้วใส่เซลล์ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200  $\mu$ l

4.2 เลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 เติมสารสกัดหญ้าแห้งที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19  $\mu\text{g/ml}$  เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4 เติมสาร MTT 0.5  $\text{mg/ml}$  เลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4.5 นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทิ้ง และละลายตะกอน formazan โดยเติม dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 200  $\mu$ l และนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25  $^{\circ}\text{C}$

4.6 ดูดส่วนใสปริมาตร 100  $\mu$ l ใส่ใน 96 well plate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA plate reader โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์จากสูตร

$$\% \text{ cell viability} = [(\text{absorbance of treatment group} - \text{blank}) \times 100 / (\text{absorbance of control group} - \text{blank})]$$

## 5. การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการหลั่งไซโตไคน์

5.1 นับจำนวนเซลล์ แล้วใส่เซลล์ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24-well plate) โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 500,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1,000  $\mu$ l

5.2 เปลี่ยนแปลงเซลล์เป็น macrophage โดยเติม phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 10 ng/ml เลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3 เติมสารสกัดหญ้าแห้งที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 µg/ml แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

5.4 เติม lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้น 1 µg/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.5 เก็บ supernatant โดยปั่น supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,200 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C และเก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะทำการทดสอบ

## 6. วัดการหลั่ง TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ และ IL-6 ด้วยวิธี ELISA

การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA เป็นการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์โดยอาศัยหลักการของ antigen-antibody โดย coat บริเวณก้นหลุมของ plate ด้วย capture antibody และจึงเติม supernatant เพื่อให้ antibody จับกับ antigen ซึ่งก็คือ ไซโตไคน์ที่อยู่ใน supernatant แล้วจึงเติม antibody อีกตัวหนึ่ง คือ detection antibody ที่มีการติดฉลากด้วย biotin เพื่อให้จับกับ ไซโตไคน์ที่ต้องการวัดปริมาณ แล้วจึงเติม Streptavidin ที่ conjugated กับ horseradish peroxidase (HRP) เพื่อให้ Streptavidin จับกับ Biotin และจึงเติม substrate เพื่อให้ horseradish peroxidase ทำปฏิกิริยาและเกิดสีขึ้น และจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยด้วยเครื่อง ELISA plate reader

การวัดการหลั่ง Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ Interleukin-6 (IL-6) ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

6.1 ทำการ coat plate ด้วย capture antibody ใน 96 well plate และ incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน ล้างด้วย wash buffer 400 µl 3 ครั้ง

6.2 เติม supernatant ปริมาตร 100 µl และ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างด้วย wash buffer 400 µl 3 ครั้ง

6.3 ใส่ detection antibody ปริมาตร 100 µl และ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างด้วย wash buffer 400 µl 3 ครั้ง

6.4 ใส่ Streptavidin-HRP working dilution ปริมาตร 100  $\mu$ l และ incubate โดย shake เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยป้องกันแสงด้วย เมื่อครบเวลาล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 400  $\mu$ l 3 ครั้ง

6.5 ใส่ substrate ปริมาตร 100  $\mu$ l และ incubate โดย shake เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยป้องกันแสงด้วย เมื่อครบเวลาใส่ stop solution ปริมาตร 50  $\mu$ l

6.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และ 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA plate reader

## 7. การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการแสดงออกของยีน

7.1 นับจำนวนเซลล์ และใส่เซลล์ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม (6-well plate) โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 1,000,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2,000  $\mu$ l

7.2 เปลี่ยนแปลงเซลล์เป็น macrophage โดยเติม phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 10 ng/ml เลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3 เติมนสารสกัดหญ้าแห้งที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19  $\mu$ g/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

7.4 เติม lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้น 1  $\mu$ g/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 8. การสกัด RNA จากเซลล์

การสกัด RNA จากเซลล์ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

8.1 ล้างเซลล์ด้วย PBS (phosphate buffered saline) ใส่ Tri-RNA reagent 1,000  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยดูด reagent ขึ้น-ลง แล้วดูดย้ายไปใส่ micro-centrifuge tube และเติม chloroform ปริมาตร 200  $\mu$ l

8.2 นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ดูดส่วนใสชั้นบนสุดย้ายไปใส่ micro-centrifuge tube และเติม isopropanol ปริมาตร 400  $\mu$ l

8.3 นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เติมน้ำทั้งหมดออก ระวังไม่ให้ตะกอนสีขาวหลุดออกจากก้นหลอด และเติม 75% ethanol ใน DEPC treated water 1,000 µl

8.4 นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เติมน้ำทั้งหมดออก ระวังไม่ให้ตะกอนสีขาวหลุดออกจากก้นหลอด และตากตะกอนไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

8.5 นำไปเข้าเครื่อง speed vaccum เป็นเวลา 3 นาที แล้วละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC-treated water และนำไปเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง Nanodrop

## 9. ขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยวิธี Reverse transcription

9.1 เจือจางปริมาณ RNA ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ng/ml ด้วย DEPC-treated water

9.2 ทำลาย DNA ที่ปะปนมาด้วยด้วยเอ็นไซม์ Dnase โดยผสม RNA 8 µl ที่เจือจางแล้ว กับ เอ็นไซม์ Dnase 1 µl และ Dnase buffer 1 µl

9.3 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาใส่ Stop solution 1 µl และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

9.4 ผสม master mix สำหรับขั้นตอน Reverse transcription ดังตาราง และนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 1 ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน Reverse transcription

Master mix ต่อ 1 Reaction	ปริมาตร (µl)
5x buffer	4
MgCl <sub>2</sub>	1.2
dNTP	1
oligodT	1
Ribolock	0.5
Reverse transcriptase	1
DEPC-treated water	1.3
RNA-treated Dnase	10



### 10. ขั้นตอน PCR amplification สำหรับยีน $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, RAGE (103)

ผสม master mix สำหรับขั้นตอน PCR amplification และนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR amplification ของยีน  $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 และ RAGE ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน PCR amplification

Master mix ต่อ 4 Reaction	ยีน $\beta$ -actin	ยีน TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, RAGE
10x Taq buffer	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
dNTP	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Forward primer	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Reverse primer	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Taq polymerase	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l
DMSO	3 $\mu$ l	5 $\mu$ l
DW	65.5 $\mu$ l	55 $\mu$ l
Template cDNA	3 $\mu$ l	5 $\mu$ l

ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 656 pb ของยีน  $\beta$ -actin  
การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้

$\beta$ -actin Forward Primer 5' ACGGGTCACCACTGTGC 3'

$\beta$ -actin reverse Primer 5' CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATG 3'

ตารางที่ 3 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน  $\beta$ -actin

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	58 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	45 วินาที
ทำ PCR amplification ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 25 รอบ		
5. Post extension	72 °C	15 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้

ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 181 pb ของยีน TNF- $\alpha$   
การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้

TNF- $\alpha$  Forward Primer 5' TCTCGAACCCCGAGTGACAA 3'

TNF- $\alpha$  Reverse Primer 5' TGAAGAGGACCTGGGAGTAG 3'

ตารางที่ 4 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน TNF- $\alpha$

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	55 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	15 วินาที
ทำ PCR amplification ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Post extension	72 °C	5 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้

ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 252 pb ของยีน IL-6  
การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้

IL-6 Forward Primer 5' ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC 3'

IL-6 Reverse Primer 5' GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG 3'

ตารางที่ 5 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน IL-6

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	50 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
ทำ PCR amplification ขั้นตอน 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Post extension	72 °C	5 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้

**ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 823 pb ของยีน IL-1 $\beta$**

การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้

IL-1  $\beta$  Forward Primer 5' AGCCATGGCAGAAGTACCT 3'

IL-1  $\beta$  Reverse Primer 5' CAGCTCTCTTTAGGAAGACAC 3'

ตารางที่ 6 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน IL-1  $\beta$

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	50 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
PCR amplification ขั้นตอน 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Post extension	72 °C	5 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้

### ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 383 pb ของยีน RAGE

การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้

RAGE Forward Primer 5' GTGGGGACATGTGTGTCAGAGGGAA 3'

RAGE Reverse Primer 5' TGAGGAGAGGGCTGGGCAGGGACT 3'

ตารางที่ 7 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน RAGE

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	65 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
PCR amplification ขั้นตอน 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Post extension	72 °C	5 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้

### 11. การกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการหลั่ง cell adhesion molecule

11.1 นับจำนวนเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล bEnd.3 และใส่เซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24-well plate) โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 500,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1,000  $\mu$ l

11.2 เลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

11.3 เติมสารสกัดหญ้าแห้งที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19  $\mu$ g/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

11.4 เติม lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้น 1  $\mu$ g/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

11.5 เก็บ supernatant โดยปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,200 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C และเก็บ supernatant ไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลอง

## 12. การวัดการหลั่งของ cell adhesion molecule ด้วยวิธี ELISA

การตรวจวัดปริมาณ cell adhesion molecule ด้วยวิธี ELISA เป็นการตรวจวัดปริมาณ cell adhesion molecule โดยอาศัยหลักการของ antigen-antibody โดย coat บริเวณก้นหลุมของ plate ด้วย capture antibody และจึงเติม supernatant เพื่อให้ antibody จับกับ antigen ซึ่งก็คือ cell adhesion molecule ที่อยู่ใน supernatant แล้วจึงเติม antibody อีกตัวหนึ่ง คือ detection antibody ที่มีการติดฉลากด้วย Biotin เพื่อให้จับกับ cell adhesion molecule ที่ต้องการวัดปริมาณ แล้วจึงเติม Streptavidin ที่ conjugated กับ horseradish peroxidase (HRP) เพื่อให้ Streptavidin จับกับ Biotin และจึงเติม substrate เพื่อให้ horseradish peroxidase ทำปฏิกิริยาและเกิดสีขึ้น แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยด้วยเครื่อง ELISA plate reader การวัดการหลั่ง mouse VCAM-1, mouse ICAM-1 ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

12.1 ทำการ coat plate ด้วย capture antibody ใน 96 well plate และ incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน ล้างด้วย wash buffer 400  $\mu$ l 3 ครั้ง

12.2 เติม supernatant ปริมาตร 100  $\mu$ l และ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างด้วย wash buffer 400  $\mu$ l 3 ครั้ง

12.3 ใส่ detection antibody ปริมาตร 100  $\mu$ l และ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างด้วย wash buffer 400  $\mu$ l 3 ครั้ง

12.4 ใส่ Streptavidin-HRP working dilution ปริมาตร 100  $\mu$ l และ incubate โดย shaking incubator เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยป้องกันแสงด้วย เมื่อครบเวลาล้างด้วย wash buffer 400  $\mu$ l 3 ครั้ง

12.5 ใส่ substrate ปริมาตร 100  $\mu$ l และ incubate โดย shake เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยป้องกันแสงด้วย เมื่อครบเวลาใส่ stop solution ปริมาตร 50  $\mu$ l

12.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และ 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA plate reader

## 13. การกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการแสดงออกของยีน

13.1 นับจำนวนเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล แล้วใส่เซลล์ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม (6-well plate) โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 1,000,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 2,000  $\mu$ l

13.2 เลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

13.3 เติมสารสกัดหญ้าแห้งที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19  $\mu\text{g/ml}$  เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

13.4 เติม lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยง  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 14. สกัด RNA จากเซลล์

การสกัด RNA จากเซลล์ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

14.1 ล้างเซลล์ด้วย PBS (phosphate buffered saline) ใส่ Tri-RNA reagent 1,000  $\mu\text{l}$  และผสมให้เข้ากัน โดยดูด reagent ขึ้น-ลง แล้วดูดย้ายไปใส่ micro-centrifuge tube และเติม chloroform ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$

14.2 นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  ดูดส่วนใสชั้นบนสุดย้ายไปใส่ micro-centrifuge tube และเติม isopropanol ปริมาตร 400  $\mu\text{l}$

14.3 นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เทน้ำทั้งหมดออก ระวังไม่ให้ตะกอนสีขาวหลุดออกจากก้นหลอด และเติม 75% ethanol ใน DEPC-treated water 1,000  $\mu\text{l}$

14.4 นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เทน้ำทั้งหมดออก ระวังไม่ให้ตะกอนสีขาวหลุดออกจากก้นหลอด และตากตะกอนไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

14.5 นำไปเข้าเครื่อง speed vacum เป็นเวลา 3 นาที แล้วละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC treated water และนำไปเข้าตู้บเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ  $65^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ โดยวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง Nanodrop

#### 15. ขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยวิธี Reverse transcription

15.1 เจือจางปริมาณ RNA ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ng/ml ด้วย DEPC-treated water

15.2 ทำลาย DNA ที่ปะปนมาด้วยด้วยเอนไซม์ Dnase โดยผสม RNA 8  $\mu\text{l}$  ที่เจือจางแล้ว กับ เอนไซม์ Dnase 1  $\mu\text{l}$  และ Dnase buffer 1  $\mu\text{l}$

15.3 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาใส่ Stop solution 1 µl และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

15.4 ผสม master mix สำหรับขั้นตอน Reverse transcription ดังตาราง และนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 8 ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน Reverse transcription

