

ฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าไพล ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการต้านการอักเสบและการเพิ่ม
ระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Anti-inflammatory and gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-upregulating effects
of *Zingiber montanum* (Koenig) rhizome, *Thunbergia laurifolia* Lindl leaf and *Gynura
pseudochina* (L.) DC. Var. *hispida* Thwaites leaf extracts

Miss Sakawrat Janpaijit



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

สกวรัตน์ จันทรไพจิตร : ฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าไพล ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการต้านการอักเสบและการเพิ่มระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (Anti-inflammatory and gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-upregulating effects of *Zingiber montanum* (Koenig) rhizome, *Thunbergia laurifolia* Lindl leaf and *Gynura pseudochina* (L.) DC. Var. *hispida* Thwaites leaf extracts) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนาว์, 136 หน้า.

ความชรา ได้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญ ซึ่งก่อให้เกิดความผิดปกติและโรคที่เกี่ยวข้องกับความชรา มากมาย กระบวนการเกิดทั้งหมดเกิดได้ในอวัยวะทั่วไป รวมทั้งภายในสมองโดยเฉพาะสมองส่วนไฮโปทาลามัส จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการเกิดความชรามีความสัมพันธ์กับกลไกการอักเสบผ่านการทำงานของ NF- κ B และการทำงานของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน ในการศึกษาที่ผู้วิจัยเลือกสมุนไพรไทย 3 ชนิดได้แก่ ไพล รางจืดและว่านมหากาฬ เพื่อศึกษาผลของสมุนไพรต่อการป้องกันและการรักษาผ่านกลไกต้านการอักเสบของ NF- κ B และการเพิ่มระดับการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทจากไฮโปทาลามัส โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของสมุนไพร เลือกมาจากการวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ จากนั้นจึงนำมาศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกของยีนของ NF- κ B และยีนเป้าหมายของ NF- κ B ด้วยวิธี real-time PCR และศึกษาการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ RelA (p65) ด้วยวิธี western blot อีกทั้งยังวัดผลการหลั่งของ โกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมนด้วยเทคนิค ELISA จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากเหง้าไพลด้วยเฮกเซนและเอทานอล ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 μ g/mL ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วยเอทานอลและสารสกัดหยาบจากใบว่านมหากาฬด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ตามลำดับ สามารถลดการแสดงออกของยีน NF- κ B1, NF- κ B2, RelA(p65), RelB, IKK- α , IKK- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6 และเพิ่มการแสดงออกของยีน SIRT1 ได้ อีกทั้งยังลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α นอกจากนี้ผลจากสารสกัดหยาบจากสมุนไพรยังสามารถเพิ่มการหลั่งของ โกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน ได้อีกด้วย จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้บ่งชี้ได้ว่ากระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ทำงานผ่านกลไกการทำงานของ NF- κ B และอาจมีความเกี่ยวข้องกับการหลั่งที่ลดลงของ โกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน และสารสกัดหยาบจากไพล รางจืดและว่านมหากาฬ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่าน NF- κ B และส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมนได้ ซึ่งน่าจะนำสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิดนี้มาศึกษาต่อยอดและพัฒนาเพื่อเป็นยาที่ใช้ในการรักษาและป้องกันความผิดปกติของความชราและโรคที่เกี่ยวข้องกับความชรา อันเนื่องมาจากกระบวนการอักเสบ

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

5576665837 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: AGING / INFLAMMATION / NF-KB / GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE / INFLAMMAGING

SAKAWRAT JANPAIJIT: Anti-inflammatory and gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-upregulating effects of *Zingiber montanum* (Koenig) rhizome, *Thunbergia laurifolia* Lindl leaf and *Gynura pseudochina* (L.) DC. Var. *hispidia* Thwaites leaf extracts. ADVISOR: ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 136 pp.

The aging process is associated with the inflammation mechanism through nuclear factor-**KB** (NF-**KB**) signaling pathway and the neuroendocrine function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus. In this study we used *Zingiber montanum* (Koenig) rhizome, *Thunbergia laurifolia* Lindl leaf and *Gynura pseudochina* DC. Var. *hispidia* Thwaites leaf extracts to investigate their anti-inflammatory protective and therapeutic effects on NF-**KB** signaling pathway and GnRH releasing in GT1-7 cells. The concentrations of herbal extracts were selected by cell viability assay. Their anti-inflammatory effect and mechanism via NF-**KB** signaling pathway were detected by real-time PCR and western blot analysis in TNF-**α**-induced inflammation of GT1-7 cells, including their effects on the releasing of GnRH were measured by ELISA. All herbal extracts decreased the mRNA level of NF-**KB** family, including NF-**KB1**, NF-**KB2**, RelA(p65), RelB, **IKB-α**, **IKK-β** and NF-**KB**-targeted genes such as tumor necrosis factor-**α** (TNF-**α**), interleukin-1**β** (IL-1**β**), IL-6 and increased the mRNA level of Sirtuin1 (SIRT1) in TNF-**α**-induced GT1-7 cells. These herbal extracts still inhibited the nuclear translocation of p65. Furthermore, the releasing of GnRH also was increased in response to TNF-**α**-induced inflammation. All results indicate that hypothalamic inflammation via TNF-**α**-induced NF-**KB** signaling pathway may be associated with the decrease of GnRH releasing. All these herbal extracts have an anti-inflammatory protective and therapeutic effect through the TNF-**α**-induced NF-**KB** signaling pathway and up-regulating effect on the releasing of GnRH and can be developed as herbal medicines for alternative treatment of inflammaging and aging-related inflammatory disorders.

Department: Clinical Chemistry Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Advisor's Signature

Molecular Medicine

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผศ.ดร. เทวิน เทนคำเนาว่า ซึ่งเป็นผู้ที่ให้โอกาสได้เข้ามาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ตลอดจนให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ชี้แนะแนวทางวิธีการแก้ไขปัญหาและข้อผิดพลาดต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย การทดลอง สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ศิริพร ชื้อขวาลกุล และ อ.ดร. เทวฤทธิ์ สาระชนะ ที่กรุณาเป็นกรรมการร่วมในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ดร.ภญ. วรัญญา อรุโณทยานันท์ ที่กรุณาเป็นกรรมการนอกมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนสำหรับผู้สมัครที่ไม่ผ่านการคัดเลือกทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนการวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 25 ครั้งที่ 3/57 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเงินทุนเพื่อการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทและเพื่อการดำเนินงานวิจัยทั้งหมดนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำเพื่อจะได้นำไปประยุกต์ใช้ในการดำเนินงานวิจัยเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องสาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ และบุคลากรทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือในด้านสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนวัสดุ-อุปกรณ์บางชนิด และคำแนะนำต่างๆเพื่อการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณสำหรับกำลังใจและแรงกระตุ้น ผลักดันที่สำคัญจากครอบครัว คุณแม่ คุณพ่อ และเพื่อนสนิททุกคนที่ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 คำถามในงานวิจัย	4
1.5 สมมติฐานในงานวิจัย	4
1.6 กรอบแนวความคิดในงานวิจัย.....	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2	7
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 Aging (ความชรา).....	7
2.2 ภาวะการอักเสบ (Inflammation).....	9
2.3 ภาวะการอักเสบ (Inflammation) ในกระบวนการเกิดความชรา (Aging process)	10
2.4 ไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบและยีนที่เกี่ยวข้องกับความชราในงานวิจัย	11
2.5 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- K B)	13

2.6	กระบวนการเกิด Aging ในระบบประสาทของสมอง	18
2.7	กระบวนการเกิด Aging และฮอร์โมนในระบบต่อมไร้ท่อ.....	18
2.8	ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการเกิด Aging ใน Hypothalamus กับ NF-KB signaling pathways และการหลั่งของฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone (GnRH).....	19
2.9	สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
บทที่ 3	30
วิธีดำเนินการวิจัย	30
3.1	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	30
3.2	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	32
3.3	อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	33
3.4	ระเบียบวิจัย.....	34
3.4.1	การเลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7.....	34
3.4.2	การสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิค Soxhlet extraction.....	35
3.4.3	การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay.....	40
3.4.4	การทดสอบหาฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนใน NF-KB signaling pathway ด้วยวิธี Real-time PCR.....	42
3.4.5	การทดสอบหากลไกต้านการอักเสบผ่านการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ด้วยวิธี Western blot analysis.....	47
3.4.6	การทดสอบหาปริมาณการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน ด้วยวิธี ELISA... ..	51
3.4.7	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	53
บทที่ 4	54
ผลการวิจัย	54
4.1	ผลจากการสกัดพืชสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทานอล และเมทานอล.....	54

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่าน มหากาฬต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay.....	56
4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 3 ชั่วโมง.....	57
4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 24 ชั่วโมง.....	62
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและ ใบว่าน มหากาฬต่อการแสดงออกของยีน NF-KB และ ยีนเป้าหมายของ NF-KB ในเซลล์ เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี Real-time PCR.....	68
4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่อการแสดงออกของยีน NF-KB และ ยีนเป้าหมายของ NF-KB ใน เซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect	69
4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่อการแสดงออกของยีน NF-KB และ ยีนเป้าหมายของ NF-KB ใน เซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	82
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่าน มหากาฬ ต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ RelA (p65) ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วย วิธี Western blot.....	94
4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect	95
4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect	98

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่าน มหากาฬ ต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี ELISA	102
4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์ เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect	103
4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบ ว่านมหากาฬต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์ เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect	104
บทที่ 5	106
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	106
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	106
5.2 สรุปผลการวิจัย	114
5.3 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย	115
รายการอ้างอิง	116
ภาคผนวก.....	130
ภาคผนวก ก	131
ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง	131
ภาคผนวก ข	132
น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	132
ภาคผนวก ค	134
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	134
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	136

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารประกอบในพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการทำงานของ NF- κ B.....	16
ตารางที่ 2 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา.....	36
ตารางที่ 3 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาการกำจัด DNA.....	43
ตารางที่ 4 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาของ Reverse transcriptase	44
ตารางที่ 5 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา real-time PCR.....	45
ตารางที่ 6 ลำดับเบสของ primer ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา	45
ตารางที่ 7 สัดส่วนของสารที่ใช้ในการสกัดโปรตีน.....	48
ตารางที่ 8 สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบใน Separating และ Stacking gel	50
ตารางที่ 9 ผลจากการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด.....	54
ตารางที่ 10 ผลจากการคำนวณปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด.....	55
ตารางที่ 11 สรุปการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay	67
ตารางที่ 12 สรุปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ ต่ออัตราการแสดงออกของยีน NF- κ B, ยีนเป้าหมายของ NF- κ B และยีน SIRT1 ในเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี Real-time PCR.....	93
ตารางที่ 13 สรุปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ ต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี Western blot	101
ตารางที่ 14 สรุปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ ต่อการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ในเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี ELISA.	105

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ NF-kB family	15
ภาพที่ 2 แสดงการกระตุ้น NF-kB ผ่าน pathways	15
ภาพที่ 3 แสดงเป้าหมายของสารประกอบในการยับยั้งกลไกการทำงานของ NF-KB ผ่าน Classical pathway และ Alternative pathway	17
ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างและการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัส (90)	20
ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด Aging กับ NF-kB และโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส	23
ภาพที่ 6 ตารางแสดงสารและปริมาณสารที่พบได้จากการสกัดเหง้าไพล ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนโดยวิธี GC-MS	25
ภาพที่ 7 ส่วนเหง้าของไพล	26
ภาพที่ 8 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากเหง้าไพล	26
ภาพที่ 9 ส่วนใบและดอกรางจืดสีม่วง	28
ภาพที่ 10 ส่วนใบของว่านมหากาฬ	29
ภาพที่ 11 Immortalized GnRH-secreting GT1-7 cells	34
ภาพที่ 12 เครื่อง Soxhlet extractor	35
ภาพที่ 13 ส่วนของเหง้าไพลที่ผ่านการตากแห้ง	36
ภาพที่ 14 ส่วนของใบรางจืดที่ผ่านการตากแห้ง	37
ภาพที่ 15 ส่วนของใบว่านมหากาฬที่ผ่านการตากแห้ง	37
ภาพที่ 16 เครื่อง Evaporator	39
ภาพที่ 17 ปฏิกริยา reduction ของ MTT assay	40
ภาพที่ 18 การเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน	53
ภาพที่ 19 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 3 ชั่วโมง	57

ภาพที่ 20 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 3 ชั่วโมง.....	58
ภาพที่ 21 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 3 ชั่วโมง.....	59
ภาพที่ 22 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 3 ชั่วโมง.....	60
ภาพที่ 23 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 24 ชั่วโมง.....	62
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 24 ชั่วโมง.....	63
ภาพที่ 25 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 24 ชั่วโมง.....	64
ภาพที่ 26 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่อ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ 24 ชั่วโมง.....	65
ภาพที่ 27 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect	69
ภาพที่ 28 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B2 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	70
ภาพที่ 29 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน RelA (p65) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	72
ภาพที่ 30 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน RelB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	73
ภาพที่ 31 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IKK- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	74
ภาพที่ 32 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IKK- β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	76

ภาพที่ 33 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	77
ภาพที่ 34 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	78
ภาพที่ 35 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	79
ภาพที่ 36 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน SIRT1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	81
ภาพที่ 37 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	82
ภาพที่ 38 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B2 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	83
ภาพที่ 39 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน RelA (p65) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	84
ภาพที่ 40 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน RelB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	85
ภาพที่ 41 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน I κ B- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	86
ภาพที่ 42 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน I κ B- β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	87
ภาพที่ 43 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	89
ภาพที่ 44 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	90
ภาพที่ 45 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรรต่อการแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	91

ภาพที่ 46 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน SIRT1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	92
ภาพที่ 47 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในนิวเคลียสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect	95
ภาพที่ 48 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในไซโทพลาซึมของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect	96
ภาพที่ 49 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในนิวเคลียสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect	98
ภาพที่ 50 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในไซโทพลาซึมของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect.....	99
ภาพที่ 51 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการหลั่งของ GnRH จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect.....	103
ภาพที่ 52 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการหลั่งของ GnRH จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect	104
ภาพที่ 53 สรุปผลการวิจัยทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้.....	114

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทย จัดเป็นสังคมผู้สูงอายุ โดยพบว่าอัตราส่วนของผู้สูงอายุในไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจากประมาณ 13.2% ในปี 2010 เป็น 32.1% ในปี 2040 (1) อีกทั้งอัตราส่วนของผู้สูงอายุยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 6.9% เป็น 12.0% ทั่วโลกอีกด้วย (2) ดังนั้นความชรา (Aging) จึงกลายเป็นปัญหาสำคัญ แม้ว่าความชราเกิดจากการมีอายุยืนยาวขึ้น เพราะความเจริญก้าวหน้าในด้านการแพทย์และสาธารณสุขดีขึ้น หน้าที่ของสถาบันด้านสุขภาพของประเทศ ไม่ว่าจะเป็นกระทรวงสาธารณสุขและมหาวิทยาลัย ต้องมุ่งให้ความสนใจเพื่อตอบโจทย์ที่ว่า “ทำอย่างไร จะทำให้ผู้สูงวัยมีคุณภาพชีวิตที่ดี (Aging with good quality of life)?” นอกจากนี้ ยังมีอีกหลายคนในสังคมที่เกิดปัญหาแก่ก่อนวัย ทั้งที่ยังไม่ถึงวัยผู้สูงอายุ อันเนื่องมาจากพฤติกรรมการดำรงชีวิตในสังคมที่ไม่เหมาะสม ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมหลายอย่างที่ส่งผลให้เกิดปัญหาดังกล่าว เช่น พฤติกรรมการบริโภคอาหารจานด่วน จำพวกฟาสต์ฟู้ด การพบเจอกับสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียด เป็นต้น ซึ่งท้ายสุดแล้วจะนำไปสู่ความเสื่อมสภาพของเซลล์ทั้งภายนอกร่างกาย เช่น การเกิดริ้วรอย ความเหี่ยวย่นของผิวหนัง และภายในร่างกาย ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น กระบวนการเกิดความชรานั้น เกิดได้จากหลายทฤษฎี โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ทฤษฎีความชราอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ สรีรวิทยาและทฤษฎีความชราอันเนื่องมาจากความเสียหายหรือความผิดพลาดของการทำงานภายในร่างกาย โดยการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ตลอดจนความบกพร่องของกลไกการควบคุมทางสรีรวิทยานั้น ยังสามารถแบ่งเป็น ทฤษฎีสารพันธุกรรม, ทฤษฎีระบบภูมิคุ้มกัน และทฤษฎีระบบประสาทและต่อมไร้ท่อ เป็นต้น ส่วนทฤษฎีความชราอันเนื่องมาจากความเสียหายหรือความผิดพลาดของการทำงานภายในร่างกายนั้น มักเกิดจากปัจจัยการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ทฤษฎีอนุมูลอิสระ, ทฤษฎีความเสื่อมโทรม และทฤษฎีการเชื่อมตามขวาง เป็นต้น (3) อย่างไรก็ตามทฤษฎีการเกิดความชรานั้น ยังมีความสัมพันธ์กัน โดยพบว่าการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ต่ำลง หรือการสะสมของสารอนุมูลอิสระ ที่นำไปสู่การทำลายเซลล์ เนื้อเยื่อ ตลอดจนอวัยวะภายในร่างกาย จะส่งผลต่อการกระตุ้นกระบวนการอักเสบผ่านไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS และ acute phase protein เป็นต้น เหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของ NF- κ B เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการอักเสบแบบเรื้อรัง

ต่อไป จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการอักเสบและความชราพบได้บ่อยที่สุดในสมองส่วน mediobasal hypothalamus โดยพบว่าระหว่างเกิดการเกิดกระบวนการความชรา เซลล์ microglia ในไฮโปทาลามัส จะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B และส่งผลต่อการสร้าง TNF- α ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานแบบ canonical ของ IKK- β และ NF- κ B ในเซลล์ประสาทข้างเคียงต่อไป นอกจากนี้การกระตุ้นการทำงานของ IKK- β และ NF- κ B ในเซลล์ประสาท ยังส่งผลต่อการลดลงของการหลั่งของ โกลนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) (4) โกลนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนหลักที่สร้างจากเซลล์ประสาทของสมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์โดยกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมน 2 ชนิดจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ได้แก่ ฟอลลิเคิล สติมิวเลติง ฮอร์โมน (Follicle stimulating hormone, FSH) และลูทีไนซิง ฮอร์โมน (Luteinizing hormone, LH) การศึกษาที่ผ่านมาถึงผลของความชราและความชรานี้เนื่องมาจากการอักเสบต่อปริมาณการหลั่งของ GnRH ยังมีความขัดแย้งกันอยู่ (5, 6) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป การแก้ปัญหาความชรา หรือแม้แต่ปัญหาแก่ก่อนวัยในปัจจุบัน มีการคิดค้นนวัตกรรมใหม่ๆ ในการชะลอริ้วรอยและความแก่ (Anti-aging) มากมาย เช่น การโบท็อกซ์ผิว การใช้เลเซอร์ การกำจัดสารพิษในร่างกาย อาหารเสริม เป็นต้น ซึ่งค่าใช้จ่ายในแต่ละวิธีค่อนข้างสูงและบางวิธีเป็นเพียงแค่การรักษาที่ปลายเหตุเท่านั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชผักสมุนไพรไทยมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ทั้งในด้านของการป้องกันการเกิดโรคและการใช้รักษาโรค อย่างไรก็ตาม ข้อมูล หรือหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชผักสมุนไพรไทยที่ส่งผลต่อการป้องกันการเกิดโรค และ การใช้รักษาโรค ยังต้องได้รับการพิสูจน์ด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสม ในการศึกษาในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจเลือกสมุนไพรไทยที่มีต้นทุนต่ำกว่า อีกทั้งยังปลอดภัย มาศึกษา เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการชะลอความแก่ที่เกิดจากต้นเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาความชรา ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และรักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น สารสกัดหยาบจากไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน สามารถยับยั้งอาการหุบวมของหนูที่เกิดจาก ethyl phenylpropionate (EPP), arachidonic acid (AA) และ 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) ได้ (7, 8) สารสกัดหยาบจากรางจืดด้วยแอลกอฮอล์และเฮกเซนสามารถลดอาการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูที่เกิดจาก carrageenan ได้ (9) และสารสกัดหยาบจากว่านมหากาฬด้วยเมทานอลยังสามารถยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ได้อีกด้วย (10) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการต้านอักเสบผ่าน NF- κ B ระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุลในระบบประสาทของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดยังมีน้อยมากและยังไม่เป็นที่แพร่หลายในการศึกษามากนัก และการศึกษากลไกความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการอักเสบที่เร่งให้เซลล์แก่เร็ว และการแก่เร็วของเซลล์ที่มีสาเหตุมาจากการทำงานของฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อที่ลดน้อยลง

โดยเฉพาะ GnRH ที่มีการศึกษามาบ้างแล้วนั้น เป็นสาเหตุและที่มาในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ โดยคณะผู้วิจัยประสงค์จะศึกษาเพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพโรในการต้านการอักเสบ ผ่านเครือข่าย NF-KB และการเพิ่มการแสดงออกของฮอร์โมน GnRH ทั้งนี้ จะใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด GT1-7 ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทประเภท GnRH neuron ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส โดยสมองส่วนนี้มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบประสาท เชื่อมโยงกับระบบต่อมไร้ท่อ อีกทั้งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กลไกการชรา (Aging process) ถูกควบคุมโดยสมองส่วนไฮโปทาลามัสอีกด้วย โดยงานวิจัยนี้ยังสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยได้อีก เพื่อพัฒนาให้สมุนไพโรไทยนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการต้านการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Aging และการกระตุ้นการแสดงออกของ GnRH ซึ่งในที่สุดจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากรสมุนไพโรที่มีอยู่อีกด้วย รวมทั้ง จะเป็นแนวทางการปฏิบัติ เพื่อนำไปสู่สังคมผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดี ถ้ามีการบริโภคสมุนไพโรที่มีประโยชน์อย่างสม่ำเสมอ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกของ NF-KB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7
2. เพื่อศึกษากลไกการต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ผ่าน NF-KB signaling pathway
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการเพิ่มระดับของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้ทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ชนิด GnRH neuron จากสมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *in vitro* model และจะศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากสมุนไพโรไทย ได้แก่ เหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ ผ่านกลไกการต้านการอักเสบของ NF-KB โดยเริ่มจากเลือกความเข้มข้นของสมุนไพโรที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยเทคนิค MTT assay จากนั้นนำมาศึกษาการต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน NF-KB และยีนเป้าหมายของ NF-KB ด้วยเทคนิค Realtime-PCR และศึกษากลไกการต้านการอักเสบจากการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ RelA (p65) ด้วยเทคนิค Western blot จากนั้นศึกษา