Master mix ต่อ 1 Reaction	ปริมาตร (µl)
5x buffer	4
MgCl <sub>2</sub>	1.2
dNTP	1
oligo dT	1
Ribolock	0.5
Reverse transcriptase	1
DEPC-treated water	1.3
RNA-treated Dnase	10

#### 16. ขั้นตอน PCR amplification สำหรับยีน ICAM-1 และ VCAM-1

ผสม master mix สำหรับขั้นตอน PCR amplification และนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler ตาม protocol สำหรับยีน ICAM-1 และ VCAM-1 ดังตาราง

ตารางที่ 9 ส่วนผสม master mix สำหรับขั้นตอน PCR amplification

Master mix ต่อ 4 Reaction	ปริมาตร(µl)
10x Taq buffer	10
MgCl <sub>2</sub>	6
dNTP	2
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
Taq polymerase	1
DMSO	5
DW	55
Template cDNA	5

### ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 931 pb ของยีน ICAM-1

การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้ (104)

ICAM Forward primer 5' TGTGGCACCGTGCAGTCGTC 3'

ICAM Reverse primer 5' CCGTCTCGTCCAGCCGAGGA 3'

ตารางที่ 10 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน ICAM-1

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	55 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
ทำ PCR amplification ขั้นตอน 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Post extension	72 °C	5 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้

### ขั้นตอนการทำ PCR amplification และได้ PCR product ขนาด 333 pb ของยีน VCAM-1

การทำ PCR amplification ใช้ specific primer ดังนี้ (105)

VCAM Forward primer 5' AGGCACAGCTGCAGGATGCC 3'

VCAM Reverse primer 5' GGAGGGGGCGGGGCTGTAAT 3'

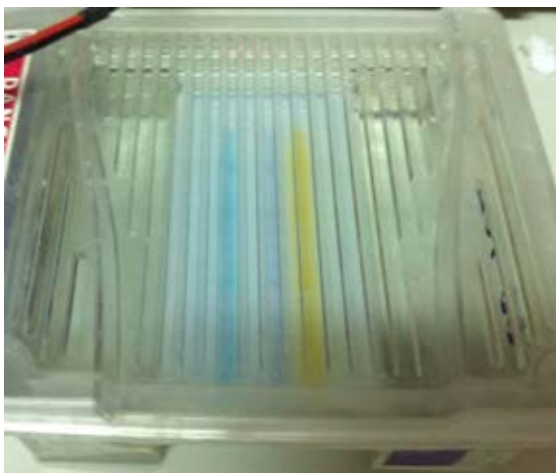
ตารางที่ 11 ขั้นตอน PCR amplification ของยีน VCAM-1

	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denature	95 °C	5 นาที
2. Denature	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	59 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
ทำ PCR amplification ขั้นตอน 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Post extension	72 °C	5 นาที
6. Hold	4 °C	จนกว่าจะใช้



### 17. การวัดความเข้มของแถบ DNA (PCR product)

นำ PCR product จากขั้นตอน PCR amplification ไป run gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ใช้ TAE buffer และ run โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 volt เป็นเวลานาน 30 นาที

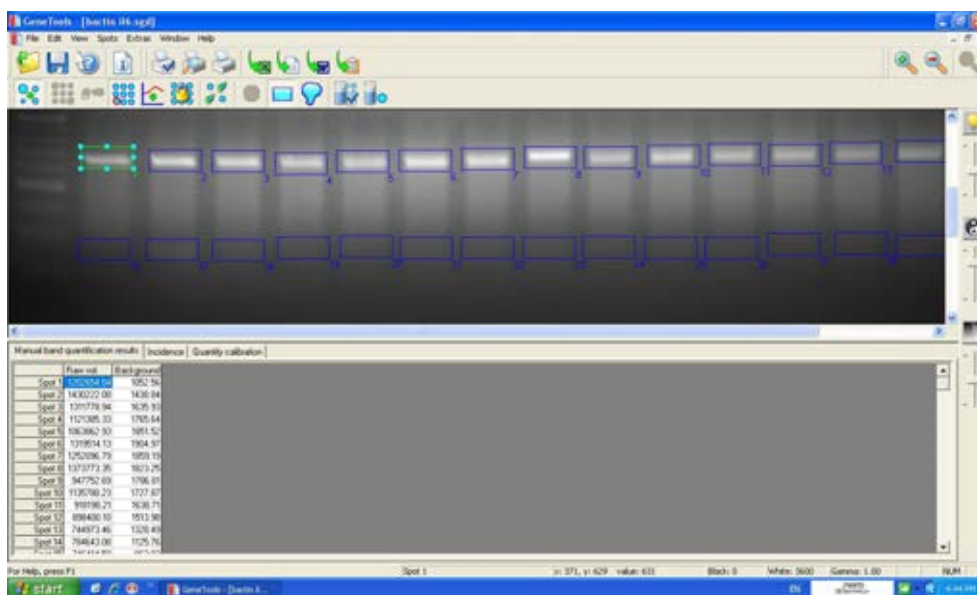


ภาพที่ 25 การ run gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel

การถ่ายภาพ agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation System รุ่น SynGene โดยใช้โปรแกรม Gene tool วัดความเข้มของแถบ DNA บน agarose gel และวัดการแสดงผลของยีนที่สนใจศึกษา โดยคำนวณจากความเข้มของแถบ DNA จากยีนที่สนใจศึกษาเปรียบเทียบกับยีน  $\beta$ -actin



ภาพที่ 26 โปรแกรมถ่ายภาพ agarose gel หลังจากทำ gel electrophoresis



ภาพที่ 27 โปรแกรม Gene tool ที่ใช้วัดความเข้มของแถบ DNA

## 18. การวิเคราะห์ข้อมูล

18.1 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อ % cell viability ของเซลล์ U937 และ bEnd.3 โดยวิธี MTT assay จะแสดงผล % cell viability เป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SEM) ของการทำการทดลอง 3 ครั้ง

18.2 ผลการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SEM) ของการทำการทดลอง 3 ครั้ง และทำการทดสอบทางสถิติ โดยคำนวณหาความแตกต่างระหว่างค่าไซโตไคน์ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับค่าระดับไซโตไคน์ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหญ้าแห้งและถูกกระตุ้น โดยใช้สถิติ one way ANOVA และ post hoc Tukey test

## บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

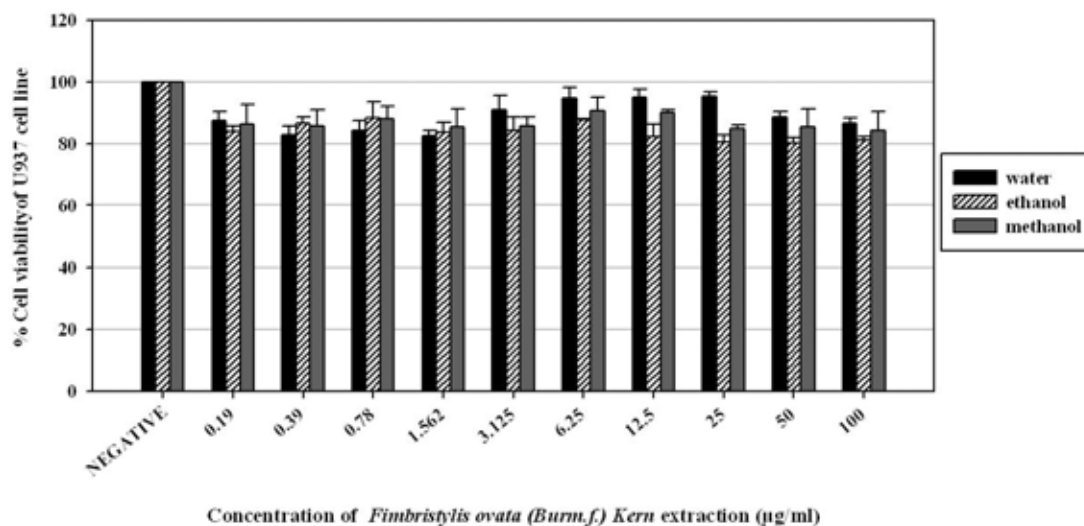
### ผลการวิเคราะห์

#### 1. ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ โดยใช้หลักการ MTT assay เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำ ซึ่งสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ โดยมีช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.19 – 100 µg/ml พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 80% ดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 28

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ U937

ความเข้มข้น	% cell viability ของเซลล์ U937 (mean ± SEM)		
	สารสกัดหญ้าแฉ่ำด้วยน้ำ	สารสกัดหญ้าแฉ่ำด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแฉ่ำด้วยเมทานอล
NEGATIVE	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
0.19 µg/ml	87.36±2.93	84.05±1.60	86.29±6.32
0.39 µg/ml	82.84±2.91	86.38±2.31	85.64±5.11
0.78 µg/ml	84.28±3.13	88.33±5.08	87.99±4.08
1.562 µg/ml	82.56±1.79	83.70±3.14	85.33±6.00
3.125 µg/ml	90.77±4.74	84.19±4.50	85.54±3.16
6.25 µg/ml	94.60±3.59	87.58±0.39	90.53±4.33
12.5 µg/ml	94.91±2.79	82.02±4.21	89.88±1.00
25 µg/ml	95.25±1.54	80.33±2.48	84.82±1.08
50 µg/ml	88.43±2.00	80.17±1.60	85.47±5.58
100 µg/ml	86.42±1.93	80.92±1.15	84.34±6.08



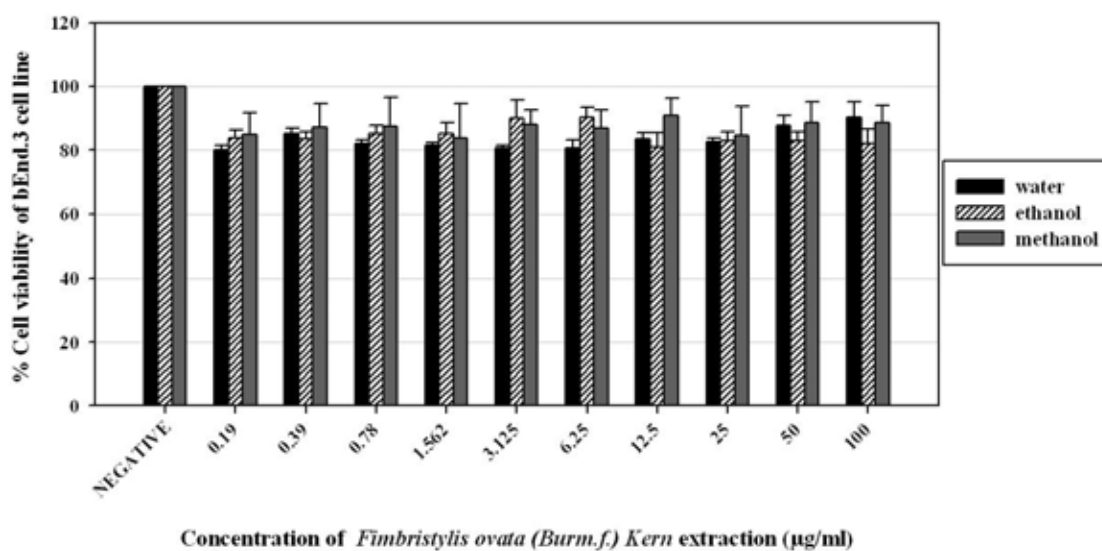
ภาพที่ 28 ผลของสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาต่อการมีชีวิตของเซลล์ U937

## 2. ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล โดยใช้หลักการ MTT assay พบว่า เมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำมา ซึ่งสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ โดยมีช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.19 – 100 µg/ml ได้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80% ดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 29

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ bEnd.3

ความเข้มข้น	% cell viability ของเซลล์ bEnd.3 (mean± SEM)		
	สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาด้วยน้ำ	สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาด้วยเมทานอล
NEGATIVE	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
0.19 µg/ml	80.21±1.39	83.83±2.48	84.81±7.07
0.39 µg/ml	85.24±1.60	83.42±2.48	87.36±7.17
0.78 µg/ml	82.04±1.28	85.23±2.61	87.42±9.13
1.562 µg/ml	81.53±0.85	85.32±3.39	83.90±10.62
3.125 µg/ml	80.79±0.73	90.00±5.79	88.21±4.38
6.25 µg/ml	80.82±2.28	90.36±2.99	86.88±5.66
12.5 µg/ml	83.52±1.95	81.05±4.36	90.87±5.38
25 µg/ml	82.77±0.98	82.90±3.03	84.69±9.04
50 µg/ml	87.67±3.30	83.05±2.65	88.73±6.38
100 µg/ml	90.31±5.03	81.99±4.68	88.66±5.32



ภาพที่ 29 ผลของสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาต่อการมีชีวิตของเซลล์ bEnd.3