ความสัมพันธ์ของภาวะการอักเสบที่ผ่าน NF- κ B ต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน ด้วยเทคนิค ELISA

1.4 คำถามในงานวิจัย

1. NF- κ B signaling pathway มีความเกี่ยวข้องกับการหลั่งของ โกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในการเกิด aging หรือไม่
2. สารสกัดหยาดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่าน NF- κ B signaling pathway หรือไม่
3. สารสกัดหยาดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ สามารถเพิ่มการหลั่งของ gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ได้หรือไม่

1.5 สมมติฐานในงานวิจัย

สารสกัดจากสมุนไพรไทย ได้แก่ เหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่าน NF- κ B signaling pathway และสามารถเพิ่มระดับของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ได้

1.6 กรอบแนวความคิดในงานวิจัย

Aging (ความชรา)



สาเหตุของความชราที่เกิดขึ้น อาจเกิดได้จาก การทำงานของฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อที่ลดน้อยลง เช่น โกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) เป็นต้น ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบ ดังนั้นโมเดลที่ใช้ในการศึกษาคือเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 และศึกษากลไกการอักเสบผ่าน NF- κ B signaling pathway



สกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิด ด้วยเทคนิค Soxhlet extraction
โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน, เอทานอล และเมทานอล



ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย
ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay



ทดสอบหาฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนใน
NF- κ B signaling pathway ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี Real-time PCR



ทดสอบหากลไกต้านการอักเสบผ่าน NF- κ B signaling pathway
ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี Western blot



ทดสอบผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อการเพิ่มระดับปริมาณฮอร์โมน GnRH
ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี ELISA



วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สารสกัดหยาบจากเหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ อย่างน้อย 1 ชนิด มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกของ NF- κ B

2. สารสกัดหยาบจากเหง้าไพล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ อย่างน้อย 1 ชนิด สามารถเพิ่มระดับของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH)

3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดงานวิจัย เพื่อพัฒนาให้เป็นยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและเพิ่มระดับโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน(GnRH) เพื่อช่วยเหลือผู้ที่มีปัญหาด้าน Aging และโรคที่เกี่ยวข้องกับ Aging



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Aging (ความชรา)

Aging หรือ ความชรา คือกระบวนการที่ร่างกายมีการสะสมการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย เริ่มตั้งแต่ระยะที่เป็นเซลล์สปีพันธุ์ พัฒนามาเป็นตัวอ่อน และกลายมาเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย มีการพัฒนาของความบกพร่องทางด้านพันธุกรรม รวมทั้งการกระตุ้นจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม ภายนอก (11, 12) เกิดการสะสมของสารมลโมเลกุลส่งผลให้เกิดภาวะถดถอยของร่างกาย (Senescence) ทำให้เซลล์ภายในร่างกายเสื่อมถอยและตายในที่สุด นำไปสู่ความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน, โรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจและหลอดเลือด, โรคพาร์กินสัน และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น (13, 14) ในปัจจุบันมีการกล่าวถึงทฤษฎีที่ทำให้เกิดความชรา มากมาย ซึ่งกระบวนการเกิดความชรานั้น อธิบายได้จากการประกอบกันของทฤษฎีการเกิดความชรา ที่มากกว่า 1 ทฤษฎีขึ้นไป ในปัจจุบันสามารถแบ่งทฤษฎีการเกิดความชราได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (3, 15, 16)

1. Programmed Theories

กล่าวถึงความชรา อันเกิดมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านชีววิทยาของร่างกายที่มีความสัมพันธ์กับช่วงอายุที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงด้านการแสดงออกของยีนที่ส่งผลต่อกระบวนการรักษาสมดุล การซ่อมแซมและการป้องกันของกลไกภายในร่างกาย ทำให้การทำงานของร่างกายเสื่อมประสิทธิภาพลง ได้แก่

- Programmed Longevity (ทฤษฎีการถูกกำหนด) ความชราถูกกำหนดไว้จากการทำงานของยีนบางตัว ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทั้งระดับโมเลกุลและเซลล์ ส่งผลต่อระบบเมตาบอลิซึมภายในร่างกาย นำไปสู่การเสื่อมและการตายของเซลล์ตามช่วงอายุที่ผ่านไป
- Endocrine theory (ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน) ความชราถูกควบคุมโดยระบบการทำงานของฮอร์โมนบางชนิด เช่น Growth hormone, Gonadotropin releasing hormone (GnRH) เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกที่มีส่วนสำคัญในกระบวนการเกิดความชราซึ่งถูกควบคุมโดยการทำงานของฮอร์โมน ได้แก่ Insulin/IGF-1 signaling (IIS) pathway (17)

- Immunological theory (ทฤษฎีระบบภูมิคุ้มกัน) ความชราเกิดจากผลของระบบภูมิคุ้มกันที่ลดต่ำลง ซึ่งโดยปกติระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายจะทำงานได้ดี มีประสิทธิภาพสูงในช่วงวัยเจริญพันธุ์และค่อยๆลดลงหลังจากเวลาผ่านไปเมื่อเข้าสู่วัยชรา รวมทั้งอวัยวะที่ใช้ในการสร้างสารภูมิคุ้มกัน เช่น ระบบต่อมน้ำเหลือง, ม้าม, ต่อมไทมัส เสื่อมสภาพลง และมีการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดทำลายตนเองเพิ่มมากขึ้น ทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อเพราะการทำงานของแอนติบอดีในร่างกายไม่สามารถต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ จึงเกิดเป็นภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติ ตามมาด้วยการเกิดพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อ โรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมและโรคอื่นๆ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน และมะเร็ง เป็นต้น (13, 18)
- Somatic DNA damage theory (ทฤษฎีการผ่าเหล่า) โดยทั่วไปดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมในร่างกาย เมื่อดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ร่างกายจะมีกลไกในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ แต่เมื่ออายุเพิ่มขึ้นกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอทำงานแย่งลง จึงเกิดการสะสมของดีเอ็นเอที่เสียหายและการกลายพันธุ์ ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติไป เช่น เมื่อดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย การทำงานของไมโทคอนเดรียจึงผิดปกติไปด้วย
- Telomere theory Telomeres คือ ลำดับดีเอ็นเอที่จำเพาะซึ่งอยู่บริเวณปลายโครโมโซมของสัตว์ยูคาริโอต ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากเอนไซม์ telomerase ที่เป็น reverse transcriptase ชนิดหนึ่ง เพื่อช่วยรักษาความยาวของโครโมโซม โดยปกติแล้ว ในการแบ่งตัวของเซลล์ จะมีการสูญเสียปริมาณดีเอ็นเอเล็กน้อย บริเวณปลายโครโมโซมแต่ละอัน ทำให้ telomeres มีขนาดสั้นลงและโครงสร้างเปลี่ยนไป เกิดการกระตุ้นการถดถอยของเซลล์ (cellular senescence) ส่งผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ รวมทั้งเกิดพยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องกับความชราขึ้นได้ (19)

2. Damage or Error Theories

ความชราเกิดจากผลของสิ่งแวดล้อมภายนอกและปัจจัยอื่นๆ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อร่างกาย ได้แก่

- Wear and tear theory (ทฤษฎีความเสื่อมโทรม) ความชราเกิดจากสภาวะที่ร่างกายเกิดการเสื่อมโทรม เนื่องจากเซลล์ในร่างกายทำงานมาเป็นเวลานานและเสื่อมประสิทธิภาพลงอย่างไรก็ตาม ในร่างกายย่อมมีการซ่อมแซมตัวเองได้ โดยเซลล์ที่สามารถซ่อมแซมตัวเองและสร้างใหม่ขึ้นมาทดแทนได้ เช่น เซลล์ผิวหนัง, เม็ดเลือดแดง เป็นต้น แต่บางเซลล์ไม่สามารถ

ซ่อมแซมได้ เช่น เซลล์ประสาท, เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น (ผู้ค้นพบทฤษฎีครั้งแรกคือ Dr. August Weismann นักชีววิทยาชาวเยอรมันในปี ค.ศ. 1882)

- Rate of living theory ความชราเกิดจากระบบเมตาบอลิซึมในร่างกายมีอัตราการใช้ออกซิเจนที่เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ช่วงอายุสั้นลง (20)
- Cross-linking theory (ทฤษฎีการเชื่อมตามขวาง) ความชราเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมตามขวางของโปรตีนบางชนิดทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายเกิดความเสียหาย โดยเฉพาะภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างร่างกาย (ผู้เสนอทฤษฎีนี้คือ Johan Bjorksten ในปี ค.ศ.1942) (21)
- Free radicals theory (ทฤษฎีสารอนุมูลอิสระ) ความชราเกิดจากผลของสารอนุมูลอิสระ (Free radicals) ซึ่งเกิดขึ้นมากที่สุดภายในไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อสารมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก, ไขมัน, น้ำตาลและโปรตีน ภายในเซลล์และอวัยวะต่างๆ ส่งผลต่อการทำงานของระบบ Antioxidant เกิดเป็นภาวะ oxidative stress จนในที่สุดเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ในร่างกายหยุดการทำงานและตาย (22) (ผู้ค้นพบทฤษฎีครั้งแรกคือ Dr. Gerschman ในปี ค.ศ. 1954 (23) และถูกพัฒนาโดย Dr. Denham Harman (24))

2.2 ภาวะการอักเสบ (Inflammation)

การอักเสบคือ กระบวนการตอบสนองของร่างกายเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บจากสิ่งแปลกปลอมภายนอกที่มากกระตุ้น เช่น เชื้อโรค เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ แต่หากเกิดการอักเสบมากเกินไปหรือเกิดการอักเสบเป็นเวลานาน จะส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและการทำงานของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การอักเสบแบบเฉียบพลันและการอักเสบแบบเรื้อรัง (13)

- การอักเสบแบบเฉียบพลัน มักจะเกิดขึ้นภายในเวลาสั้นๆ เป็นช่วงเวลาที่ หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและจะคงอยู่ประมาณ 2-3 วันแต่ไม่ถึงสัปดาห์ มีลักษณะที่สำคัญคือ มีการขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดไหลเวียนมายังบริเวณที่บาดเจ็บ ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือด ทำให้เซลล์และโปรตีนสามารถรั่วไหลออกนอกเส้นเลือดได้ จากนั้นจะมีการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือด เข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บเกิดขึ้น เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ

- การอักเสบแบบเรื้อรัง มักจะเกิดและดำเนินมาเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์หรือเป็นเดือน โดยมีการอักเสบเกิดร่วมกับการทำลายเนื้อเยื่อและการสมานแผลพร้อมๆกัน การอักเสบชนิดนี้มักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อที่รักษาไม่หาย, เนื้อเยื่อได้รับอันตรายเป็นระยะเวลานานติดต่อกัน และโรคมะเร็งที่ตนเอง โดยมึลักษณะที่สำคัญคือ มีการแทรก (infiltration) ของเซลล์ชนิด mononuclear ได้แก่ macrophage, lymphocyte และ plasma cell ร่วมกับการทำลายของเนื้อเยื่อ (tissue destruction) และมีการซ่อมแซม ส่วนของเนื้อเยื่อที่เสียหาย โดยการสร้างพังผืด หรือ connective tissue (fibrosis) ขึ้นมา

2.3 ภาวะการอักเสบ (Inflammation) ในกระบวนการเกิดความชรา (Aging process)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งความผิดปกติจากการทำงานในระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลต่อการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา redox ภายในเซลล์ ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระจากการสร้างของเซลล์ macrophages ที่ถูกกระตุ้นแล้วชนิด ROS และ RNS เป็นจำนวนมาก (25, 26) ทำให้เกิดกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบ นำไปสู่ภาวะการอักเสบเรื้อรังในระดับต่างๆ ซึ่งกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเกิดความชรา เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “Inflammaging” สุดท้ายแล้วจะส่งผลให้เกิดโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับความชรา (Age-related diseases) ซึ่งเป็นโรคที่มีภาวะการอักเสบแบบเรื้อรังร่วมด้วย เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด, โรคกระดูกพรุน, โรคอ้วน, โรคเบาหวาน, โรคมะเร็ง และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น (13, 27) จากการศึกษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความชรานี้ พบว่ามีการไหลเวียนของไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ในระบบหมุนเวียนเลือดอีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น IL-1 β , IL-6, IL-8 และ TNF- α (13) เป็นต้น

2.4 ไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบและยีนที่เกี่ยวข้องกับความชราในงานวิจัย

Tumor necrosis factor (TNF- α)

โดยทั่วไป TNF- α จะถูกสร้างจากเซลล์ macrophages และ T-lymphocytes เป็นส่วนใหญ่และอยู่ในรูป pro-TNF ขนาด 26 kDa บริเวณพื้นผิวของ plasma membrane จากนั้นจึงถูกตัดด้วย matrix metalloproteinases TNF- α converting enzyme (TACE) กลายเป็น soluble-TNF ขนาด 17 kDa ทั้ง pro-TNF และ soluble-TNF สามารถทำงานโดยจับกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์เป้าหมายทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ TNF- α receptor 1 (TNFR1 หรือ p55TNFR) และ TNF- α receptor 2 (TNFR2 หรือ p75TNFR) ซึ่งจะตรวจเจอ TNF สูงขึ้นในสภาวะที่มีการติดเชื้อและการอักเสบร่วมด้วย (28) ในระบบประสาทส่วนกลาง TNF- α มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานทางสรีรวิทยา เช่น กลไกการตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อการสร้างความจำ (synaptic plasticity), กระบวนการเรียนรู้และความทรงจำ, การนอนหลับ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเกิดพยาธิสภาพขึ้นมา TNF- α จะถูกสร้างออกมาเป็นจำนวนมากจากเซลล์ microglia และมีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบในระบบประสาทและโรคที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทอีกด้วย (29) จากการศึกษาที่ผ่านมาแบบ in vivo พบว่า ระดับความเข้มข้นของ TNF- α เพิ่มสูงขึ้น และมีความสัมพันธ์กับระดับของ IL-6 และ Acute phase proteins เช่น C-reactive protein (CRP) ในกลุ่มตัวอย่างที่อายุแก่กว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่อายุน้อยกว่า ที่มีลักษณะของภาวะสมองเสื่อมและโรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัว (30, 31) รวมทั้งในโรคพาร์กินสัน (32) บ่งชี้ถึงการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ และระดับ TNF- α ที่เพิ่มสูงขึ้น อาจมีความเกี่ยวข้องกับการทำนายความบกพร่องของการทำงานของอินซูลิน เมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นได้อีกด้วย (33)

Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β เป็นไซโตไคน์ที่จะทำงานในรูป mature form เท่านั้นโดย pro-IL-1 β จะถูกตัดด้วย caspase-1 (IL-1 β converting enzyme หรือ ICE) ก่อนถึงจะสามารถทำงานได้ ซึ่ง IL-1 β ทำหน้าที่กระตุ้นการอักเสบได้โดยการเหนี่ยวนำ TNF- α และ IL-2 จากการกระตุ้นเซลล์ T-helper และทำให้เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบ จากการกระตุ้น cyclooxygenase-2 เพื่อให้สร้างสาร prostaglandin E2, inducible nitric oxide (iNOS) และ intercellular adhesion molecules เช่น Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) นอกจากนี้ IL-1 β ยังสามารถกระตุ้นตัวมันเอง ให้มีการแสดงออกในกระบวนการอักเสบ ส่งผลให้ระดับ C-reactive protein และ Serum amyloid protein เพิ่มสูงขึ้นได้อีกด้วย (34) ในระบบประสาทส่วนกลาง IL-1 β มีความเกี่ยวข้องกับ

กระบวนการอักเสบภายในระบบประสาท โดยสามารถกระตุ้นเซลล์ astrocytes และ microglia และยังสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ ไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ, โมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะของเซลล์ เช่น cyclooxygenases และ matrix metalloproteases ภายในสมองส่วน parenchyma ได้ (35) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าในกลุ่มตัวอย่างหนูแก่ที่มีอาการของโรคความจำเสื่อมและก้อน plaques ในเซลล์ microglia มีการแสดงออกของ IL-1 β เพิ่มสูงขึ้น บ่งชี้ว่าระดับของ IL-1 β มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคความจำเสื่อม (36, 37)

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 เป็นสมาชิกในกลุ่มไซโตไคน์ที่ประกอบไปด้วย ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M, cardiotrophin-1 (CT- 1), growth promoting activity (GPA), และ interleukins ได้แก่ IL-6 และ IL-11 ซึ่ง IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ macrophages และ T lymphocytes มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆมากมาย ทั้งกระบวนการสร้างและพัฒนาเซลล์เม็ดเลือด, กระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน, กระบวนการอักเสบ, กระบวนการควบคุมเมตาบอลิซึม การซ่อมแซม และการสร้างเซลล์ประสาท เป็นต้น (38, 39) ในกระบวนการอักเสบ ทั้ง TNF- α และ IL-1 β สามารถกระตุ้นการหลั่งของ IL-6 ได้ อย่างไรก็ตาม IL-6 ก็มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ โดยมีผลย้อนกลับในการลดการทำงานของ TNF- α และ IL-1 β ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ามีการสร้าง IL-6 สูงขึ้นใน peripheral mononuclear cells ของกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุมากเมื่อเทียบกับกลุ่มที่อายุน้อยกว่า (34, 40) และระดับของ IL-6 ยังสูงขึ้นในระบบหมุนเวียนเลือดของกลุ่มตัวอย่างที่อายุ 70 ปีขึ้นไป (41, 42) และในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคความจำเสื่อม (37) และเมื่อมีการกระตุ้น LPS ในหนู ทำให้มีการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีน IL-6 เพิ่มสูงขึ้น (43) อีกด้วย

Sirtuin-1 (SIRT1)

SIRT1 จัดอยู่ในตระกูล Sirtuin เป็น class III nicotinamide adenosine dinucleotide-dependent histone deacetylase โดยพบว่า SIRT1 มีความเกี่ยวข้องกับเพิ่มหรือลดช่วงอายุขัยได้ โดยเกิดกระบวนการ deacetylation ต่อ FOXO ซึ่งจัดเป็น longevity factor อย่างหนึ่ง (44) นอกจากนี้ SIRT1 ยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านการอักเสบผ่านการควบคุมทำงานของ NF- κ B โดยเกิดกระบวนการ deacetylation ต่อ p65 โดยตรงที่ lysine ตำแหน่งที่ 310 ทำให้การแสดงออกของกระบวนการ transcription ที่เกี่ยวข้องกับ NF- κ B ลดลง จากการศึกษาที่ผ่านมา

พบว่า resveratrol ซึ่งเป็น ตัวกระตุ้น SIRT1 สามารถรักษาความผิดปกติอันเนื่องมาจากกระบวนการ ความชราได้ เช่น resveratrol สามารถเพิ่มช่วงอายุให้ยืนยาวขึ้นจากการป้องกันความเสื่อมของระบบ ประสาทในโรคความจำเสื่อมและโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง เป็นต้น

นอกจากไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ยังมี pro-inflammatory enzymes เช่น cyclooxygenase-2 (COX-2) (45) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) (46) ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เกิดการอักเสบทั่วร่างกาย (18, 47, 48) ซึ่งการแสดงออกของไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิด การอักเสบ ยังขึ้นอยู่กับการทำงาน transcription factors เช่น NF- κ B ซึ่งมีบทบาทสำคัญใน กระบวนการอักเสบแบบเรื้อรังระหว่างที่เกิดความชรา (aging) อีกด้วย (18, 49)

2.5 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)

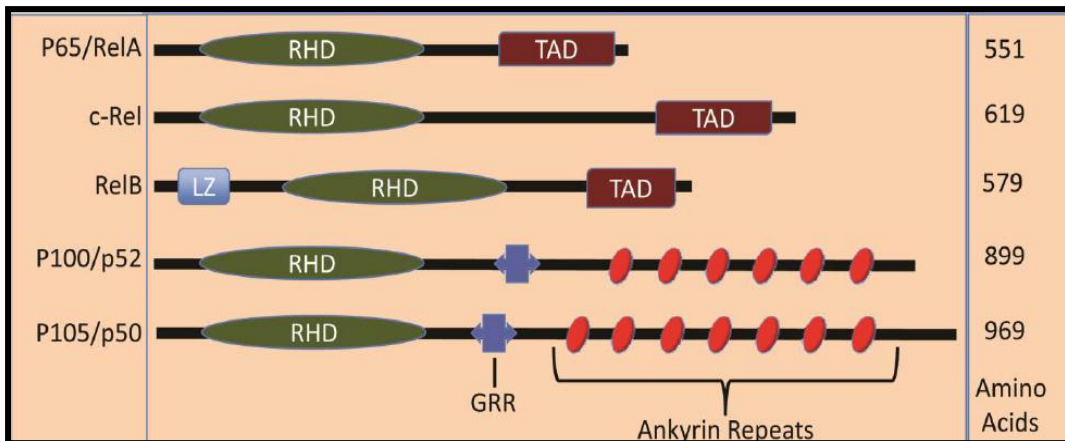
NF- κ B เป็นกลุ่มของ B cell specific transactivator ของ immunoglobulin C_k gene (light chain enhancer) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ประกอบด้วย NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p105), RelA (p65), c-Rel และ RelB จับกันแบบ homodimer และ heterodimer (50) โดยทั้ง 5 แบบมีตำแหน่งที่เหมือนกันคือ Rel homology domain (RHD) ซึ่งอยู่ฝั่ง N-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโน 300 ชนิดโดยประมาณเรียงตัวเป็นลำดับสำหรับ DNA binding, protein dimerization และ nucleocytoplasmic localization อย่างไรก็ตาม RelA (p65), c-Rel และ RelB มีตำแหน่งที่เหมือนกันคือ Transactivation Domain (TAD) ไว้เป็นตัวควบคุมการ แสดงออกของยีน ส่วน NF- κ B1 (p50/p105) และ NF- κ B2 (p52/p105) มีตำแหน่งที่เหมือนกันคือ Glycine rich regions (GRR) ไว้สำหรับการเกิด Proteolytic cleavage และ Ankyrin repeats ที่มี ลักษณะเหมือนกับที่พบใน I κ B proteins นอกจากนี้ RelB ยังประกอบด้วย Leucine zipper motif (LZ) อีกด้วย (51) การแสดงออกของ NF- κ B พบในเซลล์ทุกชนิดและมีความสำคัญในการเหนี่ยวนำ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน, การอักเสบ, กระบวนการเกิด carcinogen และการยับยั้งการตายของเซลล์ เป็นต้น (52)