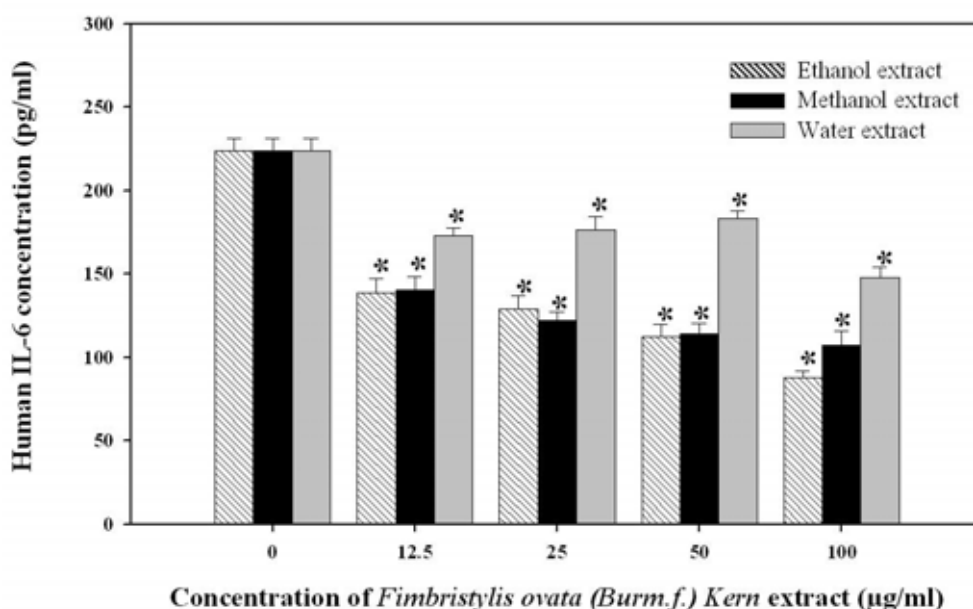
### 3. ผลการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการหลั่งไซโตไคน์

3.1 จากการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อผลการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-6 (IL-6) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ โดยใช้หลักการ ELISA พบว่าเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้ง ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml ได้ผลการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-6 ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 เมื่อเซลล์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมา ความเข้มข้นต่างๆ

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean± SEM
NEGATIVE	218.22	215.72	238.06	224±7.07
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 12.5 µg/ml	123.03	153.43	139.91	138.79±8.79
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 25 µg/ml	115.43	127.53	143.23	128.73±8.05
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 50 µg/ml	100.90	110.35	126.19	112.48±7.38
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 100 µg/ml	85.87	81.04	95.70	87.54±4.31
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 12.5 µg/ml	139.48	126.82	155.09	140.47±8.18
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 25 µg/ml	119.07	114.33	132.59	122±5.47
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 50 µg/ml	105.78	109.88	126.47	114.04±6.32
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 100 µg/ml	92.91	106.15	122.31	107.12±8.5
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 12.5 µg/ml	163.50	180.92	173.75	172.72±5.06
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 25 µg/ml	176.83	190.14	163.16	176.71±7.79
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 50 µg/ml	181.55	191.73	175.95	183.08±4.62
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 100 µg/ml	145.68	159.27	137.90	147.62±6.24

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml สามารถลดการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-6 (IL-6) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแฉ่ำ และยังพบว่าสารสกัดหญ้าแฉ่ำที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล สามารถลดการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-6 (IL-6) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ได้ดีกว่าสารสกัดหญ้าแฉ่ำที่ถูกสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 30



ภาพที่ 30 การหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำความเข้มข้นต่างๆ

\* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

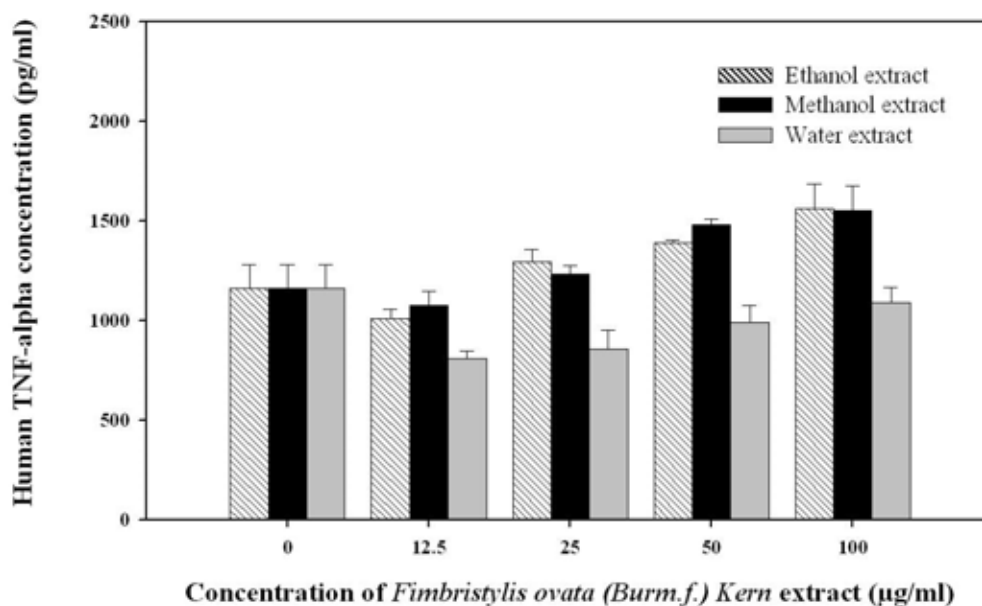
3.2 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 โดยใช้หลักการ ELISA เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำ ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml ได้ผลการหลั่งไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  เมื่อเซลล์ U937ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้า  
แฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean $\pm$ SEM
NEGATIVE	1030.21	1057.31	1394.68	1160.73 $\pm$ 117.24
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเอทานอล 12.5 $\mu$ g/ml	929.42	1097.92	997.04	1008.13 $\pm$ 48.96
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเอทานอล 25 $\mu$ g/ml	1236.86	1414.65	1235.00	1295.50 $\pm$ 59.58
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเอทานอล 50 $\mu$ g/ml	1365.77	1395.05	1412.65	1391.15 $\pm$ 13.67
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเอทานอล 100 $\mu$ g/ml	1729.74	1637.99	1311.69	1559.81 $\pm$ 126.86
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 12.5 $\mu$ g/ml	1182.50	1101.52	946.61	1076.88 $\pm$ 69.20
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 25 $\mu$ g/ml	1314.87	1172.84	1203.79	1230.50 $\pm$ 43.12
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 50 $\mu$ g/ml	1521.81	1487.14	1425.33	1478.09 $\pm$ 28.22
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 100 $\mu$ g/ml	1734.98	1606.03	1319.33	1553.44 $\pm$ 122.84
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 12.5 $\mu$ g/ml	772.46	888.93	761.08	807.49 $\pm$ 40.85
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 25 $\mu$ g/ml	681.91	877.45	1007.39	855.58 $\pm$ 94.60
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 50 $\mu$ g/ml	808.86	1083.55	1067.52	986.64 $\pm$ 89.02
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 100 $\mu$ g/ml	957.93	1226.70	1075.44	1086.69 $\pm$ 77.79

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำ ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu$ g/ml พบว่าการหลั่งไซโตไคน์ Tumor Necrosis Factor alpha จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแฉ่ำ ดังแสดงในภาพที่ 31





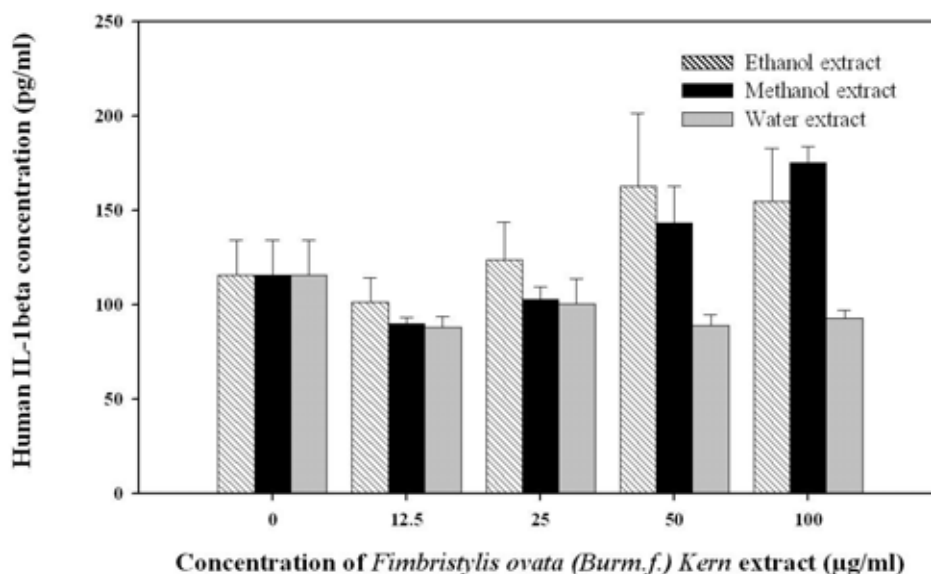
ภาพที่ 31 การหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

3.3 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาต่อผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 โดยใช้หลักการ ELISA เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำมา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml ได้ผลการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการวัดการหลั่งไซโตไคน์ IL-1 $\beta$  เมื่อเซลล์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้า  
แฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean $\pm$ SEM
NEGATIVE	90.46	152.45	103.36	115.42 $\pm$ 18.89
สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาจากเอทานอล 12.5 $\mu$ g/ml	84.88	91.83	126.90	101.20 $\pm$ 13.00
สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาจากเอทานอล 25 $\mu$ g/ml	90.46	122.27	159.03	123.92 $\pm$ 19.81
สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาจากเอทานอล 50 $\mu$ g/ml	105.90	146.77	235.85	162.84 $\pm$ 38.37
สารสกัดหญ้าแฉ่ำมาจากเอทานอล 100 $\mu$ g/ml	121.83	131.57	210.25	154.55 $\pm$ 27.99
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 12.5 $\mu$ g/ml	85.05	88.92	96.23	90.07 $\pm$ 3.28
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 25 $\mu$ g/ml	94.03	97.33	116.35	102.57 $\pm$ 6.95
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 50 $\mu$ g/ml	115.49	134.63	180.08	143.40 $\pm$ 19.16
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากเมทานอล 100 $\mu$ g/ml	164.31	169.40	191.95	175.22 $\pm$ 8.49
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 12.5 $\mu$ g/ml	97.11	78.06	89.13	88.10 $\pm$ 5.52
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 25 $\mu$ g/ml	108.33	73.94	118.69	100.32 $\pm$ 13.53
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 50 $\mu$ g/ml	95.74	78.06	92.97	88.92 $\pm$ 5.49
สารสกัดหญ้าแฉ่ำจากน้ำ 100 $\mu$ g/ml	97.45	83.30	96.81	92.52 $\pm$ 4.62

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำ ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu$ g/ml พบว่าการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแฉ่ำ ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 การหลังไซโตไคน์ IL-1 $\beta$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉี่มาความเข้มข้นต่างๆ

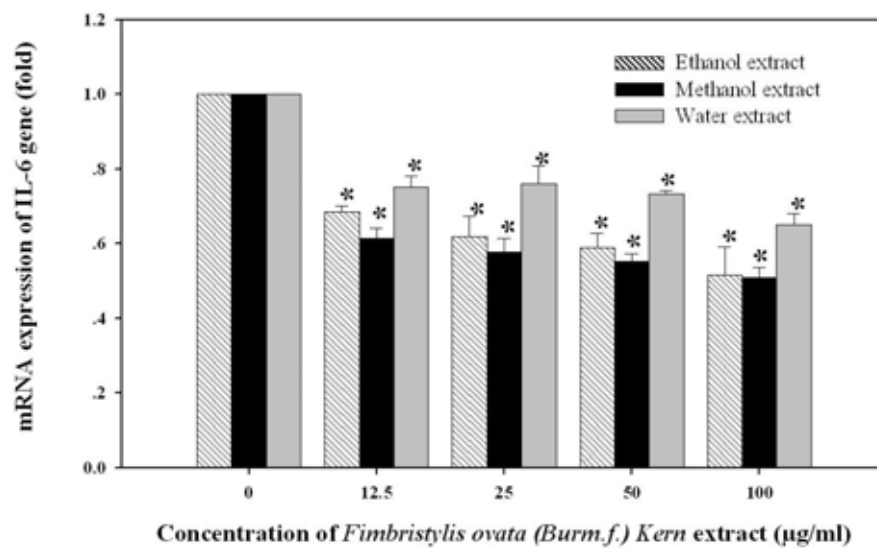
#### 4. ผลการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์

4.1 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉี่มาต่อผลการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ Interleukin-6(IL-6) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 โดยใช้หลักการ RT-PCR เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉี่มา ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml ได้ผลการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6(IL-6) เปรียบเทียบกับยีน House keeping คือ  $\beta$ -actin ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6(IL-6) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉี่มาความเข้มข้นต่างๆ

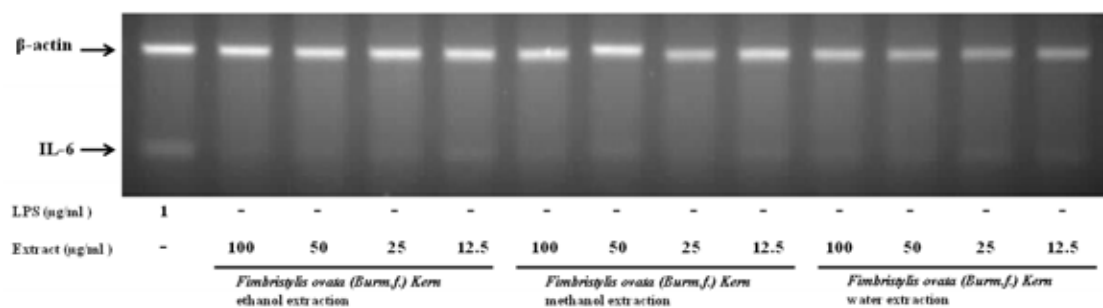
ความเข้มข้น	การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 (mean $\pm$ SEM)		
	สารสกัดหญ้าแฉี่มาด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแฉี่มาด้วยเมทานอล	สารสกัดหญ้าแฉี่มาด้วยน้ำ
NEGATIVE	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
12.5 µg/ml	0.68 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.03
25 µg/ml	0.62 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.04	0.76 $\pm$ 0.05
50 µg/ml	0.59 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.01
100 µg/ml	0.52 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.03

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหญ้าแห้งม้า ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml สามารถลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 (IL-6) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแห้งม้า และยังพบว่าสารสกัดหญ้าแห้งม้าที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล สามารถลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 (IL-6) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ได้ดีกว่าสารสกัดหญ้าแห้งม้าที่ถูกสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 33 และ 34



ภาพที่ 33 กราฟการแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งม้าความเข้มข้นต่างๆ

\* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS



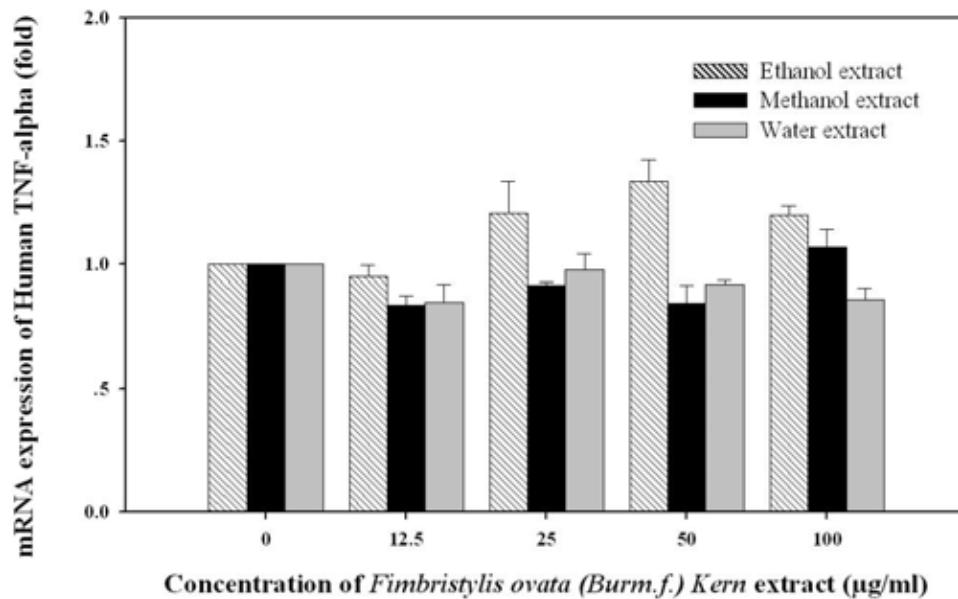
ภาพที่ 34 การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งม้าความเข้มข้นต่างๆ

4.2 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อผลการวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 โดยใช้หลักการ RT-PCR เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำที่ระดับความเข้มข้น 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  ได้ผลการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) เปรียบเทียบกับ house keeping gene คือ  $\beta$ -actin ดังแสดงในตารางที่ 18

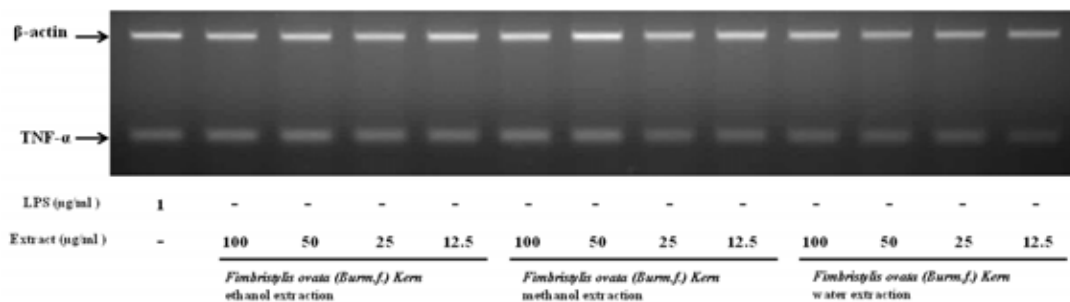
ตารางที่ 18 ผลการวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น	การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ (mean $\pm$ SEM)		
	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเมทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยน้ำ
NEGATIVE	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
12.5 $\mu\text{g/ml}$	0.95 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.04	0.85 $\pm$ 0.07
25 $\mu\text{g/ml}$	1.21 $\pm$ 0.13	0.92 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.06
50 $\mu\text{g/ml}$	1.33 $\pm$ 0.09	0.84 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.01
100 $\mu\text{g/ml}$	1.20 $\pm$ 0.04	1.07 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.05

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมา ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแห้งมา ดังแสดงในภาพที่ 35



ภาพที่ 35 กราฟการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ใน เซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์



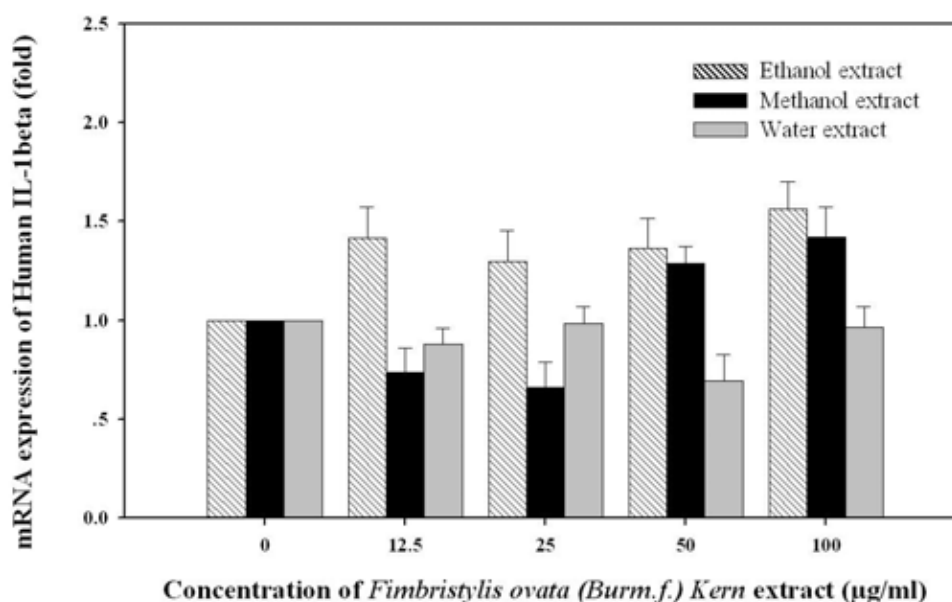
ภาพที่ 36 การแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแส้มาความเข้มข้นต่างๆ

4.3 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแส้มาต่อผลการวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 โดยใช้หลักการ RT-PCR เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแส้มา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำที่ระดับความเข้มข้น 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  ได้ผลการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) เปรียบเทียบกับ house keeping gene คือ  $\beta$ -actin ดังตารางที่ 19

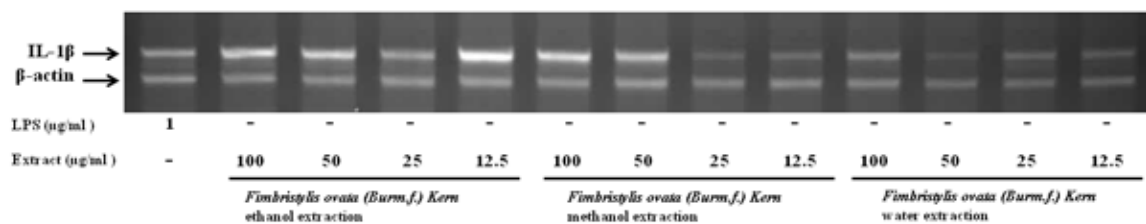
ตารางที่ 19 การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-1 $\beta$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น	การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ (mean $\pm$ SEM)		
	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเมทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยน้ำ
NEGATIVE	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
12.5 $\mu$ g/ml	1.41 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.12	0.88 $\pm$ 0.08
25 $\mu$ g/ml	1.29 $\pm$ 0.16	0.66 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.09
50 $\mu$ g/ml	1.36 $\pm$ 0.15	1.28 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.14
100 $\mu$ g/ml	1.56 $\pm$ 0.14	1.42 $\pm$ 0.15	0.96 $\pm$ 0.11

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมา ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu$ g/ml พบว่าการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแห้งมา ดังแสดงในภาพที่ 37 และ 38



ภาพที่ 37 กราฟการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 38 การแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ

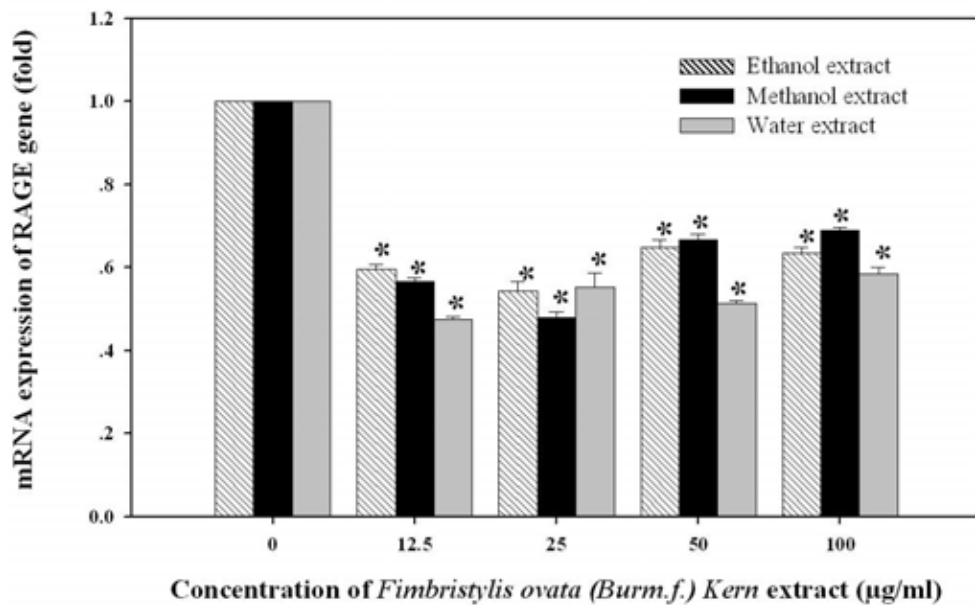
4.4 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อผลการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 โดยใช้หลักการ RT-PCR เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำที่ระดับความเข้มข้น 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  ได้ผลการแสดงออกของยีน RAGE เปรียบเทียบกับ house keeping gene คือ  $\beta$ -actin ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น	การแสดงออกของยีน RAGE (mean $\pm$ S.E.M.)		
	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเมทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยน้ำ
NEGATIVE	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
12.5 $\mu\text{g/ml}$	0.60 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01
25 $\mu\text{g/ml}$	0.54 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.04
50 $\mu\text{g/ml}$	0.65 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.01
100 $\mu\text{g/ml}$	0.64 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.02

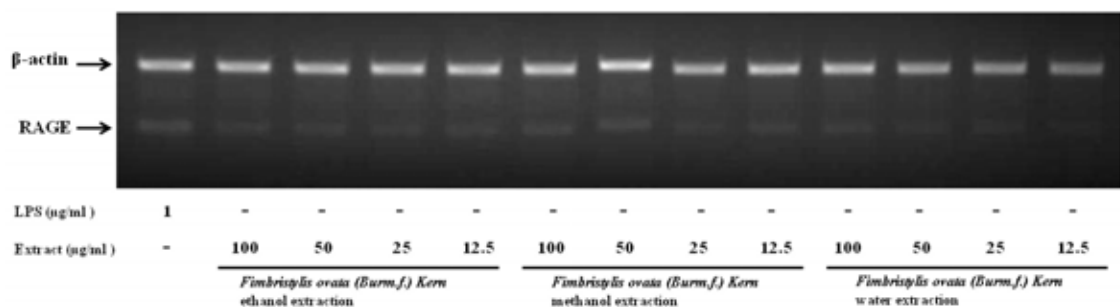
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหญ้าแห้งมา ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน RAGE จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแห้งมา (ภาพที่ 39)