ในสภาวะปกติ Rel/NF- κ B จะอยู่ในไซโทพลาซึมในรูปของ inactive form และจับกับตัว ยับยั้ง I κ B- α และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ (รูปที่ 1) เช่น ภาวะ oxidative stress, ไซโตไคน์ เช่น IL-1, IL-6 และ TNF- α รวมทั้งสารที่สร้างมาจากเชื้อจุลชีพ เช่น

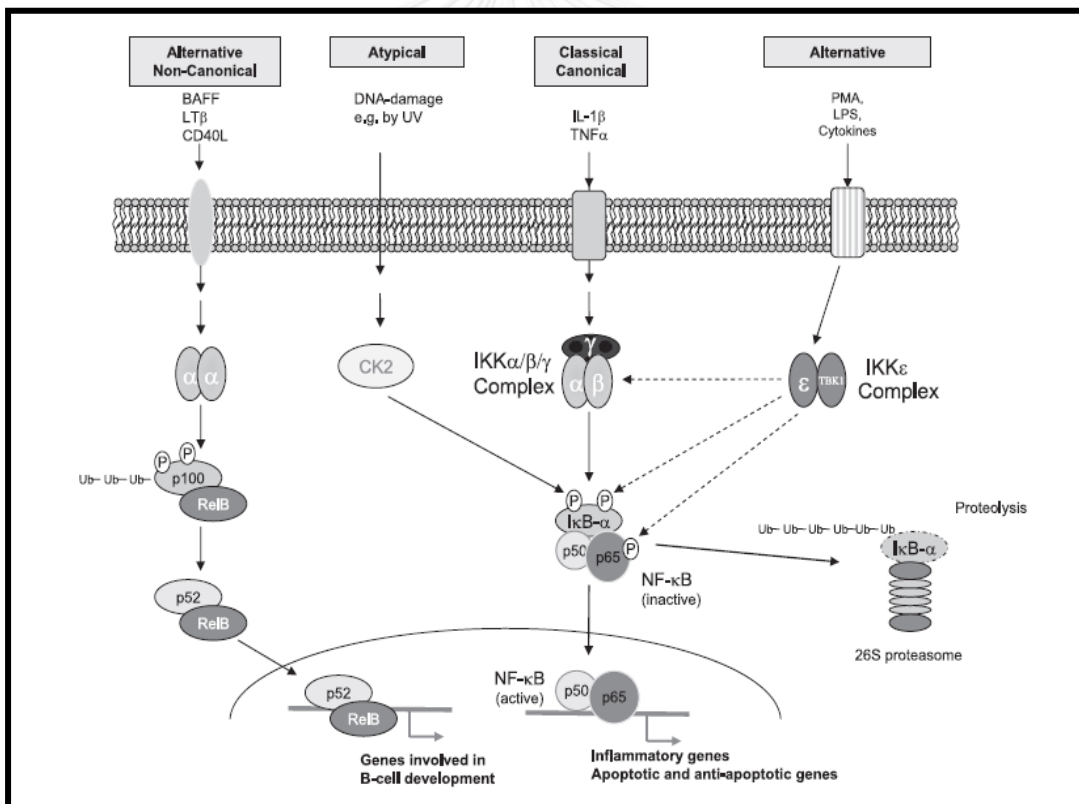
lipopolysaccharide (LPS) จะเกิดการ phosphorylation ของ I κ B kinases (IKKs) ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง I κ B- α ส่งผลให้ I κ B- α ถูกย่อยสลายโดย 26s proteasome ส่งผลให้ Rel/NF- κ B เข้าสู่ นิวเคลียส ไปจับกับยีนเป้าหมายที่บริเวณ promoter region ที่มี DNA-binding motif 5'-GGGpuNNPyPyCC-3' หรือ transcription factors ผ่าน protein-protein interactions เกิดการ แสดงออกของยีนเป้าหมายต่อไปได้แก่

- Immunoreceptors เช่น Immunoglobulin k light chain, Major histocompatibility complex class I
- Cell adhesion molecules เช่น Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), Intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1)
- Cytokines และ Growth factors เช่น TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 และ granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)
- Chemokines เช่น Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)
- Acute-phase proteins เช่น C-reactive protein
- Transcription factors และ subunits เช่น I κ B- α
- อื่นๆ เช่น NF- κ B precursor p105, p100, Nitric oxide synthase, Cyclooxygenase-2 (25, 52-55)

ซึ่งการทำงานของ NF- κ B เกิดขึ้นได้หลายทาง โดย pathway หลักคือ Classical canonical pathway ที่มี IL-1 β และ TNF- α เป็นตัวกระตุ้นเริ่มต้น ทำให้เกิดการกระตุ้น I κ B kinases (IKKs) ซึ่งแบ่งเป็น IKK-1 (IKK- α) และ IKK-2 (IKK- β) โดยพบว่า NF- κ B inducible kinase (56) เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ IKKs โดยการเกิด phosphorylation เมื่อ IKKs ถูกกระตุ้น ส่งผลให้เกิด phosphorylation ของ I κ B ที่ตำแหน่ง Ser32 และ Ser36 เกิดการย่อยสลายของ I κ B ด้วยกระบวนการ Ubiquitination ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของ Rel/NF- κ B นอกจากนี้ NF- κ B ยังเกิดขึ้นผ่าน pathway อื่นๆได้อีกด้วย ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 2 (55, 57)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ NF-kB family (51)



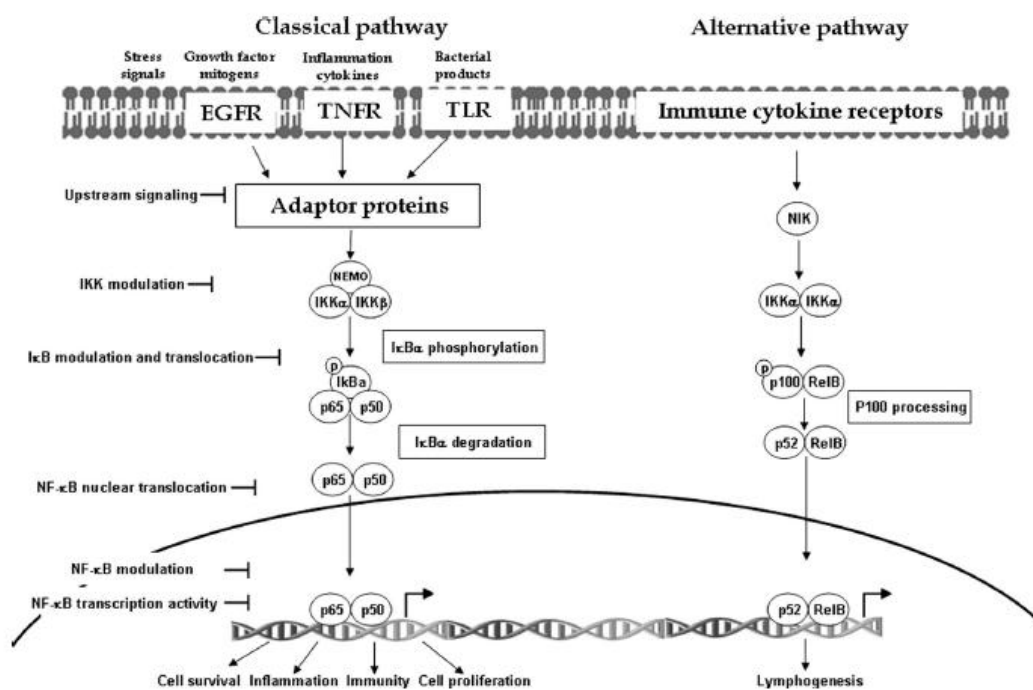
ภาพที่ 2 แสดงการกระตุ้น NF-kB ผ่าน pathways ต่างๆ ได้แก่ Alternative non-canonical, Atypical, Classical canonical และ Alternative pathways (57)

เนื่องจากว่า NF- κ B มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองต่อการอักเสบ และกระบวนการเกิดมะเร็ง เป็นต้น ทำให้ NF- κ B ถูกพิจารณาเป็นเป้าหมายในการรักษาโรค (58) โดยที่ผ่านมามีการนำส่วนของพืชมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการทำงานของ NF- κ B เพื่อนำ phytochemicals ที่อยู่ในพืชมาพัฒนาเป็นตัวยาเพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการรักษาโรค (59, 60) ซึ่งสามารถแบ่งได้ตามฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการทำงานของ NF- κ B (ตารางที่ 1) ดังนี้ (61)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารประกอบในพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการทำงานของ NF- κ B

Major effect	Mechanism of action	Active compounds	Ref
- Inhibition of upstream signaling	Through TLR-4 (LPS induced)	Isoliquiritigenin	(62)
	Through reactive oxygen species (39)	Luteolin	(63)
		Naringenin	(64)
	Through inhibition of TNF- α signaling	Impressic acid Piceatannol	(65) (66)
	Through ERK1/2 (b-caryophyllene).	B-caryophyllene	(67)
- IKK modulation	By direct binding to Cys 179	Wedelolactone	(68)
- I κ B modulation	By phosphorylation, degradation and I κ B nuclear translocation	ADEE	(69)
		Resveratrol	(70)
- NF- κ B modulation	Through NF- κ B phosphorylation and acetylation	Curcumin	(71)
		Triptolide	(72)
- NF- κ B nuclear translocation	Through inhibition of NF- κ B translocation	ADEE	(69)

- NF- κ B DNA-binding activity	Through inhibition activation of NF- κ B DNA-binding activity	Lycopene	(73)
- NF- κ B transcriptional activity	Through inhibition of NF- κ B-dependent transcriptional activity	Kahweol	(74)
- NF- κ B inhibition	By induction of apoptosis and caspase activation	NUP	(75)



ภาพที่ 3 แสดงเป้าหมายของสารประกอบในการยับยั้งกลไกการทำงานของ NF- κ B ผ่าน Classical pathway และ Alternative pathway (61)

2.6 กระบวนการเกิด Aging ในระบบประสาทของสมอง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กระบวนการเกิดความชรา มีความสัมพันธ์กับสมองในบริเวณต่างๆ เช่น ในสมองส่วน cerebral cortex และ frontal cortex จำนวนเซลล์ประสาทที่สำคัญ เช่น เซลล์ pyramidal มีปริมาณลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากกลไกการเกิดความชรา (76, 77) รวมทั้งในสมองส่วน hippocampus จำนวนเซลล์ประสาทยังลดลงอีกด้วย (78) แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมเมื่อไม่นานมานี้พบว่า มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการเกิดความชรา กับ การทำงานของ NF-KB ภายในสมองส่วนต่างๆ ได้แก่ cortex, thalamus และ mediobasal hypothalamus (MBH) ซึ่งพบว่าในสมองส่วนไฮโปทาลามัส โดยเฉพาะส่วนของ mediobasal hypothalamus (MBH) มีการแสดงออกของ NF-KB มากที่สุด จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

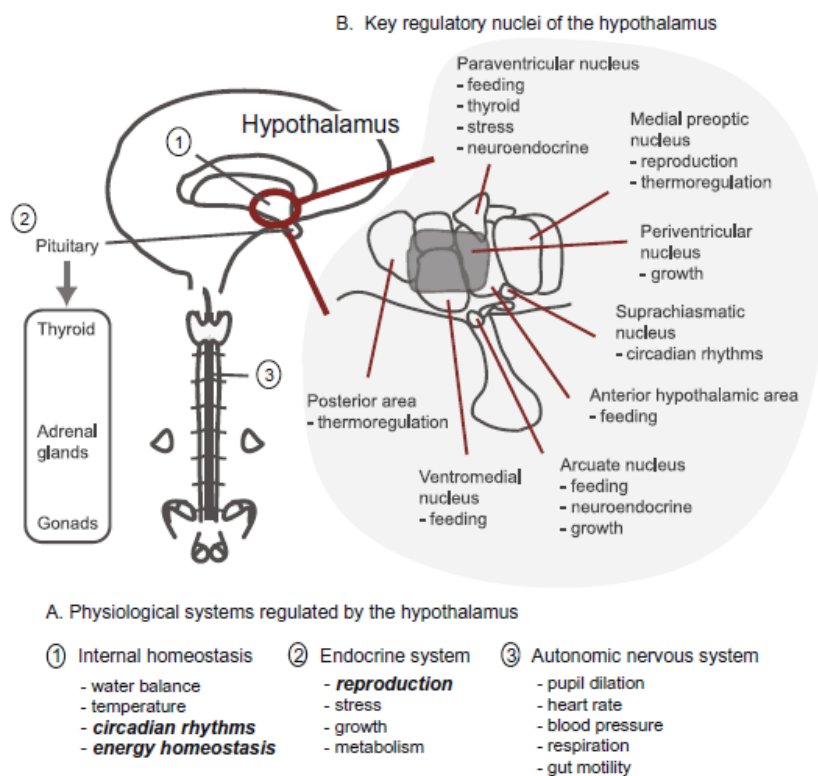
2.7 กระบวนการเกิด Aging และฮอร์โมนในระบบต่อมไร้ท่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนและกระบวนการเกิดความชรา มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษายังไม่เป็นที่สรุปแน่ชัด ขึ้นอยู่กับเซลล์และเนื้อเยื่อของฮอร์โมนนั้น รวมทั้งโมเดลในการศึกษา ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง, ช่วงอายุและสปีชีส์ของสัตว์ทดลอง เป็นต้น บางการศึกษาบ่งชี้ว่าฮอร์โมนบางชนิดมีการแสดงออกที่ลดลงในระหว่างที่เกิดความชรา ยกตัวอย่างเช่น ฮอร์โมน Glucocorticoid ในกล้ามเนื้อลายของหนู (79), ในสมองส่วน Cerebral cortex ของหนู (80) ฮอร์โมน Androgen และฮอร์โมน estrogen ในสมองส่วน hypothalamus ของหนู (81) ฮอร์โมน Gonadotropin ได้แก่ testosterone ในเซลล์ Leydig และ testes ของหนู (82, 83) ฮอร์โมน Growth hormone ในหนูแก่ (84, 85) ฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone ในเซลล์ GT1-7 (4) อย่างไรก็ตามฮอร์โมนบางชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่เกิดความชรา เช่น ฮอร์โมน Glucocorticoid ในเซลล์ adipocytes ของหนู (86) ฮอร์โมน Androgen ใน Anterior prostate ของหนู ฮอร์โมน Gonadotropin ได้แก่ testosterone ใน testes และ ovary ของหนู (87) ฮอร์โมน Growth hormone ในตับของหนู เป็นต้น (88) และ ฮอร์โมนบางชนิดก็เพิ่มสูงขึ้นในช่วงกระบวนการเกิดความชรา เช่น ฮอร์โมน Androgen และฮอร์โมน estrogen ใน seminal vesicle ของหนู เป็นต้น (89)

2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการเกิด Aging ใน Hypothalamus กับ NF- κ B signaling pathways และการหลั่งของฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone (GnRH)

จากการวิจัยที่ผ่านมา มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการเกิดความชรา กับ NF- κ B ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส โดยเฉพาะส่วนของ mediobasal hypothalamus (MBH) โดยพบว่ามี การกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ผ่านการ phosphorylation ของ RelA ซึ่งเป็นหน่วยย่อยหนึ่ง ของ NF- κ B ในหนูที่อายุน้อยประมาณ 3-4 เดือน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในหนูที่แก่ขึ้น (อายุ ประมาณ 22-24 เดือน) ร่วมกับระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมทาง ภูมิคุ้มกันและไซโตไคน์ต่างๆเพิ่มสูงขึ้นในสมองส่วนไฮโปทาลามัสของหนูที่แก่เมื่อเทียบกับหนูที่อายุน้อย นอกจากนี้เมื่อมีการใช้ NF- κ B reporter gene ดูการแสดงออกของ GFP เทียบระหว่างหนูที่ อายุน้อยจนถึงอายุแก่ พบว่าในหนูที่มีช่วงอายุแก่มีการแสดงออกของ GFP มากที่สุดและเมื่อทดสอบ กับสมองส่วนต่างๆ ก็พบว่า สมองส่วนไฮโปทาลามัสมีความไวต่อการทำงานของ NF- κ B มากที่สุด จึง สรุปลงได้ว่าความชรา มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของ NF- κ B ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส นอกจากนี้ ไฮโปทาลามัส ยังเป็นสมองส่วนแรกที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสมดุลของพลังงานในร่างกาย โดย สามารถแบ่งการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัสได้เป็น 3 ประเภทคือ

- Control of internal homeostasis คือการควบคุมสมดุลภายในร่างกาย โดยควบคุม สมดุลของน้ำ, อุณหภูมิ และพลังงาน เป็นต้น
- Endocrine system regulation คือการควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น
- Autonomic nervous system regulation คือการควบคุมเกี่ยวกับอัตราการการเต้นของ หัวใจ ความดันเลือด เป็นต้น (90)



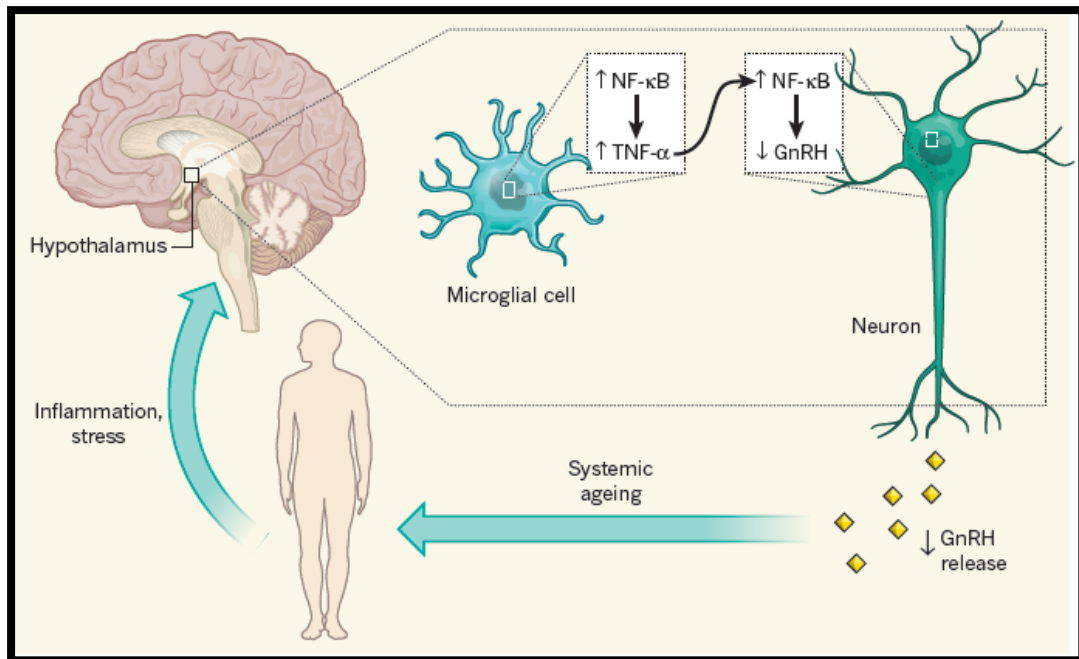
ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างและการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัส (90)

เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัสในการควบคุมกระบวนการทำงานภายในร่างกาย โดยเฉพาะการควบคุมการทำงานของฮอร์โมนในระบบต่อมไร้ท่อจึงมีการพัฒนาสร้าง immortalized cell model ขึ้นมา เซลล์แรกที่ถูกสร้างขึ้นมา คือ GnRH expressing cell model ถูกสร้างและพัฒนาจาก Mellon et al. in 1990 (91) สร้างโดยใช้เทคนิค genetically targeting tumorigenesis ใน transgenic mice ซึ่งใช้ตำแหน่ง promoter ของฮอร์โมน GnRH ให้มีการแสดงออกของ SV40 T-antigen oncogene ได้เป็น GT-1 cell line ซึ่งเป็น heterogenous cell ต่อมาจึงพัฒนาเป็น GT1-1, GT1-3 และ GT1-7 ซึ่งเป็น homogenous cell (91, 92) ในปัจจุบันมีการสร้างและพัฒนา GnRH expressing cell model ขึ้นมาอีกหลายเซลล์ได้แก่ GN, Gnv, GRT cell line โดย GN cell ถูกพัฒนาด้วยเทคนิคที่คล้ายกับ GT1 cell ต่างกันที่ GN cell ถูกสร้างมาจากยีน GnRH ของมนุษย์ และถูกพิจารณาให้เป็น Immature GnRH neuron (93) ส่วน Gnv และ GRT cell line ถูกสร้างขึ้นด้วยเทคนิคที่ต่างออกไป (94, 95) จากการศึกษาที่ผ่านมา GT1-7 cell line ถูกนำมาใช้ทดสอบมากที่สุด เนื่องจากมีการสร้างฮอร์โมน GnRH ในระดับที่สูง เมื่อเทียบกับเซลล์อื่น นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของ neuron-specific protein และมีรูปร่าง ลักษณะการ

ทำงานเหมือนเซลล์ประสาททั่วไป จึงถูกพิจารณาให้เป็น Mature GnRH neuron ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้ GT1-7 cell line เป็นโมเดลในการศึกษา เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการอักเสบในไฮโปทาลามัสกับภาวะการต่อต้านอินซูลิน (96) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 และ methyl mercury (97) เป็นต้น

กระบวนการเกิดการอักเสบในสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamic inflammation) อันเนื่องมาจากการกระตุ้นจากปัจจัยทั้งทางด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมภายนอก ส่งผลต่อความบกพร่องในการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัส เช่น การควบคุมสมดุลพลังงาน เหนี่ยวนำให้เกิดความไม่สมดุลของน้ำหนัก, ภาวะโรคอ้วน และความผิดปกติที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม เป็นต้น และยังมีผลต่อการเร่งกระบวนการเกิดความชราให้เร็วยิ่งขึ้น ผ่านกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการทำงานของต่อมไร้ท่อ และส่งผลกระทบต่อหลายๆอวัยวะทั่วร่างกาย อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการอักเสบและกลไกการเกิดความชรา (Inflammaging) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่า NF- κ B ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญในกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบมีระดับสูงขึ้นในสมองส่วนต่างๆ โดยเฉพาะสมองส่วน MBH (mediobasal hypothalamus) อีกทั้งยังควบคุมการแสดงออกของยีนในระหว่างที่เกิดความชราอีกด้วย โดยพบว่าเซลล์ microglia (เซลล์ที่ทำหน้าที่คล้ายแมคโครฟาจในระบบภูมิคุ้มกัน) ซึ่งมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นแปรผันตามอายุที่เพิ่มขึ้นในสมองส่วนไฮโปทาลามัส จะเกิดกระบวนการอักเสบขึ้น จากการทำงานของ NF- κ B ที่เพิ่มสูงขึ้น ระหว่างช่วงที่เกิดกลไกความชรา ส่งผลต่อการผลิต TNF- α ที่มากเกินไปออกมา และ TNF- α ที่ถูกผลิตออกมานี้ ยังไปกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ภายในเซลล์ประสาท (MBH neuron) ในบริเวณที่ใกล้เคียงได้ จากกลไกการกระตุ้นแบบ feed-forward loop นี้ทำให้เกิดการสร้างสมดุลของกระบวนการเกิดความชราในไฮโปทาลามัส อีกทั้งเมื่อมีการกระตุ้นการทำงานของ IKK- β และ NF- κ B จะส่งผลให้มีการหลั่งฮอร์โมน GnRH ออกมาลดลง แต่เมื่อ IKK- β และ NF- κ B ถูกยับยั้ง ฮอร์โมน GnRH จะหลั่งออกมามากขึ้น นอกจากนี้ การกระตุ้นการทำงานของ IKK- β และ NF- κ B ยังไปเพิ่มการแสดงออกของยีน Fos (c-fos), Jun (c-jun), Prkca (Pkc α) และ Prkcd (PKC δ) ซึ่งผลสอดคล้องกับการลดลงของการทำงานของ Gnrh1 promoter เมื่อมีการแสดงออกที่มากขึ้นของ c-Fos, c-Jun และ protein kinase C (PKC) (98) จากการกระตุ้น NF- κ B signaling pathway ด้วย TNF- α จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้าน epigenetics ของยีนที่ encode โภนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ทำให้การแสดงออกของฮอร์โมนลดลง และส่งผลให้เกิดความบกพร่องภายในร่างกาย เช่น ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อลดลง การสูญเสียมวลกระดูก การฟ่อของผิวหนัง การสร้างเซลล์ประสาทลดลง ความจำบกพร่องและส่งผลต่อการเกิด systemic aging ดังแสดงในรูปที่ 5 (98, 99) ซึ่งโภนาโดโทรปิน

รีลีสซิง ฮอริโมน (GnRH) เป็นฮอริโมนชนิดเปปไทด์ ซึ่งเป็นฮอริโมนที่มีบทบาทสำคัญในระบบการสืบพันธุ์ หลั่งออกมาจากเซลล์ประสาท (GnRH neurons) บริเวณตอนกลางของสมองไฮโปทาลามัสส่วนกลาง (medial basal hypothalamus:MBH) และหลั่งออกมาทาง hypophyseal portal vessels ของสมองส่วนไฮโปทาลามัส และควบคุมการหลั่งของ pituitary gonadotropins ได้แก่ ฮอริโมน follicle-stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) ส่วนใหญ่การหลั่งของ GnRH มีลักษณะเพิ่มและลดอย่างมีจังหวะเป็นช่วงๆ (pulsatile) แต่เดิมเชื่อว่าภายในสมองไฮโปทาลามัสมีศูนย์กลางที่ควบคุมการหลั่ง GnRH ที่เรียกว่า GnRH pulse generator แต่ปัจจุบันพบว่า GnRH สามารถหลั่งออกมาเองได้ด้วยการทำงานร่วมกันของเซลล์ประสาท GnRH neurons ประมาณ 1,500 เซลล์ การหลั่งของ GnRH และ gonadotropins ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีลักษณะทั้งแบบ pulse และ surge phases ถูกควบคุมอย่างเป็นอิสระต่อกัน อย่างไรก็ตามรูปแบบการหลั่งก็ยังคงมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับช่วงของระยะการสืบพันธุ์, สปีชีส์ เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมา การหลั่งของ GnRH ถูกกระตุ้นให้หลั่งมากขึ้น ด้วยฮอริโมนหรือสารบางชนิด เช่น norepinephrine, kisspeptin และ neuropeptide Y เป็นต้น แต่ฮอริโมนและสารบางชนิดสามารถยับยั้งการหลั่งของ GnRH ได้เช่น β -endorphin, progesterone และ interleukin-1 เป็นต้น และฮอริโมนบางชนิด มีผลต่อการเพิ่มหรือการลดการหลั่งของ GnRH ได้เช่น estradiol เป็นต้น (100) นอกจากนี้ยังพบว่า GnRH ยังมีความเกี่ยวข้องกับ aging เพราะในสภาวะที่เกิด aging จะเกิดความบกพร่องของการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ แต่เมื่อมีการรักษาด้วย GnRH แล้วพบว่าฮอริโมนนี้สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ขึ้นมาได้ทั้งในสมองส่วนไฮโปทาลามัสและฮิโปแคมปัส (101, 102) แต่อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างการหลั่งของ GnRH และกลไกการเกิดความชรา ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เนื่องจากยังมีความขัดแย้งกันอยู่ จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด Aging กับ NF- κ B และโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส (99)

2.9 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

1. *Zingiber montanum* (Koenig) (ไพล)

มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Zingiber montanum* (Koenig) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อพ้องคือ *Zingiber cassumunar* Roxb. เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ในประเทศไทย โดยพบว่าเหง้าของไพลสามารถรักษาอาการอักเสบของข้อต่อ การเคล็ดและการฉีกขาดของกล้ามเนื้อ การปวดของกล้ามเนื้อ หนองฝี รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ซึ่งได้แก่ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD), (E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-enyl acetate, cis-3-(3',4'-dimethoxyphenyl)-4-[(E)-3'',4''-dimethoxystyryl]cyclohex-1-ene, cis-3-(3',4'-dimethoxyphenyl)-4-[(E)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene, cis-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(E)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene และ (E)-4-(3'-4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีอาการบวมของหูโดย 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (103) ethyl phenylpropiolate (EPP) และ arachidonic acid (AA) (104) นอกจากนี้ในสารสกัดจากเหง้าไพลที่เป็นน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)buta diene (OMPBO), terpinen-4-ol, rz-terpinene และสารสกัดจากเหง้าไพลด้วยเฮกเซน ซึ่งได้แก่ (E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)-but-3-en-2-ol (Compound D) สามารถลดอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ carrageenan และในหนูที่มีอาการเยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleurisy) สาร compound D สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดหนอง, การสะสมของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวและกระบวนการสร้างสาร prostaglandin ได้อีกด้วย (105, 106) นอกจากนี้กระบวนการอักเสบจากการกระตุ้นด้วย LPS ที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อภายในของฟัน (Dental pulp) ซึ่งมีการแสดงออกของ cyclooxygenase (COX)-2 และ prostaglandin E2 (PGE2) เพิ่มสูงขึ้น สามารถถูกยับยั้งจากสารสกัดจากเหง้าไพลด้วยเอทานอล ได้แก่ cis-3-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-4-[(E)-3'',4''-dimethoxystyryl]cyclohex-1-ene, cis-3-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-[(E)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene และ (E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-diene (DMPBD) (107)

RT	Possible compound ^a	% peak area					
		Hexane extracted plai oil			Distilled plai oil		
		S1	S2	S3	S1	S2	S3
14.047	α -thujene	0.70	-	-	-	0.44	0.60
14.534	α -pinene	0.58	0.69	0.34	1.15	1.53	2.00
17.423	sabinene	39.11	30.39	24.05	36.71	41.39	53.50
17.678	β -pinene	2.43	1.96	1.36	2.25	2.77	3.78
18.772	β -myrcene	2.13	2.03	1.63	1.83	2.15	2.65
21.031	α -terpinene	3.18	2.16	1.83	2.04	2.60	3.39
21.761	p-cymene	0.87	1.66	0.77	0.74	1.63	1.71
22.157	β -phellandrene	0.84	2.34	-	0.74	1.69	1.24
24.986	γ -terpinene	7.54	7.74	6.68	5.27	6.31	7.25
25.829	(Z)-sabinene hydrate	1.25	0.67	0.61	-	-	-
27.495	terpinolene	1.11	0.87	1.00	0.84	0.94	1.09
28.393	(E)-sabinene hydrate	1.07	0.56	0.54	-	0.49	-
30.137	(Z)-p-menth-2-en-1-ol	-	0.54	0.62	-	0.41	-
34.094	terpinen-4-ol	33.11	42.23	49.36	27.00	29.96	21.85
34.898	α -terpineol	-	-	0.76	0.29	-	-
35.958	myrtenol	-	-	0.27	-	-	-
43.570	β -terpinyl acetate	0.21	0.31	0.46	0.29	-	-
51.353	β -sesquiphellandrene	-	0.53	0.27	1.03	0.83	-
54.114	Unknown ¹	-	-	0.26	0.54	0.32	-
55.605	DMPBD	5.52	5.31	8.28	16.16	6.54	0.95
62.309	4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene	0.34	-	0.28	0.21	-	-
67.999	Unknown ²	-	-	0.64	1.91	-	-
	Total oxygenated compounds	40.25	48.95	60.57	43.66	37.40	22.80
	Total non-oxygenated compounds	59.75	51.05	38.53	52.60	62.28	77.20
	Unknown	-	-	0.90	2.54	0.32	-
	Total	100	100	100	100	100	100

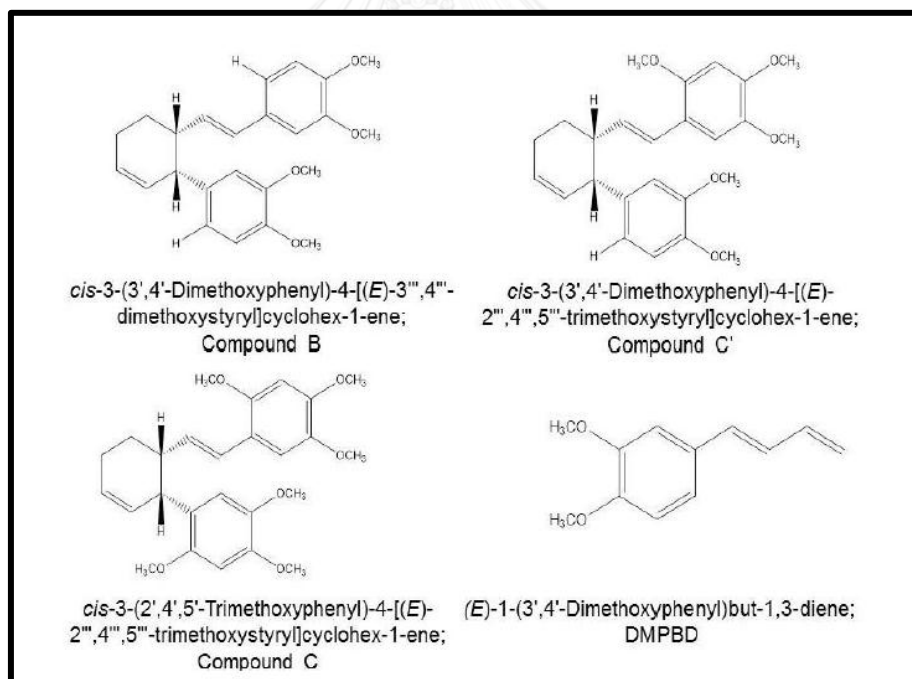
Notes: RT = Retention time; ^a = Compounds are listed in order of their elution from a DB-5 column.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 6 ตารางแสดงสารและปริมาณสารที่พบได้จากการสกัดเหง้าไพล
ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนโดยวิธี GC-MS (108)



ภาพที่ 7 เหง้าไพล (www.ktnature.net)



ภาพที่ 8 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากเหง้าไพล (107)

2. *Thunbergia laurifolia* Lindl (รางจืด)

มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Thunbergia laurifolia* Lindl จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae เป็นสมุนไพรที่พบได้ทางภาคเหนือของประเทศไทย จัดอยู่ในตระกูล Acanthaceae มีสรรพคุณทั่วไปในการถอนพิษ รักษาอาการเมา แก้อ่อนในกระหายน้ำได้ รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ไวรัส ได้อีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารประกอบที่สำคัญภายในรางจืด ได้แก่ apigenin, caffeic acid, flavonoids และ chlorophyll มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (ภาวะ oxidative stress) (109)

การศึกษาใน in vivo พบว่าในหนูแฮมสเตอร์ที่ทำให้ติดเชื้อ *Opisthorchis viverrini* สารสกัดของรางจืดด้วยน้ำสามารถลดการอักเสบของเซลล์ภายใน ซึ่งอาจจะช่วยป้องกันกระบวนการอักเสบที่เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิด *O. viverrini*-associated cholangiocarcinoma ได้ (110) รวมทั้งบรรเทาผลของตะกั่วต่อการเรียนรู้ที่บกพร่องและการสูญเสียความทรงจำ และรักษาระดับ Antioxidant ภายในสมองได้อีกด้วย (111) และในหนูที่เป็นเบาหวานประเภทที่ 1 พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดด้วยน้ำ สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และฟื้นฟู β -cell ได้ (112) นอกจากนี้สารสกัดจากใบรางจืดด้วยเอทานอลและเฮกเซน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการบวมของอุ้งเท้าและไขวของหนูที่เกิดจาก carageenan ได้ (113) โดยสารสกัดจากรางจืดที่ใช้ไม่ทำให้เป็นพิษต่อหนูและไม่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ

นอกจากนี้การศึกษาใน in vitro พบว่าในเซลล์ macrophage เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS จะมีการแสดงออกของ nitric oxide (NO) และ prostaglandin E2 (PGE2) และ TNF- α ในปริมาณที่สูง ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบรางจืดด้วยเอทานอล โดยเฉพาะสาร apigenin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ NO, PGE2 และ TNF- α รวมทั้งลดการแสดงออกของ ยีน COX-2 และ i-NOS ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้าง NO และ PGE2 ได้อีกด้วย (114) ตัวอย่างสารสกัดสำคัญที่พบในรางจืด คือสารในกลุ่ม iridoid glucosides ได้แก่ 8-epi-grandifloric acid และ 3'-O- β -glucopyranosyl-stilbericoside รวมทั้ง benzyl b-lucopyranoside, benzyl b-(20-O-b-glucopyranosyl) glucopyranoside, grandifloric acid, (E)-2-hexenyl b-glucopyranoside, hexanol b-glucopyranoside, 6-C-glucopyranosylapigenin และ 6,8-di-C-glucopyranosylapigenin (115)



ภาพที่ 9 ส่วนใบและดอกกรางจืดสีม่วง (www.oknation.net)

3. *Gynura pseudochina* (L.) DC. Var. *hispida* Thwaites (ว่านมหากาฬ)

มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Gynura pseudochina* (L.) DC. Var. *hispida* Thwaites จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีสรรพคุณทั่วไปในการรักษาแผลปวดบวมที่เกิดจากไฟไหม้ รักษาอาการติดเชื้อเริ่มใช้เป็นยาพอกฝี และมีคุณสมบัติทั่วไปในการยับยั้งการอักเสบได้

จากการศึกษาใน in vitro ที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากใบของว่านมหากาฬด้วยน้ำและเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเชื้อ HIV-1 สารสกัดหยาบจากใบของว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B และยับยั้งการหลั่งของ IL-1 β , Prostaglandin (GE2) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa การศึกษาต่อมาพบว่า สารสำคัญที่พบในสารสกัดจากใบว่านมหากาฬด้วยเมทานอล ได้แก่ quercetin 3-rutinoside, 3,5-di-caffeoylquinic acid, 4,5-di-caffeoylquinic acid และ 5-mono-caffeoylquinic acid ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง NF- κ B โดยสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง NF- κ B สูงที่สุด ได้แก่ quercetin 3-rutinoside (10, 116)



ภาพที่ 10 ส่วนใบของว่านมหากาฬ (www.samunpri.com)

จากการทบทวนวรรณกรรมของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ถึงผลงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ พบว่าการศึกษายังไม่เป็นที่แพร่หลายและการศึกษาถึงกลไกในการต้านการอักเสบในระบบประสาทยังพบน้อยมาก โดยเฉพาะกลไกต้านการอักเสบผ่าน NF- κ B signaling pathway และความเชื่อมโยงของฤทธิ์ต้านการอักเสบและการหลั่งของฮอร์โมน โกลนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ที่คณะผู้วิจัยมีความสนใจ จึงเป็นที่มาของการศึกษาพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Hexane	RCI Labscan, ไทย
Ethanol	RCI Labscan, ไทย
Methanol	RCI Labscan, ไทย
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merk, เยอรมันนี
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum	Gibco, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin	Corning, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
1X EDTA-Trypsin 0.25%	Gibthai, ไทย
Trypan Blue Stain 0.4%	Gibthai, ไทย
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	Bio basic Inc., แคนาดา
Trizol RNA isolation reagent	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
2-isopropanol	Merk, เยอรมันนี
เอนไซม์ DNase	Promega, สหรัฐอเมริกา
Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas, แคนาดา
เอนไซม์ Reverse transcriptase	Fermentas, แคนาดา

AccuPower 2X GreenStar	Bioneer, เกาหลี
น้ำยา CER I	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
น้ำยา CER II	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
น้ำยา NER	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
Bradford reagent	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
30% Acrylamide and Bis-Acrylamide Solution	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
Sodium Lauryl Sulphate (SDS)	Bio basic Inc., แคนาดา
Ammonium persulfate	Omnipur, เยอรมันนี
Protein ladder 100 bp	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
Tris	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
Tris HCL	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
Glycine	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
Tween-20	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
Bovine Serum Albumin (BSA)	GE healthcare, อังกฤษ
Sodium chloride	Merk, เยอรมันนี
ECL-selected substrate	GE healthcare, อังกฤษ
GBX-Developer	Kodak, สหรัฐอเมริกา
GBX-Fixer	Kodak, สหรัฐอเมริกา
Primary antibodies (p65, β -actin, lamin)	Cell Signaling, สหรัฐอเมริกา

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus, ญี่ปุ่น
กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast	Olympus, ญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (NanoDrop 100)	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader Instrument, Inc.	BioTek, สหรัฐอเมริกา
เครื่อง Exicycler Real time Quantitative Thermal Block	Bioneer, เกาหลี
เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOREDO, สวิตเซอร์แลนด์
เครื่อง Soxhlet extractor	Merck, เยอรมันนี
เครื่อง Rotatory Evaporator รุ่น miVAC	Genevac, อังกฤษ
เครื่อง Thermal cycler รุ่น Mastercycler EP	Eppendorf AG, เยอรมันนี
เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc)	Syngene, อังกฤษ
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Fine vortex	FINEPCR, เกาหลีใต้
pH meter	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
เครื่อง Vacuum concentrator (DNA speedVacs)	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific. เกาหลีใต้
เครื่อง Centrifuge Waterbath	Beckman Coulter, สหรัฐอเมริกา
ตู้อบสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด CO ₂	Memmert, เยอรมันนี
ตู้อบ (Incubator)	Sheldon, สหรัฐอเมริกา
ตู้อบ (Hot air oven)	Memmert, เยอรมันนี

Laminar flow cabinet	Labconco, สหรัฐอเมริกา
ถัง liquid nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON, สหรัฐอเมริกา
ตู้เย็น 4°C	Sharp, ญี่ปุ่น
ตู้แช่แข็ง -20°C	SANYO Electric Co.,Ltd., เกาหลีใต้
ตู้แช่แข็ง -80°C	llShin Lab, เกาหลีใต้
เครื่องทำน้ำ Milli-Q	MERK Millipore, สหรัฐอเมริกา

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

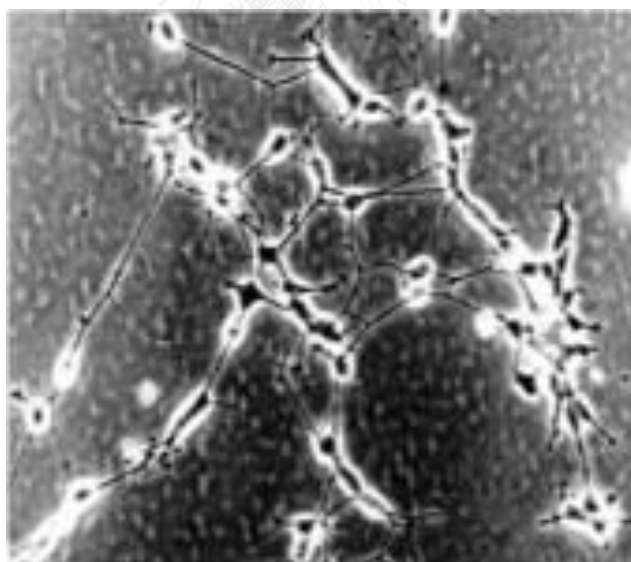
6 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
12 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
60x15 mm Petri Dish	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Cell culture flask (ขนาด 25 และ 75 cm ²)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette (5 และ 10 mL)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube	Simport plastics, แคนาดา
Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL	Continental Lab, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (ขนาด 15 และ 50 mL)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 µL)	GILSON, ฝรั่งเศส
Auto pipette (ขนาด 10, 20, 200, 1000 µL)	Eppendorf AG, เยอรมันนี
Multichannel pipette	Eppendorf AG, เยอรมันนี
Pasture pipette	Copan Innovation, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 µL)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Syringe Filter	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
กระดาษกรอง	GE healthcare, อังกฤษ

Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane	GE healthcare, อังกฤษ
HyperFilm ECL	GE healthcare, อังกฤษ

3.4 ระเบียบวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด GT1-7 ถูกสร้างมาจากเซลล์ gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-secreting GT1 cell ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด immortalized ของสมองส่วนไฮโปทาลามัส เพราะถูกสร้างโดยกระบวนการที่ทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งในเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของโคโนโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน โดยให้มีการแสดงออกของ SV40 T-antigen oncogene ที่บริเวณ 5' regulatory ของยีน GnRH ภายในหนูที่ถูกตัดต่อทางพันธุกรรมแล้ว ส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับโคโนโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน และพื้นฐานกลไกทางชีวภาพของระบบประสาทในสมองส่วนไฮโปทาลามัส เป็นต้น (91, 117-120)



ภาพที่ 11 Immortalized GnRH-secreting GT1-7 cells (<http://blogs.oregonstate.edu>)

โดยเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Pamela Mellon แห่งมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย

อาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบไปด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5 g/L glucose + Supplements (110 mg/L pyruvate, 548 mg/L L-glutamine) ชนิด high glucose, Fetal bovine serum 10% และ Antibiotic penicillin/streptomycin 1%

วิธีการวิจัย

เลี้ยงเซลล์ Immortalized GnRH-secreting GT1-7 cell ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose + 1% Antibiotic penicillin/streptomycin เพาะเลี้ยงในตู้ Incubater ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C และมี CO₂ ปริมาณ 5%

3.4.2 การสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิค Soxhlet extraction

Soxhlet extraction เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ โดยให้ความร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอขึ้นไป แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวผ่านลงไปยัง thimble ซึ่งมีสารที่เราต้องการสกัดบรรจุเอาไว้ (มักอยู่ในรูปของแข็ง) จากนั้นตัวทำละลายที่ได้สัมผัสกับสารจะไหลลงสู่ขวดรองรับ ทั้งสารที่สกัดได้ไว้ในขวดรองรับ ส่วนตัวทำละลายที่พาสารสกัดลงมาจะถูกระเหยกลับขึ้นไปแล้วกลั่นตัวกลับลงมายังสารที่ต้องการสกัดใน thimble เกิดขึ้นซ้ำๆ จนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ โดยสังเกตจากความใสของสีตัวทำละลายที่อยู่บริเวณ thimble



ภาพที่ 12 เครื่อง Soxhlet extractor

ตารางที่ 2 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	Herbarium number	ส่วนที่ใช้ศึกษา
รางจืด	<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl	Acanthaceae	A013700 (BCU)	ใบ
ไพล	<i>Zingiber montanum</i> (Koenig)	Zingiberaceae	A013701 (BCU)	เหง้า
ว่านมหากาฬ	<i>Gynura pseudochina</i> (L.) DC. Var. <i>hispida</i> Thwaites	Compositae (Asteraceae)	A013733 (BCU)	ใบ

โดยสมุนไพรทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง เดินทางไปเก็บพืชสมุนไพรในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556



ภาพที่ 13 ส่วนของเหง้าไพลที่ผ่านการตากแห้ง



ภาพที่ 14 ส่วนของใบรางจืดที่ผ่านการตากแห้ง



ภาพที่ 15 ส่วนของใบว่านมหากาฬที่ผ่านการตากแห้ง

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร ได้แก่ เฮกเซน และแอลกอฮอล์ (เอทานอล: รางจืดและไพล)
และ (เมทานอล: ว่านมหากาฬ)

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนการสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิค Soxhlet extraction

เริ่มจากนำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมาทำความสะอาด โดยล้างน้ำเปล่าให้สะอาดประมาณ 3 ครั้งเสร็จแล้วตัดหรือหั่นสมุนไพรให้เป็นชิ้นเล็กๆบางๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้พืชแห้งเร็วมากขึ้นแล้วนำไปตากลมทิ้งไว้ 2-3 วัน จากนั้นนำเข้าตู้อบ ตั้งอุณหภูมิไว้ประมาณ 40°C-50°C จนพืชแห้งสนิทน้ำหนักคงที่ จึงนำมาบดให้ละเอียดเก็บใส่ถุงพลาสติกซิปล็อคไว้ เมื่อจะสกัดสมุนไพรให้ซึ่งผงสมุนไพรที่บดแล้วปริมาณ 40 กรัมใส่ลงใน Cellulose Extraction Thimbles แล้วจึงนำไปใส่ใน Thimble ของเครื่อง Soxhlet Extractor ส่วนตัวทำละลายใส่ลงใน Boiling Flask ปริมาณ 400 mL (สมุนไพร: ตัวทำละลาย = 1:10) จากนั้นใส่เศษกระดาษ 2-3 ชิ้นลงใน Boiling Flask เพื่อกั้นไม่ให้ตัวทำละลายเดือดเกินไปจนทำให้ flask แตกเสียหาย แล้วจึงใส่ตัวทำละลายลำดับที่ 1 ลงไป (เฮกเซน) เริ่มให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายที่อยู่ใน Boiling Flask จนถึงจุดเดือด เมื่อตัวทำละลายเดือดแล้วจะระเหยขึ้นไปแล้วไปกระทบ condenser ที่หล่อเย็นไว้จนทำให้เกิดการควบแน่นกลับมาสัมผัสกับผงสมุนไพรที่อยู่ใน Cellulose Extraction Thimbles โดยตัวทำละลายจะพาสารสกัดผ่านลงมาทาง siphon ไหลลงสู่ Boiling Flask (สารที่สกัดได้จะถูกเก็บไว้ใน Boiling Flask) ส่วนตัวทำละลายจะเกิดการระเหยขึ้นไปแล้วควบแน่นกลับมายัง Cellulose Extraction Thimbles อีก เกิดขึ้นซ้ำหลายๆรอบ จนกระทั่งตัวทำละลายที่ผ่านบริเวณ siphon ใสไม่มีสี (ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายลำดับที่ 1 ใสไม่มีสีจึงเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นลำดับที่ 2 (เอทานอล/เมทานอล) แล้วทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 3-4 เก็บสารสกัดทั้งหมดที่ได้แยกตามชนิดและตัวทำละลายใส่ในขวดดูแรนที่ห่อกระดาษไว้ เพื่อกันให้พ้นจากแสง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotatory evaporator

Evaporation คือการระเหยสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวเพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกจากสารสกัดที่สนใจ ทำให้สารสกัดที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 16 เครื่อง Evaporator

เมื่อระเหยแห้งตัวทำละลายเสร็จแล้ว จนสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น นำสารที่ได้ไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาปริมาณสารที่ได้ (%yield) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\%yield = (\text{ผลที่ได้จริง} / \text{ผลที่ได้ตามทฤษฎี}) \times 100$$

ผลที่ได้จริง = ผลรวมของน้ำหนักสุทธิของสารที่สกัดได้ทั้งหมด

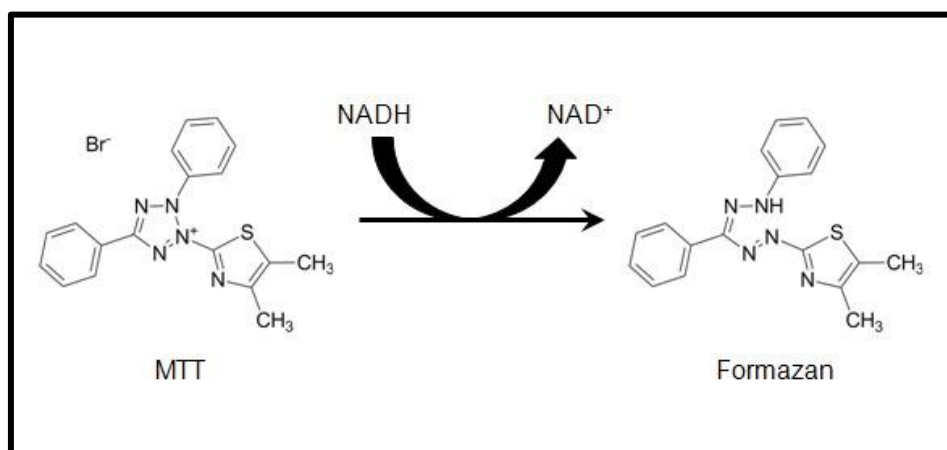
ผลที่ได้ตามทฤษฎี = ปริมาณสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด (ในที่นี้เท่ากับ 40 g)

จากนั้นละลายสารสกัดหยาบของสมุนไพรใน 100% DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ stock เป็น 100 mg/mL เมื่อละลายเสร็จแล้วนำสารสกัดหยาบสมุนไพรกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอนลงใน microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay

หลักการของ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay

เป็นการวัด Metabolic activity ของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ Mitochondrial reductase ที่สามารถรีดิวซ์เปลี่ยนสาร MTT ให้กลายเป็นตะกอนสีม่วงของ formazan ได้ และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นประมาณ 550-570 นาโนเมตร



ภาพที่ 17 ปฏิกิริยา reduction ของ MTT assay (121)

วิธีการวิจัย

ทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยง เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 well plate) โดยใช้จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 20,000 เซลล์ ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม จากนั้นนำเข้าตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C และCO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารดังต่อไปนี้ โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อยคือ

- Herbal extracts only

ทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, เอทานอล และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 μ g/mL หลุมละ 25 μ L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาตรสุดท้ายต่อหลุมเท่ากับ 200 μ L แบ่งการ

ทดสอบเป็นกลุ่ม Control cells (Untreated), DMSO 0.1%, Blank และกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพร (Herbal extracts only)

- Protective effect

ทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, เอทานอล และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลุมละ 25 μL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL หลุมละ 25 μL เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง โดยปริมาตรสุดท้ายต่อหลุมเท่ากับ 200 μL แบ่งการทดสอบเป็น Control cells (Untreated), DMSO 0.1%, Blank, TNF- α only (Positive control) และ Herbal extracts + TNF- α

- Therapeutic effect

กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 ng/mL หลุมละ 25 μL เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง แล้วจึงทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, เอทานอล และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลุมละ 25 μL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาตรสุดท้ายต่อหลุมเท่ากับ 200 μL แบ่งการทดสอบเป็น Control cells (Untreated), DMSO 0.1%, Blank, TNF- α only (Positive control) และ TNF- α + Herbal extracts

เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาหยอดน้ำยา MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ที่ละลายใน PBS หลุมละ 20 μL นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง โดยระวังไม่ให้ดูดตะกอนขึ้นออกมาด้วย จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลาย 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) หลุมละ 100 μL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร สุดท้ายคำนวณ % cell viability

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{Treated cell} - \text{Blank}) \times 100}{(\text{Untreated cell} - \text{Blank})}$$

3.4.4 การทดสอบหาฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนใน NF- κ B signaling pathway ด้วยวิธี Real-time PCR

วิธีการวิจัย

การสกัด Total RNA จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยน้ำยา Trizol

1. ขั้นตอนการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพโรไทยและตัวกระตุ้น

นำเซลล์ GT1-7 มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุมๆละประมาณ 4.5×10^5 เซลล์ จากนั้นนำเข้าสู่เพาะเลี้ยงเชื้อ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C และมี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาทดสอบกับสารดังต่อไปนี้ โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยคือ

- Protective effect

ทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพโรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ

ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดมากกว่า 80% (เลือกความเข้มข้นจากผลการทดลอง MTT assay)

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 ng/mL เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- Therapeutic effect

กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 ng/mL เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อน จากนั้นจึงทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพโรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดมากกว่า 80% (เลือกความเข้มข้นจากผลการทดลอง MTT assay) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ขั้นตอนการสกัด RNA ด้วยน้ำยา Trizol (ทำในสภาวะที่เย็น)

ล้างเซลล์ทั้งหมดด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำยา Trizol ลงไปหลุมละ 1 mL ทั้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารทั้งหมดใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วเติมคลอโรฟอร์มที่เย็นลงไป 200 μ L เขย่าด้วย vortex ประมาณ 20 วินาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C สารทั้งหมดจะแยกชั้นออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนใสบนสุด เป็นชั้นของ RNA, ชั้นตรงกลาง เป็นส่วนของ DNA และชั้นล่างสุด เป็นส่วนของโปรตีนและไขมัน ดูดส่วนใสด้านบนที่เป็น RNA แยกออกมา ส่วนใหญ่จะได้ปริมาตรประมาณ 500 μ L ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ชุดใหม่ เติมสารละลาย 100% isopropanol ที่เย็นลงไปในอัตราส่วน 1:1 กับส่วนใสที่ดูดแยกออกมาได้ (ปกติจะเติมประมาณ 500 μ L) ผสมสารเข้าด้วยกันแบบ inverse ห้ามเขย่าด้วย vortex เด็ดขาด แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณ 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว

12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้งทั้งหมด ตะกอน RNA ที่ได้จะอยู่ที่ก้นหลอด ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ที่ละลายในน้ำ DEPC ปริมาตร 1 mL แล้ว mix ขึ้นลงแบบ inverse แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำประมาณ 3 ครั้ง เมื่อล้างตะกอนครั้งสุดท้ายแล้ว ให้เทส่วนใสทิ้งแล้วตากตะกอนไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอน RNA แห้งสนิท (ระหว่างนี้นำน้ำ DEPC ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C) นำตะกอน RNA ไป speed vac ที่ความเร็วต่ำ ประมาณ 5 นาที เพื่อกำจัดสารจำพวกแอลกอฮอล์ที่อาจจะปนเปื้อนมาได้จากขั้นตอนการสกัด แล้วจึงละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC (ที่อุ่นแล้ว) 30 μ L ตีคั่นหลอดเพื่อให้ตะกอน RNA ละลายในน้ำ DEPC จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5-10 นาที วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop จากนั้นเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนนำไปใช้ต่อไป

การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ Reverse-transcriptase

เริ่มจากนำ RNA ที่สกัดได้มากำจัด DNA ที่อาจปนเปื้อนมาจากการสกัดด้วยเอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I) โดยใช้ความเข้มข้นของ RNA 1 μ g เตรียมส่วนผสมดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยากำจัด DNA

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 reaction (μ L)
10x บัฟเฟอร์ DNase I reaction	1
DNase I	1
RNA	ขึ้นกับความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง
DEPC-treated water	เติมให้ปริมาตรของปฏิกิริยาครบ 10 μ L
รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 10 μ L ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที	

จากนั้นนำมาเติมสารหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนแล้ว นำ RNA ที่สกัดได้มา 10 μ L เปลี่ยนเป็น Complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase ดังตารางที่ 4 โดยใช้ชุด Reverse Transcription แล้วทำการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR

ตารางที่ 4 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาของ Reverse transcriptase

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 reaction (μL)
5x buffer	4
10 nM dNTP Mix	2
10 μM Oligo-dT 20 mer	0.5
Reverse transcriptase	1
RNA	10
DEPC-treated water	2.5
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 μL	

แล้วนำไป Pre-extension ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 5 นาที 1 รอบ, Extension ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 60 นาที 1 รอบ และ Inactivation ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 15 นาที 1 รอบ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเป็นแม่แบบในการทำ Real-time PCR

การทำ Real-time PCR

หลังจากได้ cDNA แล้วนำมาทำ real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาของ AccuPower 2X GreenStar ที่ใช้หลักการของสี Syber green ซึ่งจะเข้าจับ DNA สายคู่ที่ตำแหน่ง minor groove โดยสัดส่วนของสารในการทำปฏิกิริยา real-time PCR แสดงในตารางที่ และ primer ที่ใช้ทั้งหมด แสดงในตารางที่ 5 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 5 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา real-time PCR

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 reaction (μL)
2X Greenstar Master mix	12.5
PCR-F-Primer	1
PCR-R-Primer	1
Template (cDNA)	1
DEPC-treated water	9.5
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 μL	

ตารางที่ 6 ลำดับเบสของ primer ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ยีน	ลำดับเบส		ความยาว ของท่อน PCR
NF- κ B1	forward	5' AAAGCCAGCTTCCGTGTTTG 3'	315 bp
	reverse	5' CCTGCGTTGGATTTTCGTGAC 3'	
NF- κ B2	forward	5' CTTTGGGGACTTCTCTCCCAC 3'	355 bp
	reverse	5' GGATTGGTAGGGGTTGTAGGC 3'	
RelA	forward	5' TTAGCCAGCGAATCCAGACC 3'	334 bp
	reverse	5' TGAGAAAAGGAGCCTCGTGC 3'	
RelB	forward	5' CATAGCCTCGTGGGAAAGAC 3'	353 bp
	reverse	5' CCGCTCTCCTTGTTGATTG 3'	
I κ B- α	forward	5' CTGCCTGGCCAGTGTAGCAGTCTT 3'	152 bp
	reverse	5' CCAAAGTCACCAAGTGCTCCACGAT 3'	

IKK- β	forward	5' GGTGCCTCGAAATCCAGATCA 3'	383 bp
	reverse	5' AGTCCCCACAAATGACGTGC 3'	
TNF- α	forward	5' ATAGCTCCCAGAAAAGCAAGC 3'	258bp
	reverse	5' CACCCCGAAGTTCAGTAGACA 3'	
IL-1 β	forward	5' GCCTTGGGCCTCAAAGGAAAGAATC 3'	282 bp
	reverse	5' GGAAGACACAGATTCCATGGTGAAG 3'	
IL-6	forward	5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'	400 bp
	reverse	5' CTGAAGGACTCTGGCTTTGTCT 3'	
SIRT1	forward	5' TTGGCACCGATCCTCGAAC 3'	209 bp
	reverse	5' CCCAGCTCCAGTCAGAACTAT 3'	
β -actin	forward	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3'	154 bp
	reverse	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'	

เมื่อผสมสารทั้งหมดในปฏิกิริยาแล้ว นำไปเข้าเครื่อง Bioneer Exicycler™ 96 ทำปฏิกิริยาในขั้น Pre-Denaturation ที่ 95°C 10 นาที, Denaturation 95°C 10 นาที, Annealing 57°C 15 วินาที สำหรับ NF- κ B1, NF- κ B2, RelA (p65), RelB, IKK- α , IKK- β , IL-6, SIRT1 และ β -actin, 58°C 15 วินาที สำหรับ IL-1 β และ 62°C 15 วินาที สำหรับ TNF- α ขั้น Extension 72°C 30 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ ยกเว้น TNF- α และ IL-1 β ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นนำค่า C_t ของยีนทั้งหมดมา normalize กับ β -actin และคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีนในรูปแบบจำนวนเท่าโดยใช้สูตร $2^{-\Delta\Delta C_t}$

3.4.5 การทดสอบหากลไกต้านการอักเสบผ่านการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ด้วยวิธี Western blot analysis

วิธีการวิจัย

การสกัดโปรตีน (ทำในที่เย็น)

1. ขั้นตอนการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยและตัวกระตุ้น

นำเซลล์ GT1-7 มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยง หลุมๆละประมาณ 7×10^5 เซลล์ จากนั้นนำเข้าสู่ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และมี CO_2 ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงนำมาทดสอบกับสารดังต่อไปนี้ โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยคือ

- Protective effect

ทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ

ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดมากกว่า 80% (เลือกความเข้มข้นจากผลการทดลอง MTT assay) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย $\text{TNF-}\alpha$ 10 ng/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- Therapeutic effect

กระตุ้นเซลล์ด้วย $\text{TNF-}\alpha$ 10 ng/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อน จากนั้นจึงทดสอบกับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดมากกว่า 80% (เลือกความเข้มข้นจากผลการทดลอง MTT assay) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ขั้นตอนการสกัดโปรตีน

เริ่มจากล้างเซลล์ด้วย PBS ประมาณ 2 รอบ แล้วทำให้เซลล์หลุดด้วย trypsin จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ trypsin ด้วย 10%DMEM แล้วดูดเซลล์ทั้งหมดใส่หลอดทดลองขนาด 15 mL นำไปปั่นที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนเซลล์จะอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS 1 mL แล้วดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ชุดใหม่ นำไปปั่นที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้งให้ได้มากที่สุด แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง สังเกตว่าปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้มีขนาดที่ μL จากนั้นจึงใส่สารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนตามขนาดของตะกอนเซลล์ที่ได้ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงสัดส่วนของสารที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

ปริมาตรตะกอน เซลล์ (μL)	น้ำยา CER1 (μL)	น้ำยา CER2 (μL)	น้ำยา NER (μL)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1,000	55	500

อ้างอิงจากตารางที่ ในกรณีได้ตะกอนเซลล์ปริมาณ 20 μL เมื่อตะกอนเซลล์แห้งแล้ว ใส่น้ำยา CER1 200 μL แล้วรีบ vortex ที่ความแรงสูงสุด 15 วินาที นำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นใส่น้ำยา CER2 11 μL แล้วรีบ vortex ที่ความแรงสูงสุด 5 วินาที นำไปแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 16,000 g เป็นเวลา 5 นาที ส่วนใสที่ได้ คือ Cytoplasmic protein ดูดส่วนใสทั้งหมดออกมาเก็บใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ชุดใหม่ แช่เย็นไว้ ส่วนตะกอนที่อยู่ก้นหลอดจะถูกละลายด้วย น้ำยา NER 100 μL แล้วรีบ vortex ที่ความแรงสูงสุด 15 วินาที นำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที ทำซ้ำอย่างนี้จนครบ 40 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 16,000 g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้ คือ Nuclear protein ดูดส่วนใสทั้งหมดออกมาเก็บใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ชุดใหม่ จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ แล้วจึงเก็บโปรตีนทั้งหมดไว้ที่ -80 °C ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การวัดโปรตีนด้วยน้ำยา Bradford (ทำในที่มืด)

หลักการของ Bradford protein assay

วิธีนี้ใช้หลักการชนิด Dye-binding โดยอาศัยการจับกันของโปรตีนและ Coomassie Brilliant Blue G-25 dye ในสถานะที่เป็นกรด ค่าการดูดกลืนแสงโดยปกติของสารละลายนี้อยู่ที่ 465 นาโนเมตร แต่เมื่อจับกับโปรตีน จะเกิดเป็นสารละลายเชิงซ้อน ค่าการดูดกลืนแสงจะขึ้นไปที่ 595 นาโนเมตร

เริ่มจากเตรียม BSA standard stock ความเข้มข้น 10 mg/mL จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของ BSA standard stock เป็น 1 mg/mL (น้ำกลั่น 900 μ L + BSA standard stock 100 μ L) และเจือจางต่อในอัตราส่วน 1:2 จนได้ความเข้มข้นประมาณ 8-10 ความเข้มข้นเพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน จากนั้นเจือจางโปรตีนที่สกัดมาได้โดย Cytoplasmic protein เจือจางกับน้ำกลั่นโดยใช้อัตราส่วน 1:15 และ Nuclear protein เจือจางกับน้ำกลั่นโดยใช้อัตราส่วน 1:8 จากนั้นดูตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ รวมทั้ง BSA standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ และน้ำกลั่น (blank) ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 10 μ L แล้วใส่น้ำยา Bradford (ที่ผ่านการกรองและเจือจางแล้ว) หลุมละ 200 μ L นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ควรวัดภายใน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน และหาความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่นำมาใช้ในการทดลองอยู่ที่ 10-15 μ g