ภาพที่ 39 กราฟการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

\* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p \leq 0.05$  เมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS



ภาพที่ 40 การแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

## 5. ผลการกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการหลัง cell adhesion molecule

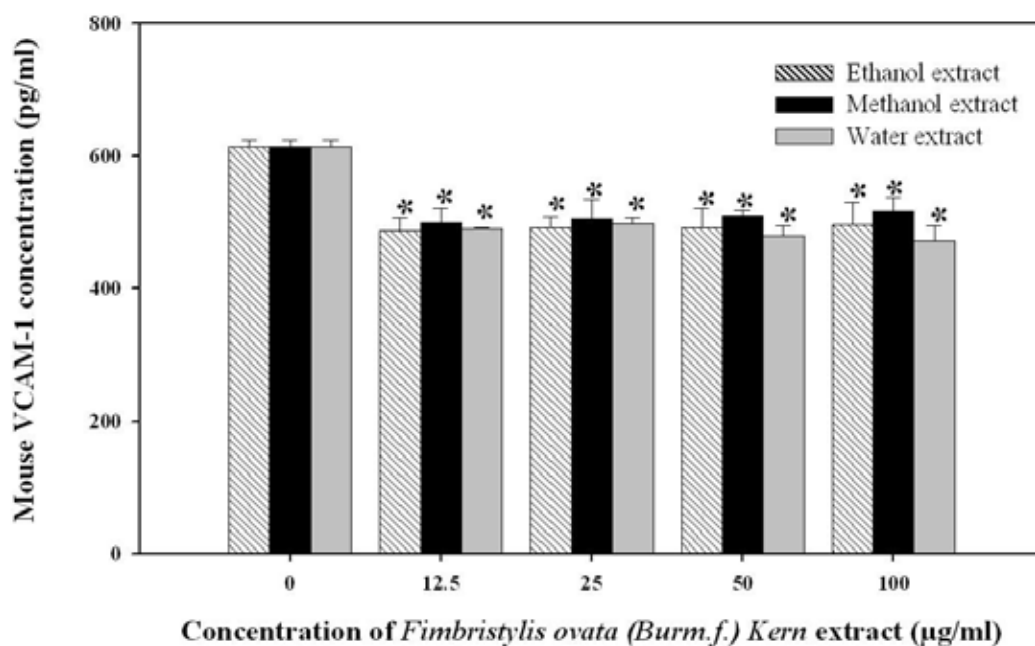
5.1 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำต่อผลการวัดการหลัง vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลโดยใช้หลักการ

ELISA เมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้ง ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml ได้ผลการหลัง vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 การหลัง VCAM-1เมื่อทดสอบเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลด้วยสารสกัดหญ้าแห้งความเข้มข้นต่างๆ

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean± SEM
NEGATIVE	605.16	599.58	636.11	613.62±11.36
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 12.5 µg/ml	524.11	481.76	453.49	486.45±20.52
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 25 µg/ml	502.03	514.62	458.87	491.84±16.88
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 50 µg/ml	493.85	540.40	440.58	491.61±28.84
สารสกัดหญ้าแห้งจากเอทานอล 100 µg/ml	428.40	533.17	527.67	496.41±34.05
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 12.5 µg/ml	493.03	540.40	464.03	499.16±22.26
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 25 µg/ml	560.92	471.50	486.30	506.24±27.68
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 50 µg/ml	499.58	506.39	524.16	510.04±7.33
สารสกัดหญ้าแห้งจากเมทานอล 100 µg/ml	492.22	500.22	557.62	516.69±20.60
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 12.5 µg/ml	485.67	493.04	491.97	490.23±2.30
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 25 µg/ml	484.04	495.09	513.85	497.66±8.70
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 50 µg/ml	471.77	459.27	509.24	480.09±15.02
สารสกัดหญ้าแห้งจากน้ำ 100 µg/ml	452.95	443.98	518.45	471.80±23.47

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหญ้าแห้งด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml สามารถลดการหลัง vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) จากเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแห้ง (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 การหลั่ง VCAM-1 เมื่อทดสอบเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลด้วยสารสกัดหญ้าแส้มาความเข้มข้นต่างๆ

\* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p \leq 0.05$  เมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

5.2 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแส้มาต่อผลการวัดการหลั่ง intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1) ของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS และถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแส้มา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml โดยใช้หลักการ ELISA

พบว่าเมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS ไม่มีการหลั่งการหลั่ง intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) ทั้งในหลุมที่เซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS และถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแส้มา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ เมื่อทดสอบโดยใช้หลักการ ELISA

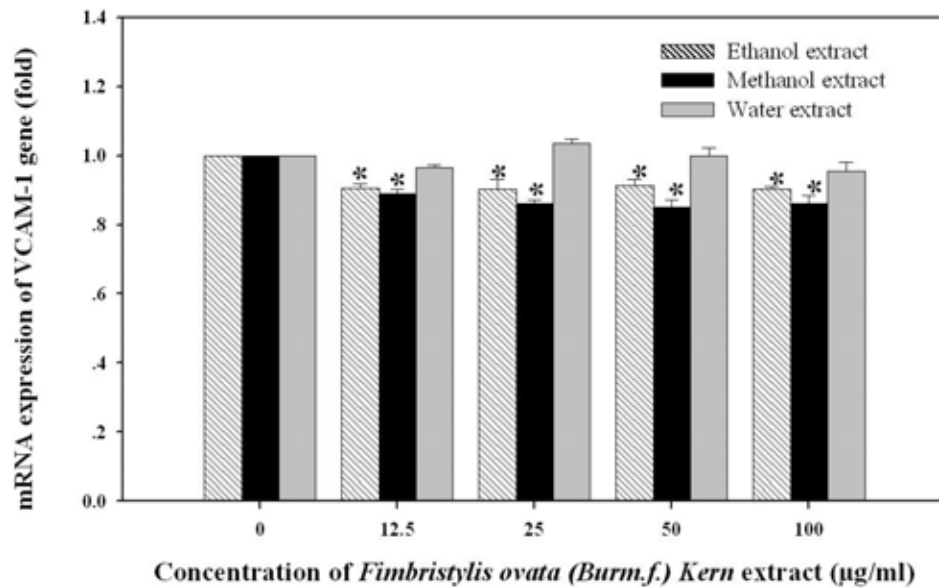
## 6. ผลการกระตุ้นเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลเพื่อวัดการแสดงออกของยีน cell adhesion molecule

6.1 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาต่อผลการวัดการแสดงออกของยีน vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล โดยใช้หลักการ RT-PCR เมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้ง ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำที่ระดับความเข้มข้น 12.5 – 100 µg/ml ได้ผลการแสดงออกของยีน vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การแสดงออกของ VCAM-1 ในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นต่างๆ

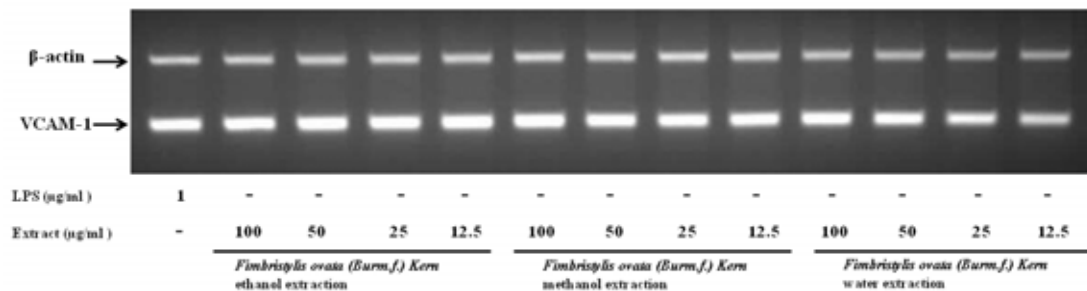
ความเข้มข้น	การแสดงออกของยีน VCAM-1 (mean± S.E.M.)		
	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเอทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเมทานอล	สารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยน้ำ
NEGATIVE	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
12.5 µg/ml	0.91±0.01	0.89±0.01	0.97±0.01
25 µg/ml	0.90±0.03	0.86±0.01	1.04±0.01
50 µg/ml	0.91±0.02	0.85±0.02	1.00±0.02
100 µg/ml	0.90±0.01	0.86±0.02	0.95±0.03

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหญ้าแห้งมาด้วยเอทานอล เมทานอล ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml สามารถลดการแสดงออกของยีน vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) จากเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัดหญ้าแห้งมา (ภาพที่ 42 และ 43)



ภาพที่ 42 กราฟการแสดงออกของยีน VCAM-1 ในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

\* มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS



ภาพที่ 43 การแสดงออกของยีน VCAM-1 ในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำมาความเข้มข้นต่างๆ

6.2 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าไต้มาต่อผลการวัดการแสดงออกของยีน intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1) ของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล โดยใช้หลักการ RT-PCR เมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS และถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าไต้มา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml

พบว่าเมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS ไม่มีแสดงออกของยีน intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) ทั้งในหลุมที่เซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS และถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าไต้มา ซึ่งถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ เมื่อทดสอบโดยใช้หลักการ RT-PCR

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การอักเสบเรื้อรังเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรค chronic degenerative diseases ต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งในปัจจุบันมีการคิดค้นและพัฒนาการรักษาโรคที่มีสาเหตุจากการอักเสบเรื้อรัง อย่างกว้างขวาง การรักษาทางเลือกหนึ่งคือการใช้สมุนไพรไทยในการรักษาโรค หญ้าแฉ่ำม้า หรือ flatspike sedge มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Fimbristylis ovata* (Burm.f.) Kern พบว่าสามารถใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น การอักเสบของ lymph node การติดเชื้อ scrofula ใช้รักษาโรค syphilis รักษาอาการไอ และโรคหลอดเลือดอักเสบ รวมทั้งใช้รักษาโรคหอบหืดได้ (30, 31) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับหญ้าแฉ่ำม้ามาก่อน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดจากหญ้าแฉ่ำม้า โดยทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ของมนุษย์ และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลของหนู

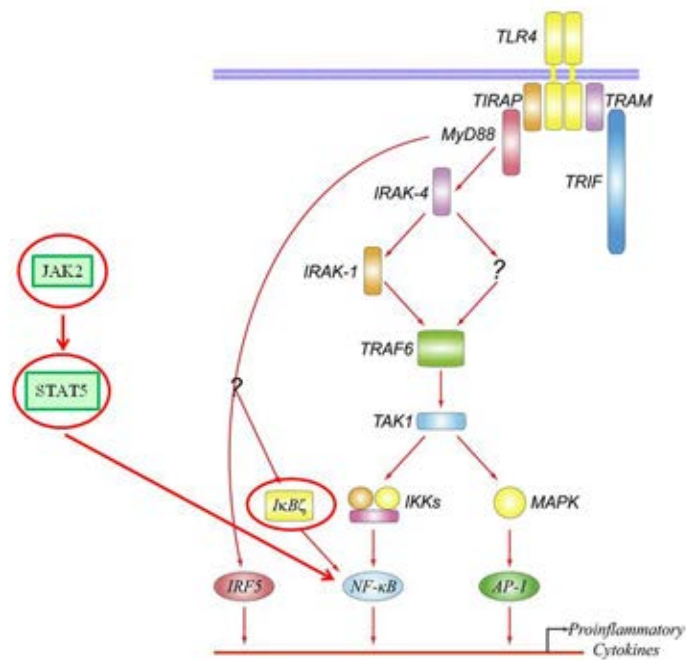
ผู้วิจัยได้ทำการสกัดหญ้าแฉ่ำม้าด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหญ้าแฉ่ำม้าต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อนำสารสกัดหญ้าแฉ่ำม้าที่ถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.19 - 100 µg/ml มาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล พบว่าทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลมีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่ามากกว่า 80%

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแฉ่ำม้ากับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อทำให้เกิดการอักเสบ และวัดการหลั่งไซโตไคน์โดยวิธี ELISA พบว่าสารสกัดหญ้าแฉ่ำม้าที่ถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 - 100 µg/ml สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-6 และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR พบว่า สารสกัดหญ้าแฉ่ำม้าที่ถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 12.5 - 100 µg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 เช่นเดียวกัน แต่สารสกัดหญ้าแฉ่ำม้าที่ถูกสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำไม่ยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์และการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF-

$\alpha$ ) และ Interleukin- $1\beta$  ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหญ้าแห้งที่ถูกลดด้วยเอทานอลและเมทานอล สามารถลดการหลั่งไซโตไคน์และการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 (IL-6) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ได้ดีกว่าสารสกัดหญ้าแห้งที่ถูกลดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นเท่ากัน จากข้อมูลนี้ทำให้ทราบว่าสารสกัดหญ้าแห้งจะมีประสิทธิภาพในการลดการหลั่งไซโตไคน์ได้ดีนั้นควรจะถูกลดด้วยตัวทำละลาย เช่น เอทานอลและเมทานอล จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่าการสกัดหญ้าแห้งด้วยน้ำ

จากงานวิจัยของ Kimura และคณะที่ทดสอบยับยั้งกระบวนการอักเสบที่ถูกระตุ้นจาก lipopolysaccharide (LPS) พบว่าการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-6 จะผ่านทาง Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling คือ Jak2 และ Stat5 ซึ่งเมื่อเกิดการกระตุ้นโดย LPS จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง Jak2 และทำให้ Stat5 ถูก recruit ไปที่ Toll-like receptor 4 (TLR4) และ stat5 เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะทำงานร่วมกับ NF- $\kappa$ B p50 subunit เพื่อไปจับกับบริเวณ promoter ของยีน Interleukin-6 และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน Interleukin-6 ขึ้น (34) และจากงานวิจัยของ Lu และคณะ (33) พบว่าการกระตุ้นตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR4) ด้วย lipopolysaccharide (LPS) ผ่านกระบวนการ MyD88-dependent และมี I- $\kappa$ B zeta ( $\text{IKB}\zeta$ ) ทำหน้าที่ร่วมกับ NF- $\kappa$ B p50 subunit ใน promoter region ของยีน IL-6 ในการผลิตไซโตไคน์ IL-6 (ภาพที่ 44) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดหญ้าแห้งที่ยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 อาจออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-6 โดยผ่านทาง Janus kinase 2 (JAK 2) หรือผ่านทาง signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) หรือผ่านทาง I- $\kappa$ B zeta ( $\text{IKB}\zeta$ ) ซึ่งจำเป็นในการทำงานร่วมกับ NF- $\kappa$ B p50 subunit





ภาพที่ 44 กระบวนการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-6 (33)

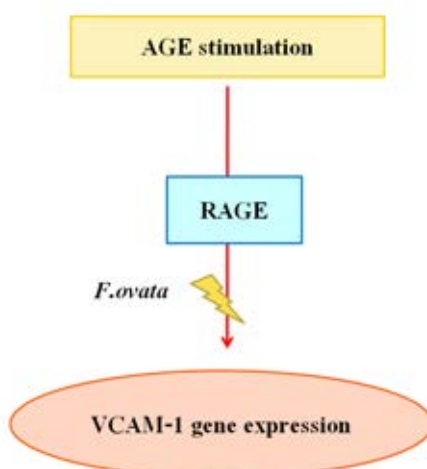
Hoareau และคณะ และ Bruggen และคณะ ได้ทำการศึกษา signaling pathway ที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide พบว่าจะส่งผลต่อการผลิตไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  โดยเมื่อเกิดการกระตุ้นโดย lipopolysaccharide จะส่งสัญญาณผ่านทาง nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) และ activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ได้แก่ ERK1 and ERK2, c-Jun N-terminal kinase และ p38 ส่งสัญญาณให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ขึ้น (106, 107) รวมทั้ง Jeon และคณะ (108) พบว่า บริเวณ promoter ของยีน IL-1 $\beta$  จะประกอบด้วย regulatory element ต่างๆ ได้แก่ NF- $\kappa$ B, AP-1 และ CREB/ATF ซึ่งจะทำงานเมื่อมีการกระตุ้นโดย lipopolysaccharide และจะส่งผลต่อการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-1 $\beta$  (ภาพที่ 45) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในครั้งนี้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดของหญ้าแฉ่มไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ในกลไกเกี่ยวข้องกับ nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) หรือ MAPKs ได้ รวมทั้งสารสกัดของหญ้าแฉ่มไม่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างไซโตไคน์ Interleukin-1 ในกลไกเกี่ยวกับ NF- $\kappa$ B หรือ AP-1 หรือ CREB/ATF ได้



ภาพที่ 45 กระบวนการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งม้ากับเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อทำให้เกิดการอักเสบและวัดการแสดงออกของยีน RAGE ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสารสกัดจากหญ้าแห้งม้าความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดการแสดงออกของยีน RAGE ได้ จากการศึกษาของ Lin และคณะ พบว่าการกระตุ้นตัวรับของ advanced glycation end products หรือ RAGE นั้นจะนำไปสู่การส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการ ทำงานของ intracellular pathway ได้แก่ PI3-kinase/AKT, MAPKs และ NF- $\kappa\text{B}$  (12) จากผลการทดสอบของผู้วิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดหญ้าแห้งม้าสามารถยับยั้งการแสดงออกของ RAGE ซึ่งอาจจะส่งผลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ pathway ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ PI 3-kinase/AKT หรือ MAPKs หรือ NF- $\kappa\text{B}$  ได้

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งม้าความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100  $\mu\text{g/ml}$  กับเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เพื่อวัดการหลั่งของ VCAM-1 และการแสดงออกของยีน VCAM-1 ด้วยวิธี ELISA และ RT-PCR พบว่าสารสกัดจากหญ้าแห้งม้า สามารถลดการหลั่งและการแสดงออกของยีน VCAM-1 ของเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลได้ จากงานวิจัยของ Ishibashi และงานวิจัยของ Kwon พบว่าการกระตุ้นการแสดงออกของ RAGE ส่งผลให้กระตุ้นการแสดงออกของยีนของ VCAM-1 ในเซลล์เอนโดทีเลียล (23, 24) จากผลการวิจัยครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดหญ้าแห้งม้าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและการสร้าง vascular cell adhesion molecule-1 โดยผ่านทางกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน RAGE (ภาพที่ 46)

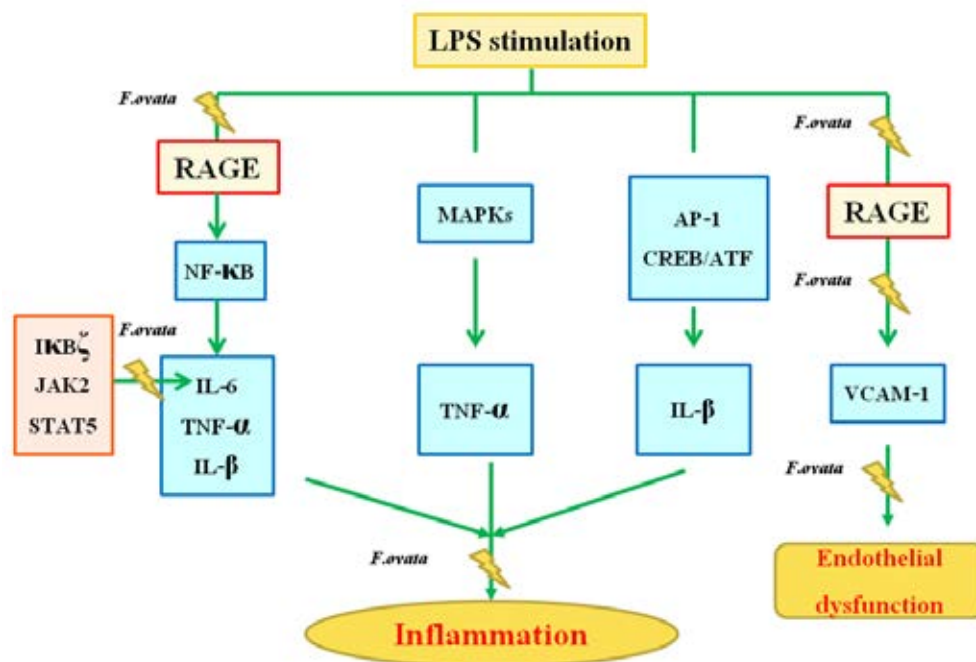


ภาพที่ 46 กระบวนการกระตุ้นการผลิต VCAM-1

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าแห้งมาความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 100 µg/ml กับ เซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียล เพื่อวัดการหลั่งของ intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) และการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี ELISA และ RT-PCR พบว่าเมื่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS ไม่มีการหลั่งและการแสดงออกของยีน ICAM-1 ทั้งในเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย LPS และเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหญ้าแห้งมา ซึ่งจากการศึกษางานวิจัยของ Sikorski และคณะ ได้เปรียบเทียบการกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ bEnd.3 ด้วย recombinant murine TNF- $\alpha$  สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 ได้ โดยมีการแสดงออกของ ICAM-1 สูงกว่าเมื่อกระตุ้น ด้วย lipopolysaccharide (109) แต่การวิจัยในครั้งนี้ใช้ lipopolysaccharide ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml จึงอาจมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 ในเซลล์ bEnd.3

จากผลการวิจัยในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดหญ้าแห้งมาสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ Interleukin-6 อาจออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ Interleukin-6 โดยผ่านทาง Janus kinase 2 (JAK 2) หรือผ่านทาง signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) หรือผ่านทาง I-KappaB zeta (IKB $\zeta$ ) ซึ่งจำเป็นในการทำงานร่วมกับ NF-KB p50 subunit แต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ในกลไกเกี่ยวข้องกับ nuclear factor-KB (NF-KB) หรือ MAPKs ได้ รวมทั้งสารสกัดของหญ้าแห้งมาไม่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างไซโตไคน์ Interleukin-1 ในกลไกเกี่ยวกับ NF-KB หรือ AP-1 หรือ

CREB/ATF ได้ และนอกเหนือจากนั้นสารสกัดเห็ดน้ำผึ้งสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและการสร้าง vascular cell adhesion molecule-1 โดยผ่านทางกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน RAGE ได้ (ภาพที่ 47) จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเห็ดน้ำผึ้งสามารถยับยั้งพยาธิสภาพจากการอักเสบและยับยั้งการทำหน้าที่ที่ผิดปกติไปของเซลล์เอนโดทีเลียลได้



ภาพที่ 47 กลไกที่เป็นไปได้ของการออกฤทธิ์ของเห็ดน้ำผึ้งในการยับยั้งการอักเสบและการยับยั้งการทำหน้าที่ที่ผิดปกติไปของเซลล์เอนโดทีเลียล

### ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าเห็ดน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านที่สามารถพบได้ในประเทศไทย มีแนวโน้มสามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคที่มีสาเหตุจากการอักเสบเรื้อรัง โดยสารสกัดเห็ดน้ำผึ้งสามารถลดการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-6 รวมทั้ง cell adhesion molecule เช่น VCAM-1 และยับยั้งการแสดงออกของยีน RAGE ซึ่งข้อมูลนี้เป็นความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับฤทธิ์ของเห็ดน้ำผึ้งในกลไกการกระตุ้นผ่านทาง RAGE เพิ่มเติมได้ นอกจากนี้ อาจจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารเคมีต่างๆ ในสารสกัดเห็ดน้ำผึ้งที่ออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและต้านการออกซิเดชัน เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

## รายการอ้างอิง

- [1] Rhew EY, Ramsey-Goldman R. Premature atherosclerotic disease in systemic lupus erythematosus--role of inflammatory mechanisms. Autoimmunity reviews 5 (2006): 101-5.
- [2] Suh CH, Chun HY, Ye YM, Park HS. Unresponsiveness of C-reactive protein in the non-infectious inflammation of systemic lupus erythematosus is associated with interleukin 6. Clinical Immunology 119 (2006): 291-6.
- [3] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. New England Journal of Medicine 340 (1999): 115.
- [4] Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. Atherosclerosis Supplements 6 (2005): 21-9.
- [5] Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. The international journal of biochemistry & cell biology 36 (2004): 372-8.
- [6] Davis MC, Zautra AJ, Younger J, Motivala SJ, Attrep J, Irwin MR. Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: implications for fatigue. Brain, behavior, and immunity 22 (2008): 24-32.
- [7] I A.M. van der Oever, H G. Raterman, M T. Nurmohamed, S Simsek. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. Mediators of Inflammation (2010) : 1-15.
- [8] King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. Journal of periodontology 79 (2008): 1527-34.
- [9] Pradhan A. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. Nutrition reviews 65 (2007): S152-S6.
- [10] Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Ann N Y Acad Sci 1126 (2008): 76-80.
- [11] Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. J Mol Med (Berl) 87 (2009): 235-47.