การทำ Western blot

เริ่มจากการเตรียม Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE Gel) โดย SDS-PAGE Gel ประกอบด้วยเจล 2 ชนิดได้แก่ Separating และ Stacking gel โดย Separating gel ที่ใช้คือ 12% เตรียมได้จาก น้ำกลั่น 4 mL, 30% Acrylamide 3.3 mL, 1.5 M Tris pH 8.8 2.5 mL, 10% SDS 100 μ L, 10% ammonium persulfate 100 μ L และ TEMED 4 μ L (ใส่เป็นลำดับสุดท้าย) Stacking gel ที่ใช้คือ 5% เตรียมได้จาก น้ำกลั่น 3.4 mL, 30% Acrylamide 830 μ L, 1.0 M Tris pH 6.8 630 μ L, 10% SDS 50 μ L, 10% ammonium persulfate 50 μ L และ TEMED 5 μ L (ใส่เป็นลำดับสุดท้าย) ตามตารางที่ 8 เริ่มจากใส่ Separating gel ลงไปในกระบอกที่เตรียมไว้ประมาณ 4 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อไล่ฟองอากาศ รอจนกระทั่ง Separating gel แข็งตัว ประมาณ 15-20 นาที จากนั้นจึงใส่ Stacking gel ลงไปประมาณ 2-3 mL และใส่หัวลงไปในกระบอกเพื่อสร้างหลุมสำหรับหยอดโปรตีน รอจนกระทั่งเจลแข็ง จึงดึงหัวออก แล้วนำไปแช่ใน 1% Running buffer เพื่อเตรียมรันแยกโปรตีน

ตารางที่ 8 สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบใน Separating และ Stacking gel

สารเคมี	Separating gel (12%)	Stacking gel (5%)
น้ำกลั่น	4 mL	3.4 mL
30% Acrylamide	3.3 mL	830 μ L
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL	-
1.0 M Tris pH 6.8	-	630 μ L
10% ammonium persulfate (APS)	100 μ L	50 μ L
10% SDS	100 μ L	50 μ L
TEMED	4 μ L	5 μ L
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10 mL	5 mL

โดยโปรตีนที่ใช้ในการรัน เตรียมได้จากการผสมโปรตีนและสี Leamli ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มให้ร้อนที่อุณหภูมิ 95°C ประมาณ 10-15 นาที จากนั้นหยอดโปรตีน รวมทั้ง protein ladders ลงในเจลที่เตรียมไว้ซึ่งอยู่ในแผ่นกระจกที่ประกบกันอยู่ใน 1X Running buffer จ่ายกระแสไฟเข้าไป 70 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อรันโปรตีนให้ผ่าน Stacking gel จากนั้นเพิ่มกระแสไฟเป็น 120-130 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เพื่อรันโปรตีนให้ผ่าน Separating gel ลงมา ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ลงมาบน Separating gel ขึ้นกับมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้น และกระแสไฟฟ้าที่ใช้รวมทั้งเวลาในการรันโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการ

เมื่อครบเวลาของการรันแยกโปรตีนแล้ว ต่อไปจึงย้ายโปรตีนที่แผ่นเจลลงบนแผ่นเมมเบรน Polyvinylidene difluoride (PVDF) โดยก่อนใช้แผ่นเมมเบรนให้แช่ในเมทานอลก่อน 5 นาที แล้วแช่ใน 1X Transfer buffer อีก 5 นาที แล้วจึงนำมาใส่ในแผ่นพลาสติกที่มีฟองน้ำและกระดาษกรองเรียงกันอยู่ โดยเริ่มจากวางฟองน้ำลงไปบนแผ่นพลาสติก ตามด้วยกระดาษกรองประมาณ 3 แผ่น จากนั้นแกะแผ่นเจลออกจากกระจกและนำมาวางลงบนกระดาษกรอง โดยให้ protein ladders อยู่ทางด้านซ้ายของกระดาษกรอง และวางแผ่นเมมเบรนลงไปให้คลุมทั้ง protein ladders และโปรตีนที่ต้องการ

แล้วใช้กระดาษกรองอีก 3 แผ่นและ ฟองน้ำวางปิดทับลงไปตามลำดับ แล้วใส่ 1X Transfer buffer ที่เย็นลงไป จากนั้นจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้าไป 150 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 60 นาที

เมื่อเสร็จแล้วนำแผ่นเมมเบรนที่มีโปรตีน block ลงใน 5% non-fat dry milk ที่ละลายใน TBS-T buffer เป็นเวลา 60-75 นาทีเพื่อป้องกันการเกิดโปรตีนที่ไม่จำเพาะ (non-specific protein) จับบนแผ่นเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T buffer 3 ครั้งๆละ 10-15 นาที แล้วใส่ primary antibody ได้แก่ NF- κ B p65 (1:4000), lamin (1:1000) และ β -actin (1:16,000) บ่มไว้ตลอดทั้งคืน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T buffer อีก 3 ครั้งๆละ 15-20 นาที แล้วบ่มแผ่นเมมเบรนด้วย HRP-linked secondary antibody (1:16000) 45 นาที แล้วล้างด้วย TBS-T buffer อีก 3 ครั้งๆละ 15-20 นาที

จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปประกบฟิล์มเพื่อตรวจดูว่ามีการแสดงออกของโปรตีนหรือไม่ ด้วยเทคนิค Immuno chemiluminescence detection โดยใช้น้ำยา ECL western blot substrate ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 หยดลงบนแผ่นเมมเบรน ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที บางครั้งจะเกิดการเรืองแสงขึ้นแต่ไม่จำเพาะกับโปรตีนทุกตัว จากนั้นนำแผ่นฟิล์ม X-ray ตัดให้มีขนาดประมาณแผ่นเมมเบรน วางประกบลงบนแผ่นเมมเบรน เวลาที่ใช้ในการประกบขึ้นอยู่กับสัญญาณการเรืองแสงบนแผ่นเมมเบรน ถ้ามีการเรืองแสงจะใช้เวลาในการประกบไม่นาน แต่ถ้าไม่มีการเรืองแสง อาจต้องใช้เวลานานในการประกบ เมื่อประกบเสร็จแล้วนำไปแช่ในน้ำยา Developer ที่เตรียมไว้ รอจนให้แบนโปรตีนขึ้นมาจึงนำออกแล้วนำไปล้างในน้ำ แล้วนำไปแช่ในน้ำ Fixer ต่ออีกประมาณ 1 นาทีเพื่อให้แผ่นฟิล์ม X-ray ใสขึ้นและแบนโปรตีนคมชัดขึ้น แล้วล้างออกด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง รอให้แห้ง แล้วนำไปวัดปริมาณแบนที่เกิดขึ้นเพื่อวิเคราะห์ดูการแสดงออกของโปรตีนด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system)

3.4.6 การทดสอบหาปริมาณการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน ด้วยวิธี ELISA

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนการทดสอบกับสารสกัดหยาดจากสมุนไพรรไทยและตัวกระตุ้น

นำเซลล์ GT1-7 มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงขนาด 12 หลุม หลุมๆละประมาณ 2×10^5 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose + 10% Charcoal stripped fetal bovine serum + 1% Antibiotic penicillin/streptomycin จากนั้นนำเข้าสู่ภาวะเลี้ยงเชื้อ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C และมี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาทดสอบกับสารดังต่อไปนี้ โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยคือ

- Protective effect

ทดสอบกับสารสกัดหยาดจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดมากกว่า 80% (เลือกความเข้มข้นจากผลการทดลอง MTT assay) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- Therapeutic effect

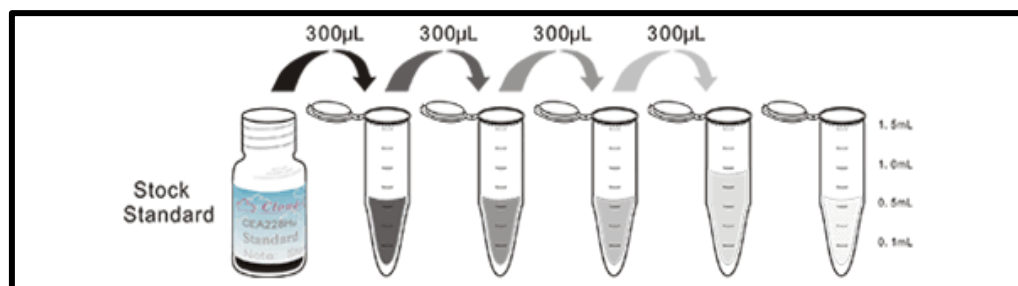
กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อน จากนั้นจึงทดสอบกับสารสกัดหยาดจากสมุนไพรไทย ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดมากกว่า 80% (เลือกความเข้มข้นจากผลการทดลอง MTT assay) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์

ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วนำไปปั่นที่ 1000 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ เก็บไว้ที่ -20°C ได้ประมาณ 1 เดือนและเก็บที่ -80°C ได้ประมาณ 2 เดือน

หลักการของ Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) ใช้เทคนิค the competitive inhibition enzyme immunoassay โดย monoclonal antibody ที่จำเพาะกับ GnRH จะถูกติดลงบนก้นหลุม โดย GnRH ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin กับ GnRH ที่ไม่ได้ถูกติดฉลาก (ในสารละลายมาตรฐานและในตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์) จะแย่งกันจับกับ GnRH monoclonal ที่อยู่บนหลุม หลังจากบ่มไว้ฮอร์โมนที่ไม่ได้ถูกจับจะถูกล้างออก จากนั้น avidin ที่ conjugate กับ Horseradish Peroxidase (HRP) จะถูกใส่ลงไปหลุมปฏิกิริยาด้วย ซึ่งปริมาณของ bound HRP conjugate จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ GnRH ในตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังจากใส่ substrate แล้ว ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ GnRH ในตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์เช่นกัน



ภาพที่ 18 การเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

ขั้นตอนการทำ ELISA

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1000, 333.33, 111.11, 37.04, 12.35, 4.35 และ blank 0 pg/mL โดยเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ Standard Diluent จากนั้นดูดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆและตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 50 μ L ลงใน Pre-coated 96 well plate และเติมน้ำยา Detection A ลงไป 50 μ L เขย่าเบาๆและปิดปากหลุมด้วยพลาสติกใส บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้ถูกจับด้วย 1X Washing solution หลุมละ 350 μ L ทั้งหมด 5 ครั้ง ให้แน่ใจว่าที่ก้นหลุมแห้งสนิท จึงใส่น้ำยา Detection B ลงไป 100 μ L เขย่าเบาๆและปิดปากหลุมด้วยพลาสติกใส บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้ถูกจับด้วย 1X Washing solution หลุมละ 350 μ L ทั้งหมด 3 ครั้ง ให้แน่ใจว่าที่ก้นหลุมแห้งสนิท จึงใส่ substrate ลงไป หลุมละ 90 μ L เขย่าเบาๆและปิดปากหลุมด้วยพลาสติกใส บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 15-25 นาที สารละลายจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีฟ้า จากนั้นจึงใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยา ลงไป หลุมละ 50 μ L แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการศึกษาทั้งหมดจะถูกนำเสนอในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ในแต่ละการทดสอบจะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน จากนั้นข้อมูลจะถูกนำวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistic Ver.17 โดยใช้ตัวสถิติคือ One-way ANOVA ร่วมกับ Post-hoc ชนิด Dunnett's test เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างที่เป็นสารสกัดสมุนไพรเทียบกับตัว Positive control และตัว Positive control เปรียบเทียบกับ Untreated control ที่ระดับนัยสำคัญ (P-value) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.01, 0.05 จะถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลจากการสกัดพืชสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทานอล และเมทานอล

สมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไพล, รางจืด และว่านมหากาฬ ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง เดินทางไปเก็บพืชสมุนไพรในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรส่วนที่เป็นใบ, ดอก ทำให้แห้งและส่งพิสูจน์อัตลักษณ์โดย ศาสตราจารย์ กลิน สุวะตะพันธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลจากการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพร ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลจากการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

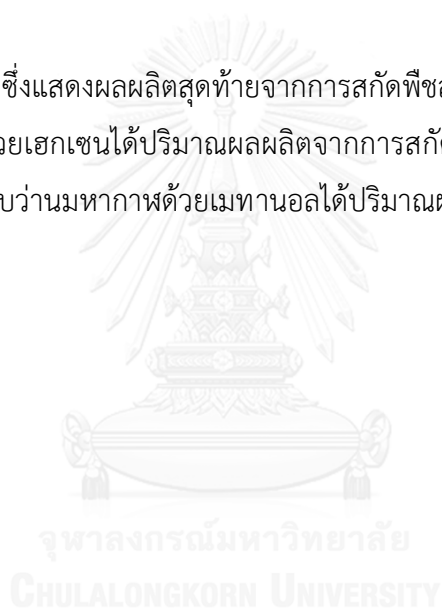
สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	Herbarium number
รางจืด	<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl	Acanthaceae	A013700 (BCU)
ไพล	<i>Zingiber montanum</i> (Koenig)	Zingiberaceae	A013701 (BCU)
ว่านมหากาฬ	<i>Gynura pseudochina</i> (L.) DC. Var. <i>hispida</i> Thwaites	Compositae (Asteraceae)	A013733 (BCU)

จากการสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดโดยสกัดเหง้าไพลและใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอล สกัดใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอล โดยใช้การสกัดแบบ Soxhlet extraction และผ่านการทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยเครื่อง Rotatory evaporation ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบที่ได้ (%yield) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลจากการคำนวณปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

ส่วนของสมุนไพร ที่ใช้ในการศึกษา	ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield)		
	เฮกเซน	เอทานอล	เมทานอล
เหง้าไพล	6.39	8.35	-
ใบรางจืด	0.61	8.42	-
ใบว่านมหากาฬ	0.68	-	12.72

จากตารางที่ 10 ซึ่งแสดงผลผลิตสุดท้ายจากการสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดพบว่าการสกัดเหง้าไพลและใบรางจืดด้วยเฮกเซนได้ปริมาณผลผลิตจากการสกัดน้อยที่สุดคือ 0.61 และ 0.68% ตามลำดับ ส่วนการสกัดใบว่านมหากาฬด้วยเมทานอลได้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบมากที่สุดคือ 12.72%

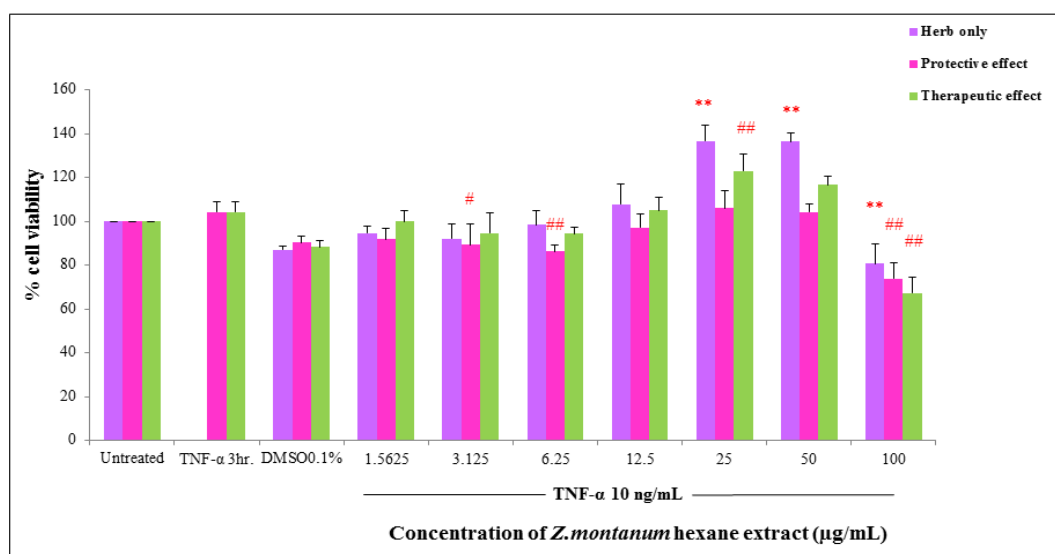


4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay

เมื่อได้สารสกัดหยาบจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย TNF- α โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ GT1-7 ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 20,000 เซลล์ จากนั้นแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ชนิดคือ 1) Herb only ทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ในช่วงความเข้มข้น 0-100 $\mu\text{g/mL}$ และ DMSO 0.1% (เป็นปริมาณที่มีเทียบเท่าในสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นสูงที่สุด กับเซลล์ GT1-7 ปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2) Protective effect ทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด และ DMSO 0.1% กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง 3) Therapeutic effect กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด และ DMSO 0.1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกลุ่มที่ 2) และ 3) ใช้เซลล์ GT1-7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ DMSO 0.1% เป็น positive control ซึ่งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เทียบเป็น 100% ของกลุ่มเซลล์ปกติที่ไม่ถูกทดสอบ (Untreated group) โดยจะเลือกความเข้มข้นของสมุนไพรที่มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 80% เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 3 ชั่วโมง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

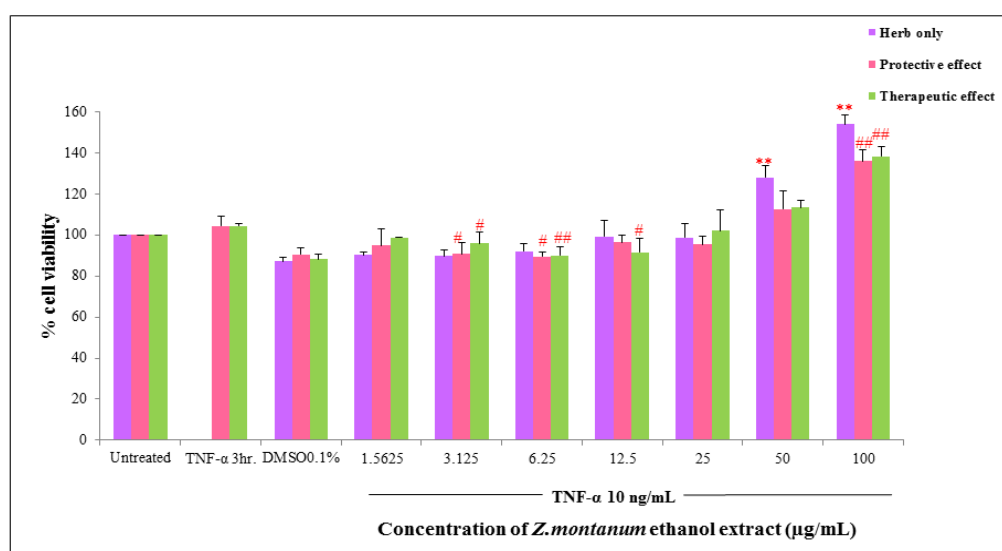


ภาพที่ 19 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-12.5 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 25-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่

ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-12.5 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 25-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ และที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนคือ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 19

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล

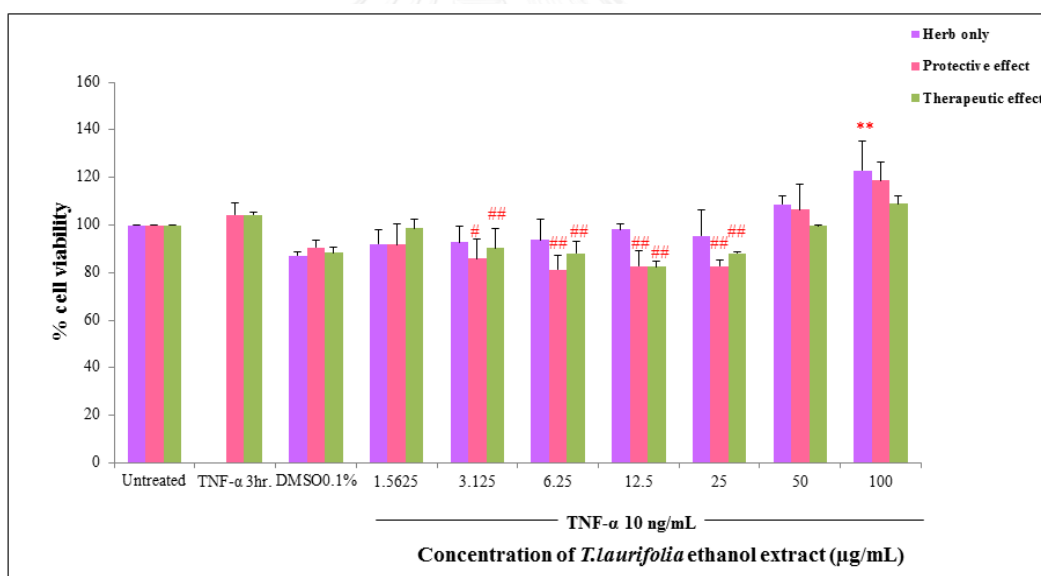


ภาพที่ 20 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทแพะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทแพะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของ

เซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-25 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 50-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect และ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลคือ 25 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 20

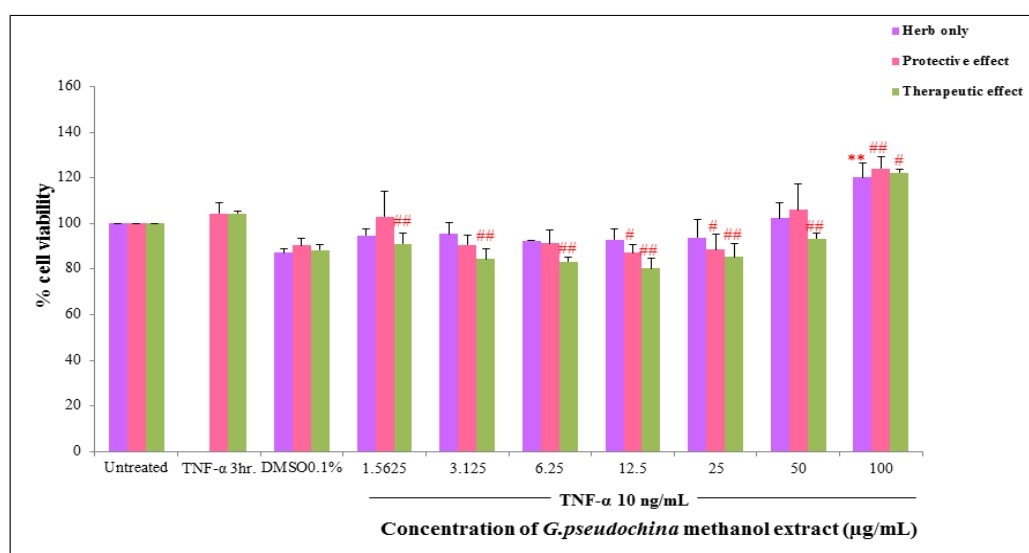
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล



ภาพที่ 21 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect และ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลคือ 50 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 21

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล



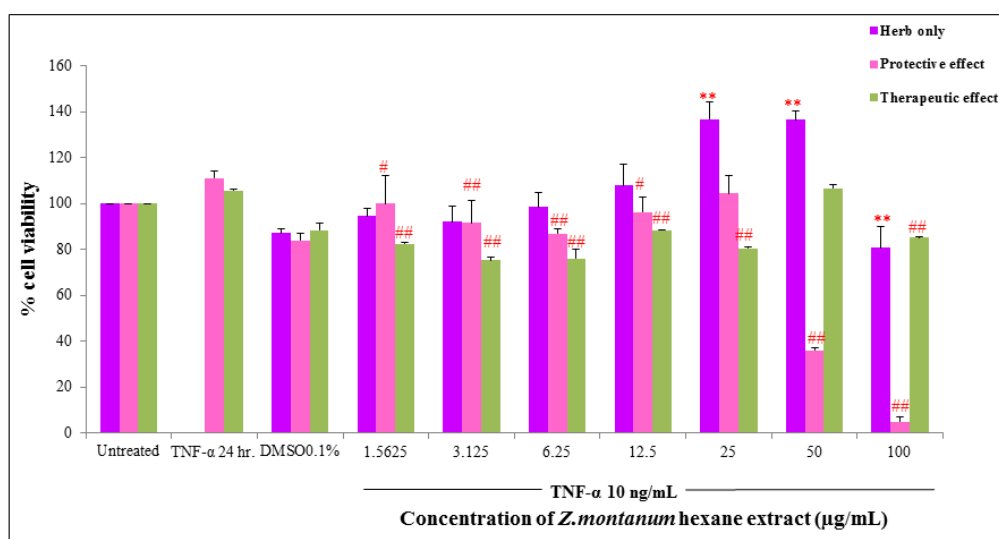
ภาพที่ 22 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำ

การทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำลายเมทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของ เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect และ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำลายเมทานอลคือ 50 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 22

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 24 ชั่วโมง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

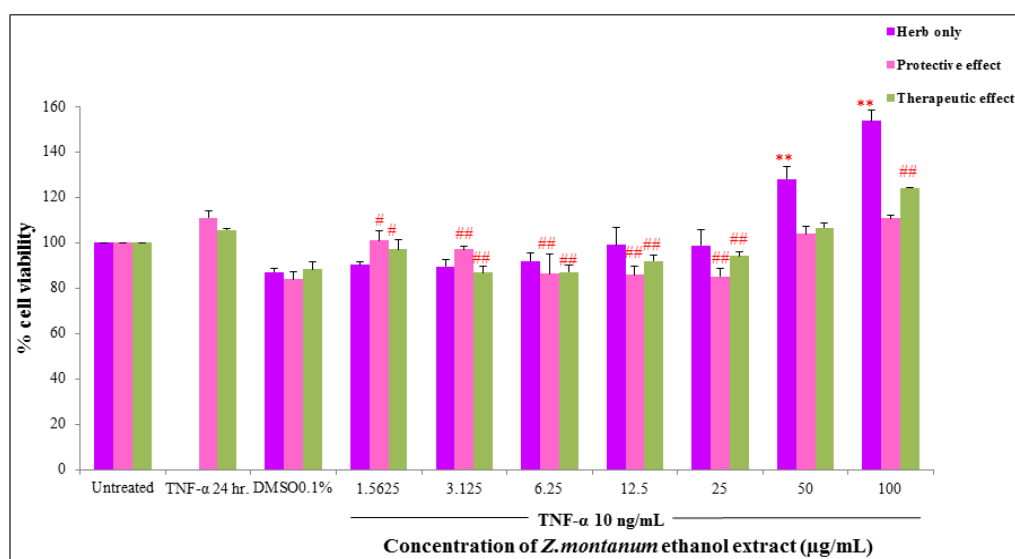


ภาพที่ 23 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-12.5 µg/mL เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 25-50 µg/mL เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-25 µg/mL เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความ

เข้มข้น 50-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนคือ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 23

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล

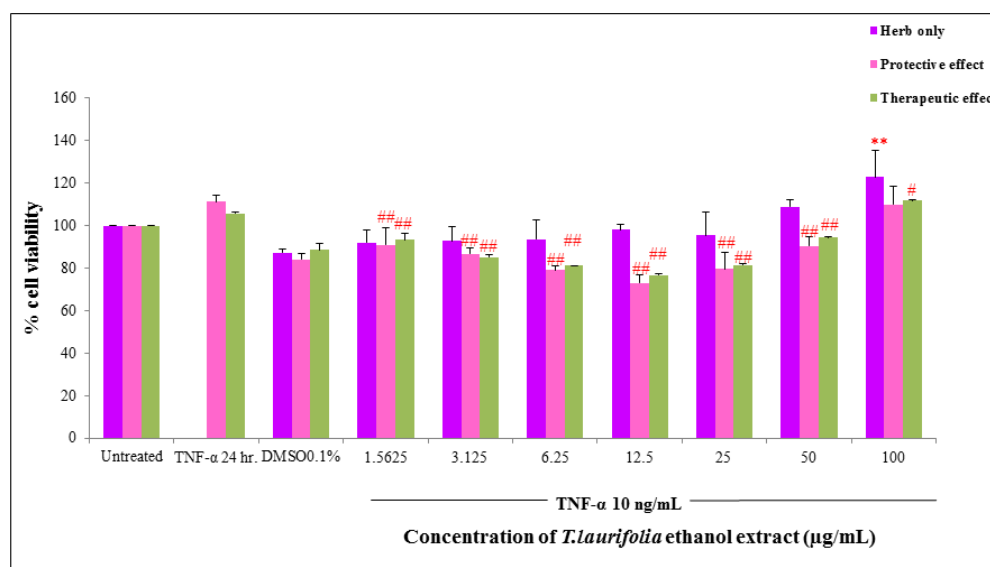


ภาพที่ 24 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-25

$\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 50-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% ในกลุ่มการทดสอบที่ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของเหง้าโพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนคือ 25 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 24

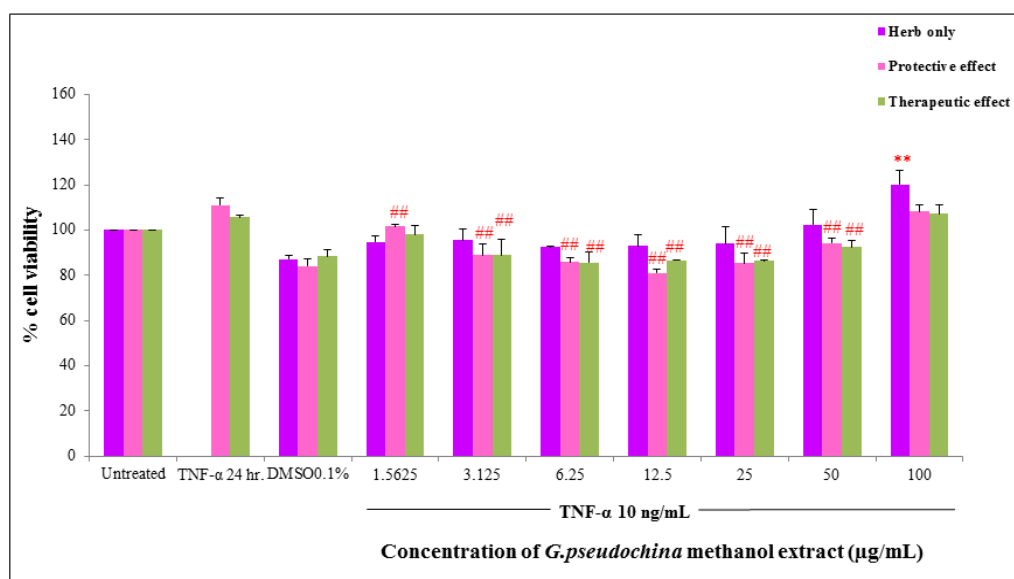
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล



ภาพที่ 25 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect และ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอลคือ 50 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 25

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล



ภาพที่ 26 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยในกลุ่มการทดสอบที่ 1) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ Untreated group ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) และ 3) จะเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กับ TNF- α -treated group พบว่าในกลุ่มการทดสอบที่ 1) Herb only ที่ความเข้มข้น 1.5625-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดสอบที่ 2) Protective effect และ 3) Therapeutic effect ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญ จากการเทียบอัตราการรอดชีวิตในการทดสอบทั้ง 3 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอลคือ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 26



ตารางที่ 11 สรุปลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี MTT assay

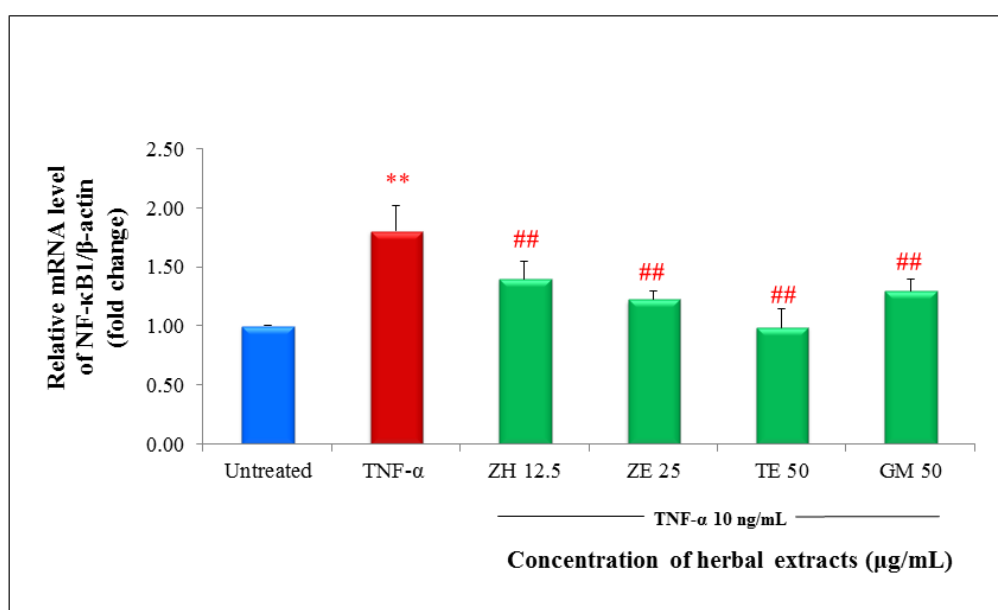
Herbal extracts	TNF- α	Effects	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)
ZH (<i>Zingiber montanum</i> (Koenig) rhizome hexane extract)	3 hours	Protective effect	12.5
	24 hours	Therapeutic effect	12.5
ZE (<i>Zingiber montanum</i> (Koenig) rhizome ethanol extract)	3 hours	Protective effect	25
	24 hours	Therapeutic effect	25
TE (<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl leaf hexane extract)	3 hours	Protective effect	50
	24 hours	Therapeutic effect	50
GM (<i>Gynura pseudochina</i> (L.) DC. Var. <i>hispida</i> Thwaites leaf methanol extract)	3 hours	Protective effect	50
	24 hours	Therapeutic effect	50

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B และ ยีนเป้าหมายของ NF- κ B ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี Real-time PCR

เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของระดับยีนของ NF- κ B และยีนเป้าหมายของ NF- κ B เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL และฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกของระดับยีนของ NF- κ B และยีนเป้าหมายของ NF- κ B จึงเพาะเลี้ยงเซลล์ GT1-7 ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม หลุมละ 450,000 เซลล์ จากนั้นแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชนิดคือ 1) Protective effect ทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร โดยเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมจากวิธี MTT ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2) Therapeutic effect กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการแสดงออกของแต่ละยีน จะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนกับ β -actin แล้วนำมาเปรียบเทียบเป็นจำนวนเท่าเทียบกับกลุ่มเซลล์ปกติที่ไม่ถูกทดสอบ (Untreated group) และกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α เป็น positive control

4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B และ ยีนเป้าหมายของ NF- κ B ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect

ผลการแสดงออกของยีน NF- κ B1



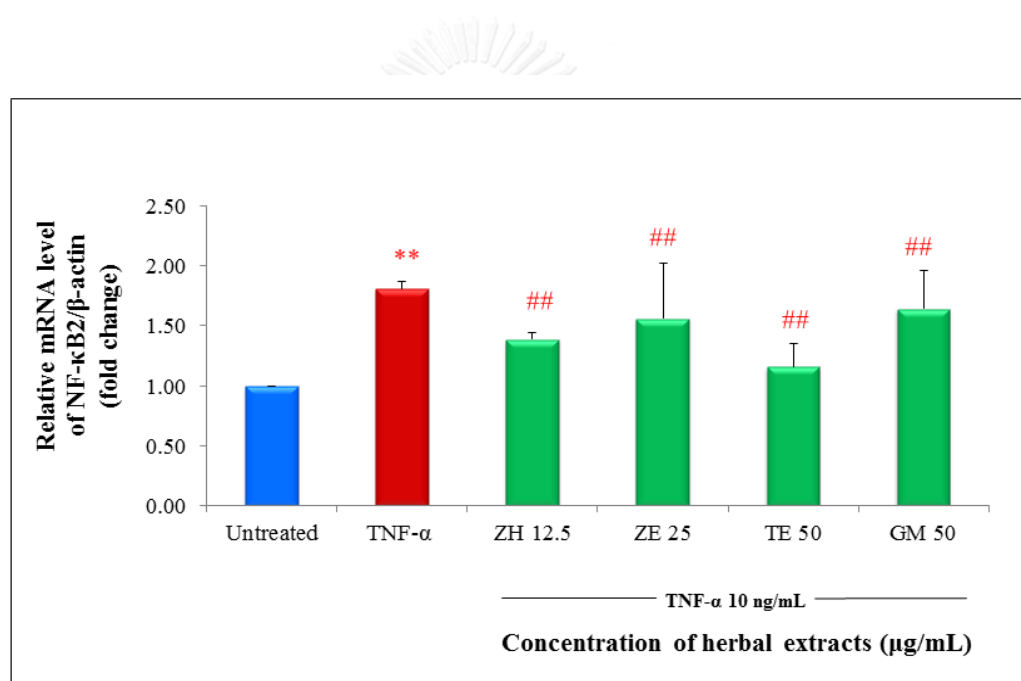
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 27 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน NF- κ B1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทา

นอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน NF- KB1 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน NF- KB1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ NF- KB1 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 27

ผลการแสดงออกของยีน NF- KB2

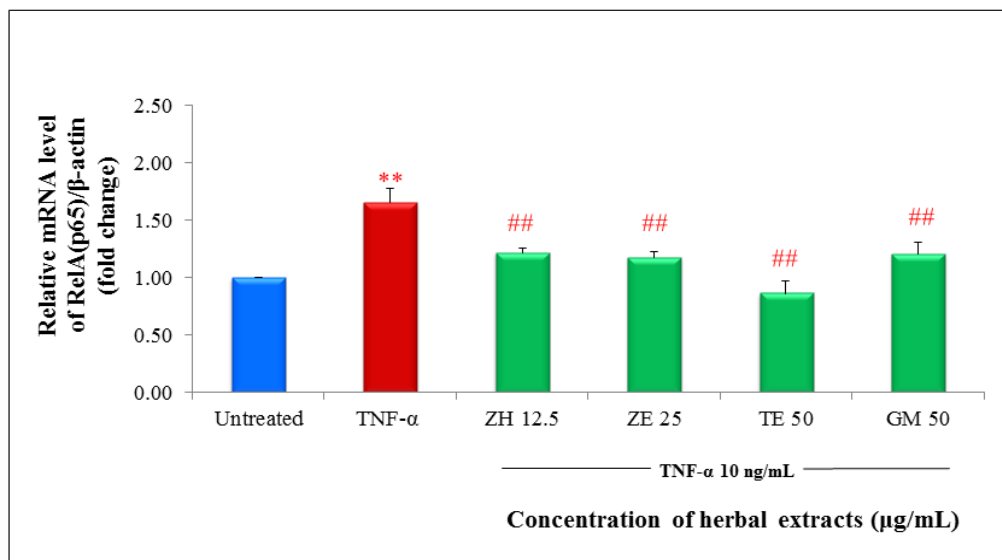


ภาพที่ 28 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน NF- KB2 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน NF-KB2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน NF-KB2 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน NF-KB2 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ NF-KB2 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 28



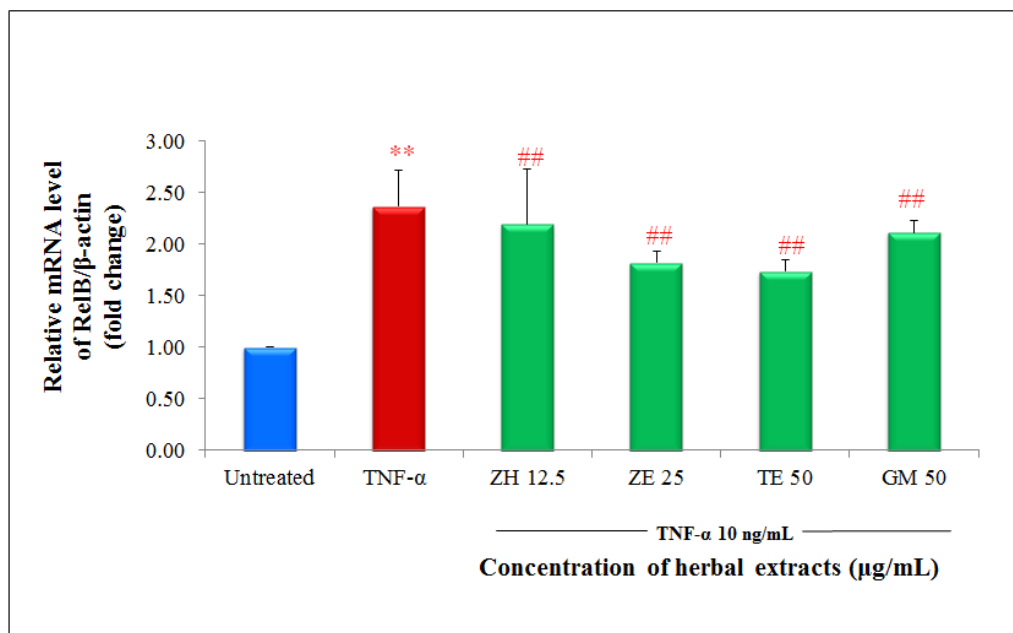
ผลการแสดงออกของยีน Rel-A (p65)



ภาพที่ 29 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน RelA (p65) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean ± SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน RelA (p65) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน RelA (p65) พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน RelA (p65) อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ RelA (p65) ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 29

ผลการแสดงออกของยีน RelB

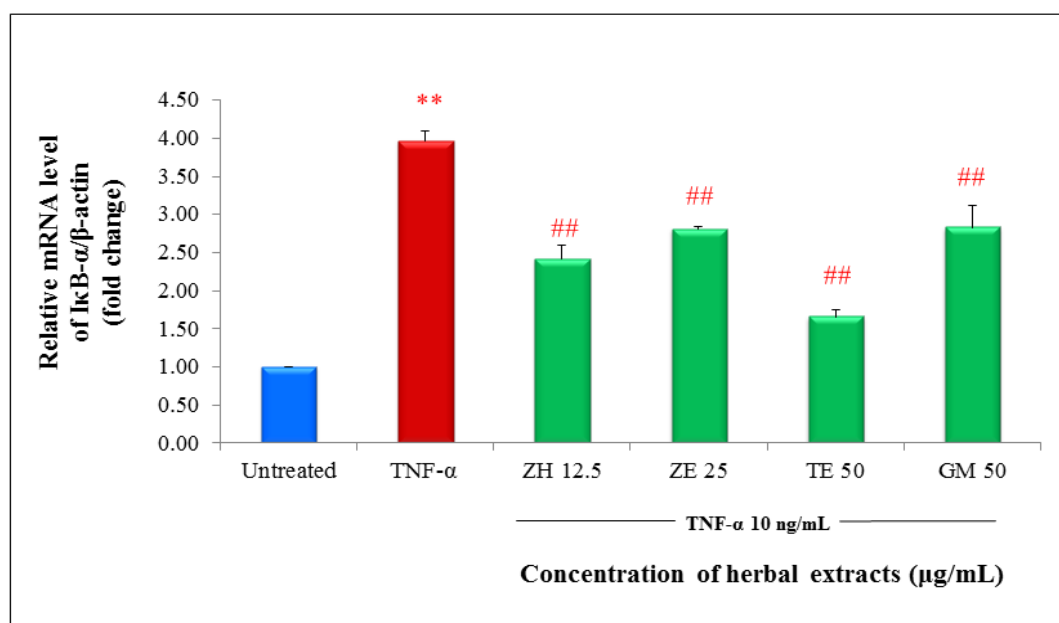


ภาพที่ 30 แสดงผลการทดสอบสารสกัดยับยั้งของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน RelB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน RelB เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 2.0-2.5 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดยับยั้งจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดยับยั้งของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดยับยั้งของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดยับยั้งของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดยับยั้งของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน RelB พบว่าสารสกัดยับยั้งของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน RelB อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดยับยั้งของใบ

รังจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ RelB ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 30

ผลการแสดงออกของยีน IKB- α



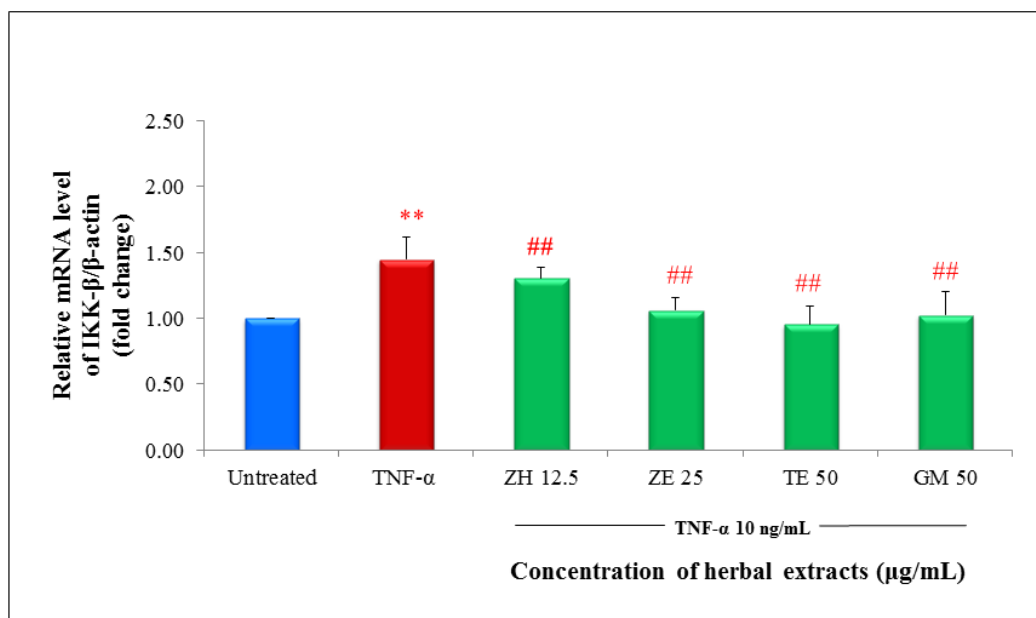
ภาพที่ 31 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IKB- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IKB- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 3.5-4.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่

ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน **IKB- α** พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน **IKB- α** อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ **IKB- α** ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม **TNF- α** -treated group ดังแสดงในภาพที่ 31



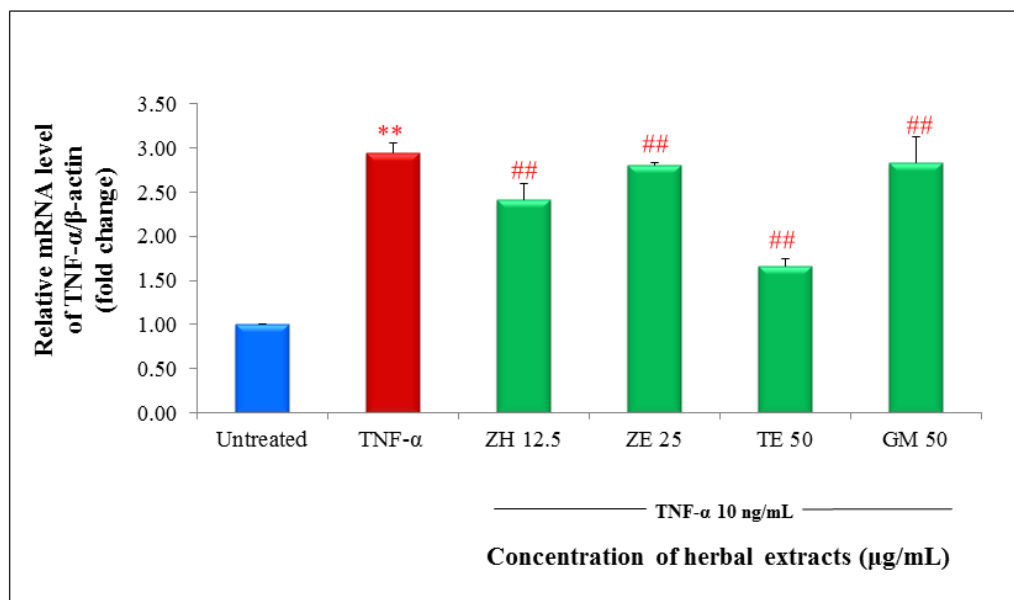
ผลการแสดงออกของยีน IKK- β



ภาพที่ 32 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IKK- β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$, $P^* < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{##} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IKK- β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.0-1.5 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของยีน IKK- β พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน IKK- β อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ IKK- β ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 32

ผลการแสดงออกของยีน TNF- α

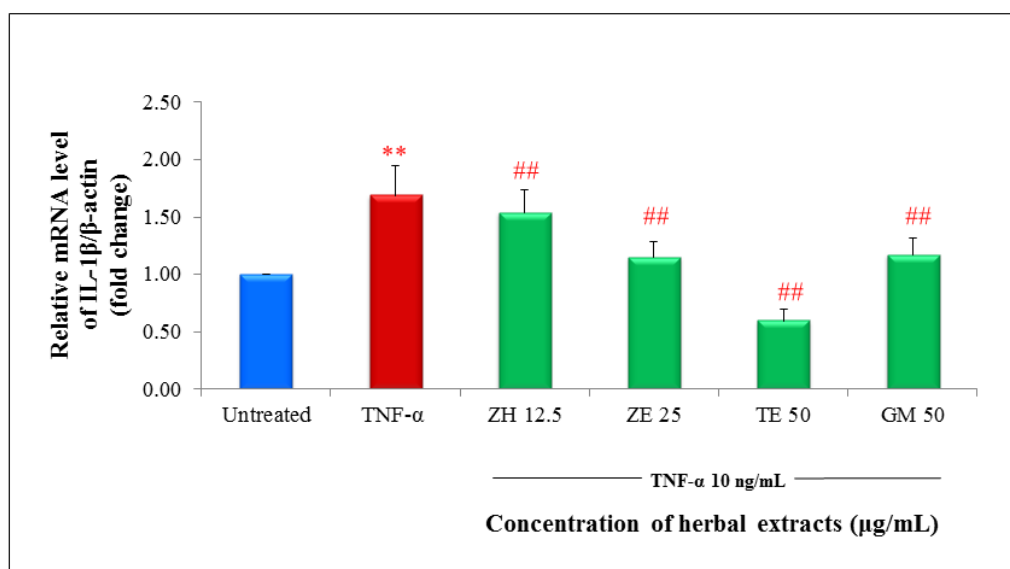


ภาพที่ 33 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน TNF- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 2.5-3.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของยีน TNF- α พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน TNF- α อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของ

ใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ TNF- α ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 33

ผลการแสดงออกของยีน IL-1 β

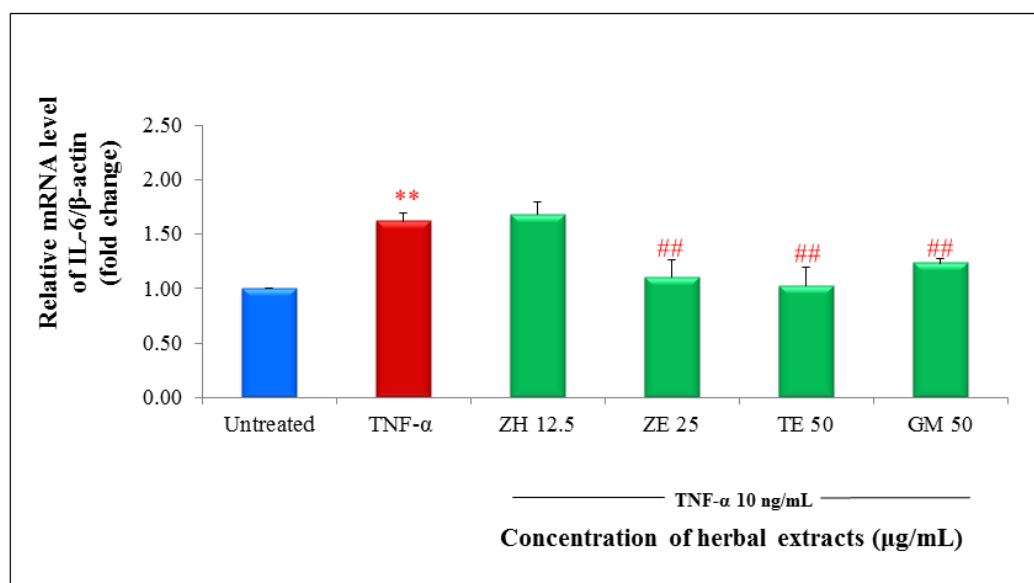


ภาพที่ 34 แสดงผลการทดสอบสารสกัดยับยั้งของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IL-1 β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดยับยั้งจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดยับยั้งของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดยับยั้งของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดยับยั้งของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดยับยั้งของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่

ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ IL-1 β ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 34

ผลการแสดงออกของยีน IL-6



CHULALONGKORN UNIVERSITY

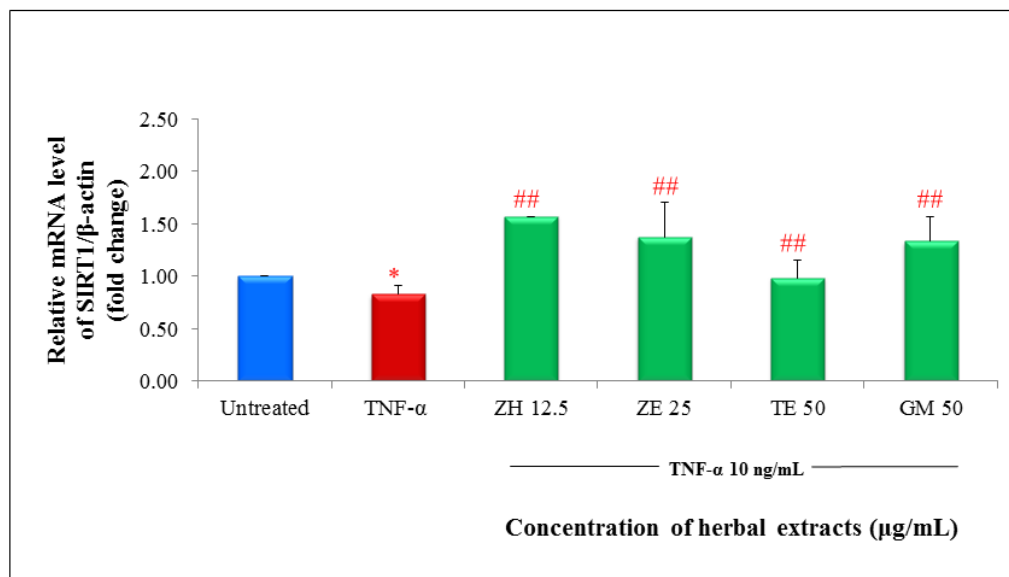
ภาพที่ 35 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าโพลัดด้วยตัวทำละลาย

เฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน IL-6 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมด ยกเว้นสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ IL-6 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 35



ผลการแสดงออกของยีน SIRT1

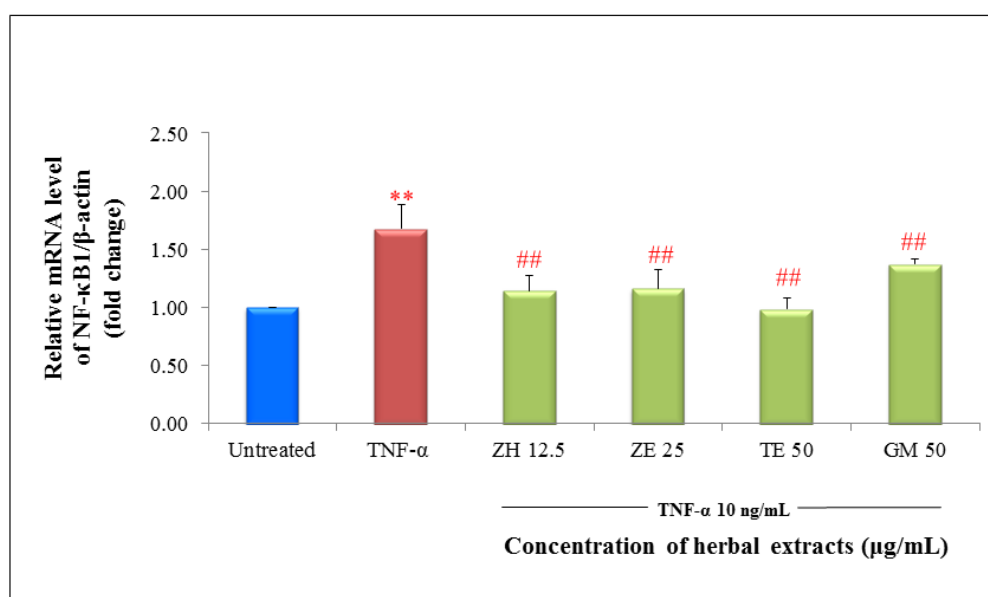


ภาพที่ 36 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน SIRT1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน SIRT1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน SIRT1 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน SIRT1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของไพลด้วยเฮกเซน (ZH) มีการแสดงออกของ SIRT1 เพิ่มมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 36

4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B และ ยีนเป้าหมายของ NF- κ B ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect

ผลการแสดงออกของยีน NF- κ B1



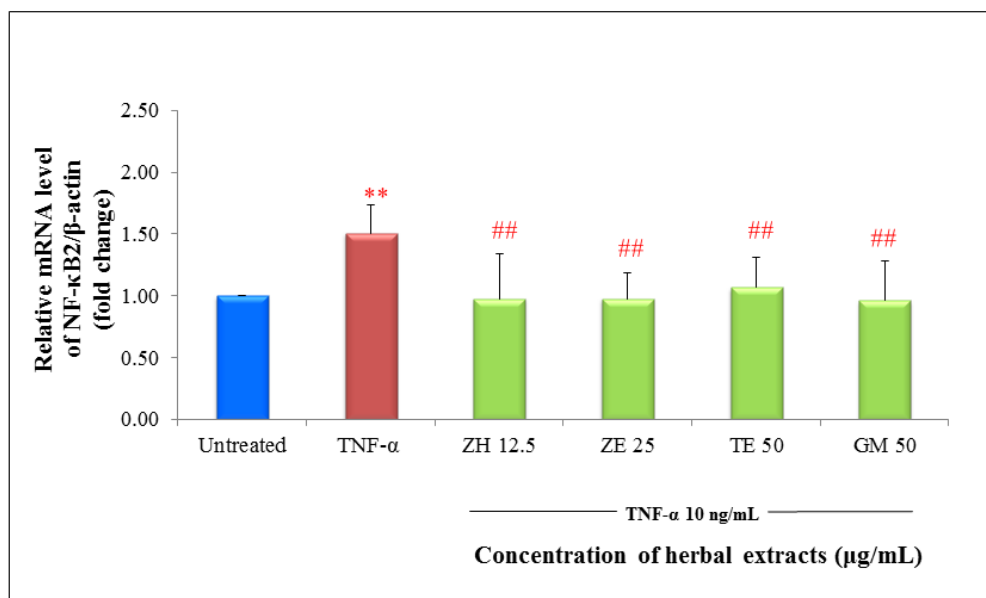
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 37 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน NF- κ B1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทา

นอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B1 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน NF- κ B1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ NF- κ B1 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 37

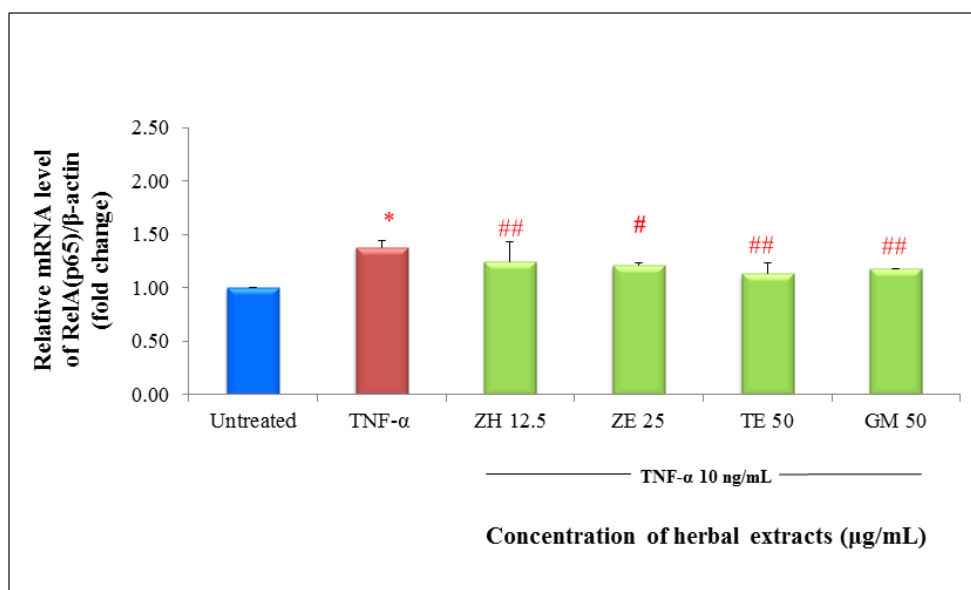
ผลการแสดงออกของยีน NF- κ B2



ภาพที่ 38 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B2 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน NF- κ B2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของยีน NF- κ B2 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน NF- κ B2 อย่างมีนัยสำคัญ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 38

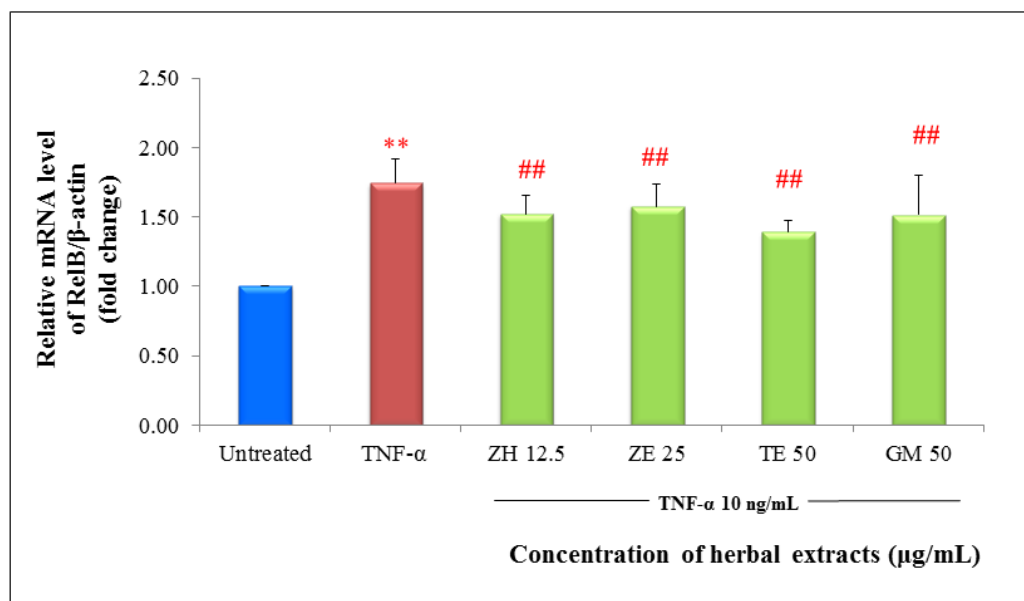
ผลการแสดงออกของยีน RelA (p65)



ภาพที่ 39 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน RelA (p65) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน RelA (p65) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.0-1.5 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน RelA (p65) พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน RelA (p65) อย่างมีนัยสำคัญ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 39

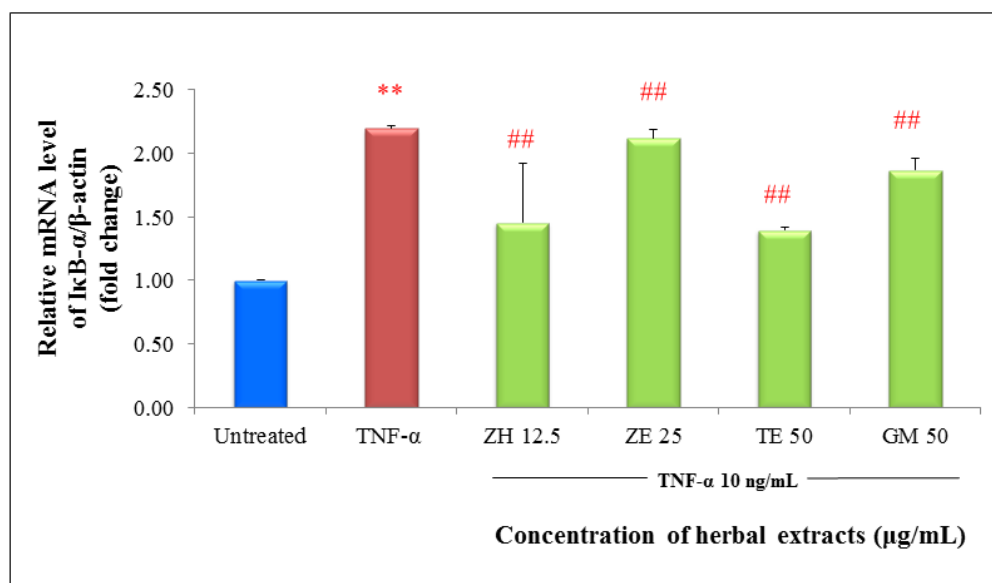
ผลการแสดงออกของยีน RelB



ภาพที่ 40 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน RelB ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน RelB เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน RelB พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน RelB อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ RelB ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 40

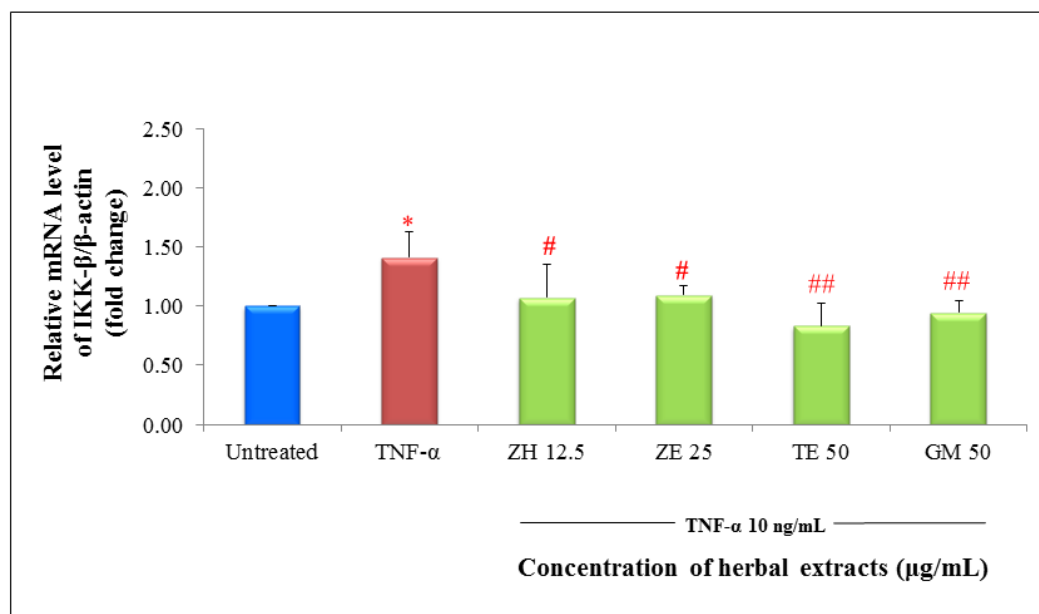
ผลการแสดงออกของยีน I κ B- α



ภาพที่ 41 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน I κ B- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IKB- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 2.0-2.5 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน IKB- α พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน IKB- α อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยเฮกเซน (ZH) และใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ IKB- α ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 41

ผลการแสดงออกของยีน IKK- β