- [12] Lin L, Park S, Lakatta EG. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. Front Biosci 14 (2009): 1403-13.
- [13] Tawara K, Oxford JT, Jorcyk CL. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. Cancer Manag Res 3 (2011): 177-89.
- [14] Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, Dragnev KH, Rigas JR. A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. Expert Opin Biol Ther 11 (2011): 1663-8.
- [15] Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. Cytokine Growth Factor Rev 22 (2011): 83-9.
- [16] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic Targeting of the Interleukin-6 Receptor. Annu Rev Pharmacol Toxicol 52 (2012): 199-219.
- [17] Navarro-Gonzalez JF, Jarque A, Muros M, Mora C, Garcia J. Tumor necrosis factor-alpha as a therapeutic target for diabetic nephropathy. Cytokine Growth Factor Rev 20 (2009): 165-73.
- [18] Kuhad A, Chopra K. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. Life Sci 84 (2009): 296-301.
- [19] Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. Best Pract Res Clin Rheumatol 25 (2011): 549-67.
- [20] Zhu LJ, Yang X, Yu XQ. Anti-TNF-alpha therapies in systemic lupus erythematosus. J Biomed Biotechnol (2010): 1-8.
- [21] Dinarello CA. Blocking interleukin-1beta in acute and chronic autoinflammatory diseases. J Intern Med 269 (2011) : 16-28.
- [22] Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. Nat Med 4 (1998): 1025-31.
- [23] Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of VCAM-1

- mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression. Biochem Biophys Res Commun 391 (2010): 1405-8.
- [24] Kwon HM, Choi YJ, Choi JS, Kang SW, Bae JY, Kang IJ, et al. Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF-kappaB signal disruption. Exp Biol Med (Maywood) 232 (2007): 235-45.
- [25] Tuchinda P, Reutrakul V, Claeson P, Pongprayoon U, Sematong T, Santisuk T, et al. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. Phytochemistry 59 (2002): 169-73.
- [26] Ching AYL, Tang SW, Sukari MA, Lian GEC, Rahmani M, Khalid K. Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.). MJAS 11 (2007): 154-9.
- [27] Priya TT, Sabu MC, Jolly CI. Free radical scavenging and anti-inflammatory properties of *Lagerstroemia speciosa* (L.). Inflammopharmacology 16 (2008): 182-7.
- [28] Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, Ibrahim P. Antioxidant, anti-TB activities, phenolic and amide contents of standardised extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. Nat Prod Res 23 (2009): 238-49.
- [29] Pongnikorn S, Fongmoon D, Kasinrerak W, Limtrakul PN. Effect of bitter melon (*Momordica charantia* Linn) on level and function of natural killer cells in cervical cancer patients with radiotherapy. J Med Assoc Thai 86 (2003): 61-8.
- [30] C.P.Khare. *Indian Medicinal Plants An Illustrated Dictionary*: Springer; 2007.
- [31] Burkill HM, Dalziel JM, Hutchinson J. *The useful plants of West tropical Africa*. Ed. 2. ed. Kew: Royal Botanic Gardens; 1985.
- [32] Larsen GL, Henson PM. Mediators of inflammation. Annual Review of Immunology 1 (1983): 335-59.
- [33] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42 (2008): 145-51.
- [34] Kimura A, Naka T, Muta T, Takeuchi O, Akira S, Kawase I, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating

- JAK-STAT. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (2005): 17089-94.
- [35] Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Res 13 (1985): 6361-73.
- [36] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ 10 (2003): 45-65.
- [37] Hoareau L, Bencharif K, Rondeau P, Murumalla R, Ravanan P, Tallet F, et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes. J Inflamm (Lond) 7 (2010): 1.
- [38] Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. Br J Cancer 102 (2010): 639-44.
- [39] Elgert KD. Immunology Understanding the immune system 2009.
- [40] Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM. Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. Immunopharmacology 48 (2000): 173-83.
- [41] Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. J Clin Invest 121 (2011): 3375-83.
- [42] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J 374 (2003): 1-20.
- [43] Yoshida Y, Maruyama M, Fujita T, Arai N, Hayashi R, Araya J, et al. Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol 276 (1999): L900-8.
- [44] Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ, Adler KB. Effects of TNF-alpha on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. Signaling pathways controlling surface and gene expression. Am J Respir Cell Mol Biol 22 (2000): 685-92.



- [45] Noratto GD, Angel-Morales G, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from acai ( *Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia* ) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. J Agric Food Chem 59 (2011): 7999-8012.
- [46] Foster CA. VCAM-1/alpha 4-integrin adhesion pathway: therapeutic target for allergic inflammatory disorders. J Allergy Clin Immunol 98 (1996): S270-7.
- [47] Cybulsky MI, Iiyama K, Li HM, Zhu SN, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. Journal of Clinical Investigation 107 (2001): 1255-62.
- [48] Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, et al. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 21 (2001): 1662-7.
- [49] Dong AL, Shen JK, Zeng MB, Campochiaro PA. Vascular cell-adhesion molecule-1 plays a central role in the proangiogenic effects of oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (2011): 14614-9.
- [50] Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. Clinical Science 116 (2009): 621-37.
- [51] Schmidt AM, Du Yan S, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. Journal of Clinical Investigation 108 (2001): 949-55.
- [52] Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. J Transl Med 7 (2009): 17.
- [53] Riehl A, Nemeth J, Angel P, Hess J. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. Cell Commun Signal 7 (2009): 12.

- [54] Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. Eur J Pharmacol 636 (2010): 8-17.
- [55] Jiang JM, Wang Z, Li DD. Effects of AGEs on oxidation stress and antioxidation abilities in cultured astrocytes. Biomedical and Environmental Sciences 17 (2004): 79-86.
- [56] Ton ALY, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. Seminars in Nephrology 27 (2007): 130-43.
- [57] Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease - Reply. New England Journal of Medicine 340 (1999): 115-126.
- [58] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. Oncogene 25 (2006): 6680-4.
- [59] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. Nat Rev Mol Cell Biol 8 (2007): 49-62.
- [60] Williams G, Pickup JC. Handbook of diabetes: Wiley-Blackwell; 2004.
- [61] Textbook of Diabetes Mellitus: The Endocrine Society of Thailand 2003.
- [62] Tesch GH, editor. Macrophages and Diabetic Nephropathy: Elsevier.
- [63] Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. Clinica Chimica Acta 297 (2000): 135-44.
- [64] Pradhan AD, Manson JAE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. Jama 286 (2001): 327.
- [65] Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-[alpha] in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. Metabolism 52 (2003): 605-8.
- [66] Navarro JF, Mora-Fernandez C. The role of TNF-[alpha] in diabetic nephropathy: Pathogenic and therapeutic implications. Cytokine & growth factor reviews 17 (2006): 441-50.

- [67] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. TRENDS in Immunology 25 (2004): 4-7.
- [68] Wu CC, Chen JS, Lu KC, Chen CC, Lin SH, Chu P, et al. Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy. Clinica Chimica Acta 411: 700-4.
- [69] Madhumita Jagannathan-Bogdan MEM, Hyunjin Shin, Qasim Rehman, Hatice Hasturk, Caroline M. Apovian, Barbara S. Nikolajczyk. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. The Journal of Immunology 186 (2011): 1186-72.
- [70] Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. Diabetes 57 (2008): 1446.
- [71] Tan ALY, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy Seminars in Nephrology 27(2) 2007: 130-143.
- [72] Vilari o RJEJO, Paragano RAMA. Endothelial Dysfunction in Normal and Abnormal Glucose Metabolism. Adv Cardiol 45 (2008) : 17-43.
- [73] Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. European journal of pharmacology 636: 8-17.
- [74] Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 94 (2009): 3171.
- [75] Ran J, Xiong X, Liu W, Guo S, Li Q, Zhang R, et al. Increased plasma adiponectin closely associates with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy. Diabetes research and clinical practice 88: 177-83.
- [76] Hirano T, Ookubo K, Kashiwazaki K, Tajima H, Yoshino G, Adachi M. Vascular endothelial markers, von Willebrand factor and thrombomodulin index, are specifically elevated in type 2 diabetic patients with nephropathy: comparison of primary renal disease. Clinica Chimica Acta 299 (2000): 65-75.

- [77] Kamiuchi K, Hasegawa G, Obayashi H, Kitamura A, Ishii M, Yano M, et al. Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1 (LECAM-1) polymorphism is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. Journal of Diabetes and its Complications 16 (2002): 333-7.
- [78] Hara T, Ishida T, Cangara HM, Hirata K. Endothelial cell-selective adhesion molecule regulates albuminuria in diabetic nephropathy. Microvascular research 77 (2009): 348-55.
- [79] Kanesaki Y, Suzuki D, Uehara G, Toyoda M, Katoh T, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. American Journal of Kidney Diseases 45 (2005): 288-94.
- [80] Nakagawa T. Uncoupling of VEGF with NO as a mechanism for diabetic nephropathy. Diabetes Research and Clinical Practice 82s (2008): s67-s9.
- [81] Pitchai Balakumar VAC, Pawan Krishan, Manjeet Singh. Vascular endothelial dysfunction: A tug of war in diabetic nephropathy? Biomedicine & Pharmacotherapy 63 (2009): 171-9.
- [82] Elizabeth T. Rosolowsky MAN, Linda H. Ficociello, Bruce A. Perkins, James H. Warram, Andrzej S. Krolewski. Between hyperfiltration and impairment: Demystifying early renal functional changes in diabetic nephropathy. Diabetes Research and Clinical Practice 82s (2008): s46-s53.
- [83] Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice 88: 171-6.
- [84] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. Cell 104 (2001): 503-16.
- [85] Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. Br J Exp Pathol 70 (1989): 737-57.

- [86] Choy EHS, Panayi GS. Mechanisms of disease: Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine 344 (2001): 907-16.
- [87] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annual Review of Immunology 14 (1996): 397-440.
- [88] Rahman AH, Eisenberg RA. The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. Springer Seminars in Immunopathology 28 (2006): 131-43.
- [89] Yamagata K, Miyashita A, Matsufuji H, Chino M. Dietary flavonoid apigenin inhibits high glucose and tumor necrosis factor [alpha]-induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. The Journal of Nutritional Biochemistry 21: 116-24.
- [90] Sookchaloem D. Diversity of Cyperaceae and Gramineae at Phukradueng National Park: Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University.
- [91] Thawatchai Santisuk KL. Flora of Thailand: The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand; 1998.
- [92] Chaulya NC, Haldar PK, Mukherjee A. Sedative Properties of Methanol Extract of Rhizome of *Cyperus Tegetum* Roxb. IJPPR 3 (2010): 40-3.
- [93] Chaulya NC, KANTI HALDAR P, MUKHERJEE A. Antidiarrhoeal activity of methanol extract of the rhizomes of *Cyperus Tegetum* Roxb. Int J Pharm Sci. 3 (2010): 133-5.
- [94] Weng CJ, Yen GC. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. Cancer Metastasis Rev. (2012).
- [95] Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. Gut 56 (2007): 426-35.
- [96] Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. Nutrition reviews 67 (2009): 363-78.
- [97] Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, et al. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A beta-induced cognitive deficits and neuropathology. Neurobiology of Aging 22 (2001): 993-1005.

- [98] Sergent T, Piront N, Meurice J, Toussaint O, Schneider YJ. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. Chemico-Biological Interactions 188 (2010): 659-67.
- [99] Grkovich A, Johnson CA, Buczynski MW, Dennis EA. Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human U937 macrophages is phosphatidic acid phosphohydrolase-1-dependent. Journal of Biological Chemistry 281 (2006): 32978.
- [100] MicrobeHunter Microscopy Magazine [online]. 2012. Available from:<http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/>. [Accessed on April 8, 2012].
- [101] Wang CZ, Zhang Y, Li XD, Hu Y, Fang ZG, Lin DJ, et al. PPAR Agonist Suppresses TLR4 Expression and TNF- Production in LPS Stimulated Monocyte Leukemia Cells. Cell Biochemistry and Biophysics: 1-6.
- [102] Jung YS, Jeong EM, Park EK, Kim YM, Sohn S, Lee SH, et al. Cadmium induces apoptotic cell death through p38 MAPK in brain microvessel endothelial cells. European Journal of Pharmacology 578 (2008): 11-8.
- [103] Jang C, Choi J, Byun M, Jue D. Chloroquine inhibits production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. Rheumatology-London The Oxford-British Society for Rheumatology-45 (2006): 703.
- [104] Seok SM, Park DH, Kim YC, Moon CH, Jung YS, Baik EJ, et al. COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. Toxicology Letters 165 (2006): 212-20.
- [105] Park SL, Kim YM, Ahn JH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, et al. Cadmium stimulates the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and JNK activation in cerebrovascular endothelial cells. Journal of pharmacological sciences 110 (2009): 405-9.

- [106] Hoareau L, Bencharif K, Rondeau P, Murumalla R, Ravanan P, Tallet F, et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes. Journal of Inflammation-London 7 (2010).
- [107] van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. Infect Immun 67 (1999): 3824-9.
- [108] Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM. Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. Immunopharmacology 48 (2000): 173-83.
- [109] Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC. The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. J Immunol 151 (1993): 5239-50.

ภาคผนวก



### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. เตรียม 1x phosphate buffered saline

ชั่งสารเคมีต่างๆ ดังนี้ -	NaCl	8 กรัม
	- KCl	0.2 กรัม
	- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 กรัม
	- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และทำการปรับ pH ให้เป็น 7.4 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

#### 2. เตรียม Wash buffer สำหรับวิธี ELISA

- 1x phosphate buffer saline ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- Tween-20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

#### 3. เตรียม reagent diluents สำหรับวิธี ELISA

- 1x phosphate buffer saline 50 มิลลิลิตร
- Bovine serum albumin (BSA) 0.5 กรัม

#### 4. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

- RPMI-1640 90 มิลลิลิตร
- fetal bovine serum 10 มิลลิลิตร
- 100x Penicillin-Streptomycin 1 มิลลิลิตร

5. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM

- DMEM 90 มิลลิลิตร
- Fetal bovine serum 10 มิลลิลิตร
- 100x Penicillin-Streptomycin 1 มิลลิลิตร

6. เตรียมสารละลาย MTT 0.5 mg/ml

- ingsสาร MTT 5 มิลลิกรัม
- เติมน้ำ phosphate buffered saline ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

และนำไปกรองด้วย sterile syringe filter 0.2  $\mu\text{m}$  และเก็บที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  โดยห้ามถูกแสง

## แบบรายงานผลการพิสูจน์ชนิดของหญ้าแฉ่ำ

แบบขอใช้บริการพิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย  
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 10 / 2559

วันที่ 7 ต.ค. 2553

1. ชื่อผู้ขอใช้บริการ น.ส.สุภร สุขจำนงค์ (SUPORN SUKJAMNONG)  
2. ที่อยู่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ อภิบาลนครเชียงใหม่

โทรศัพท์ติดต่อ 081-9399476 โทรสาร

E-mail

3. วัตถุประสงค์การขอใช้บริการ  
 ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์ไม้ จำนวน 1 ตัวอย่าง (หญ้าแฉ่ำ)  
 สอบถามข้อมูลพันธุ์ไม้  
 ทำ Voucher Specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง  
 อื่นๆ

เก็บจาก : ทุ่งพญาทอง

เก็บวันที่ : 6 ต.ค. 2553

ลงชื่อ สุภร สุขจำนงค์  
(น.ส.สุภร สุขจำนงค์)  
ผู้ขอใช้บริการ

## แบบรายงานผล

เลขที่ 10 / 2559

วันที่ 20 ต.ค. 2553

รายการงานที่ทำ ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ และทำ Voucher specimen 1 ชนิด

ผลการตรวจวิเคราะห์ / สืบค้นข้อมูล

ชื่อไทย : หญ้าแฉ่ำ, หญ้าแฉ่ำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Fimbristylis ovata* (Burm.f.) Kern

ชื่อวงศ์ : Cyperaceae

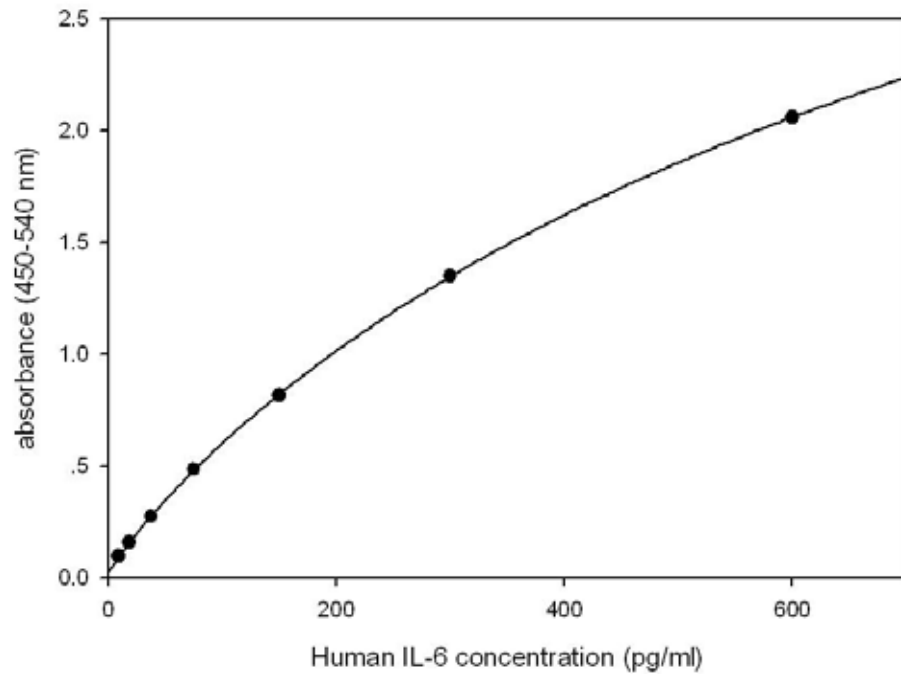
Herbarium Number : 013431 (BCU)

Collector Number : Suporn Sukjamnong 2

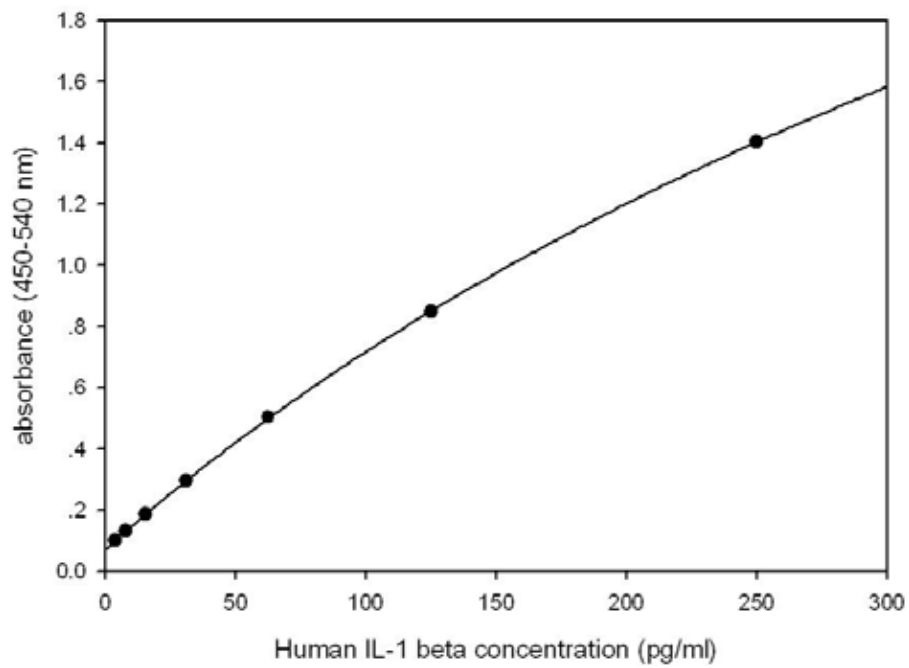
ค่าบริการ 250 บาท (=สองร้อยห้าสิบบาทถ้วน)

ลงชื่อ   
( น.ส.สุภร สุขจำนงค์ )  
ผู้ให้บริการ

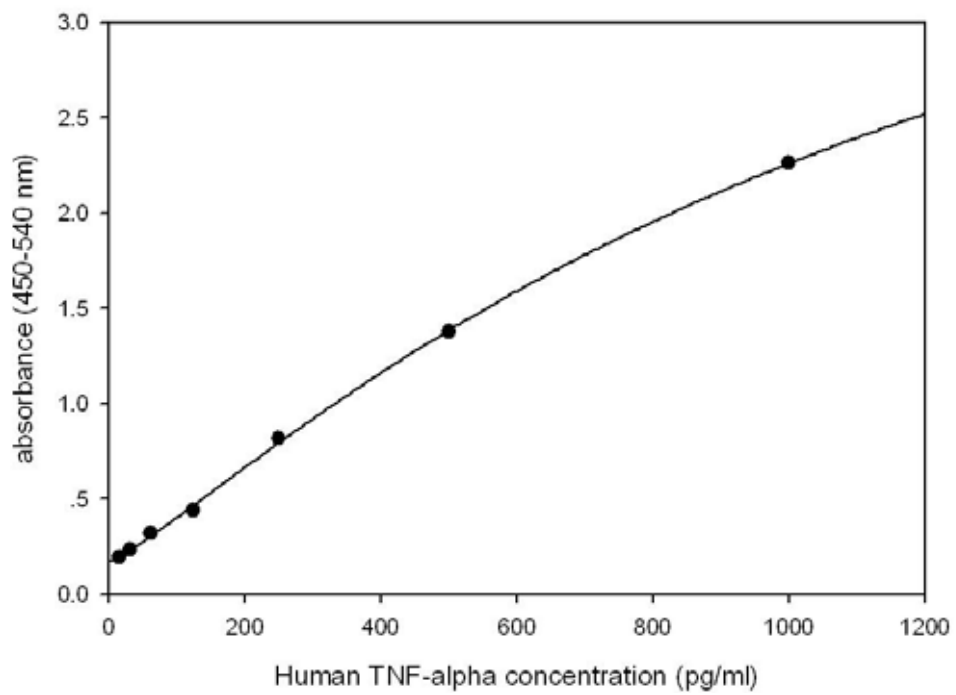
### กราฟมาตรฐาน



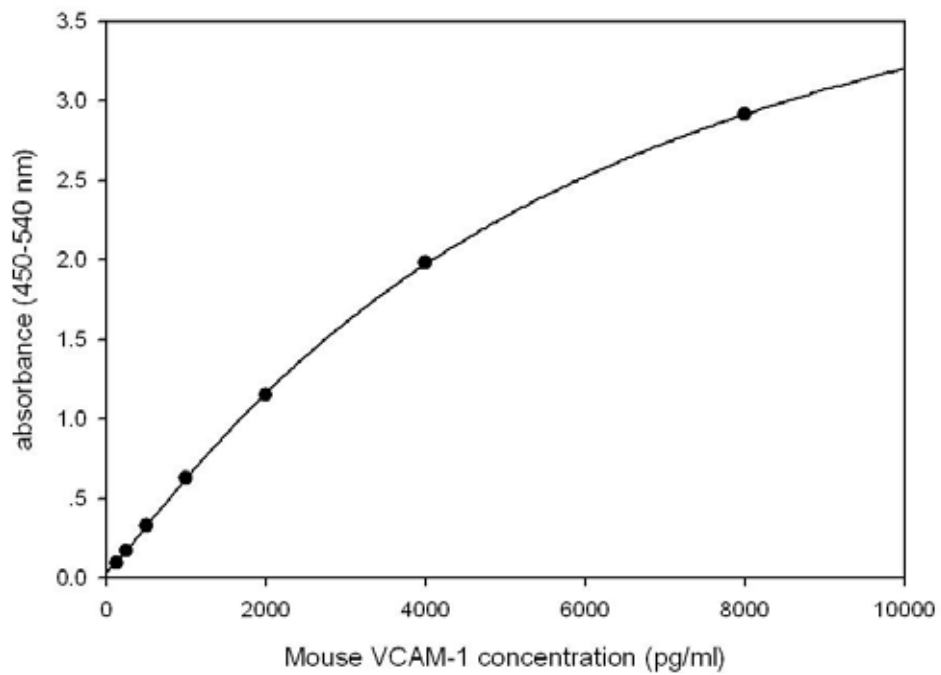
ภาพที่ 48 กราฟมาตรฐานของ Interleukin-6 โดยวิธี ELISA



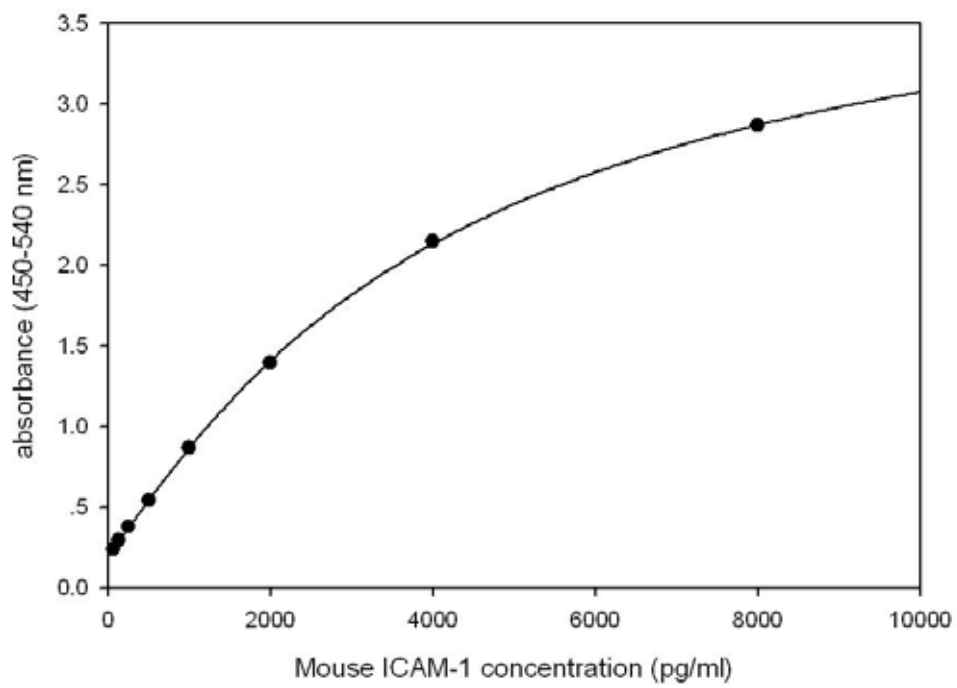
ภาพที่ 49 กราฟมาตรฐานของ Interleukin-1 $\beta$  โดยวิธี ELISA



ภาพที่ 50 กราฟมาตรฐานของ Tumor Necrosis Factor alpha โดยวิธี ELISA



ภาพที่ 51 กราฟมาตรฐานของ VCAM-1 โดยวิธี ELISA



ภาพที่ 52 กราฟมาตรฐานของ ICAM-1 โดยวิธี ELISA

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภร สุขจำนงค์ เกิดเมื่อวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ.2527 ที่จังหวัดชลบุรี จบการศึกษา  
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี  
การศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูพันธุศาสตร์ และได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วย  
วิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอน จากคณะสหเวชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย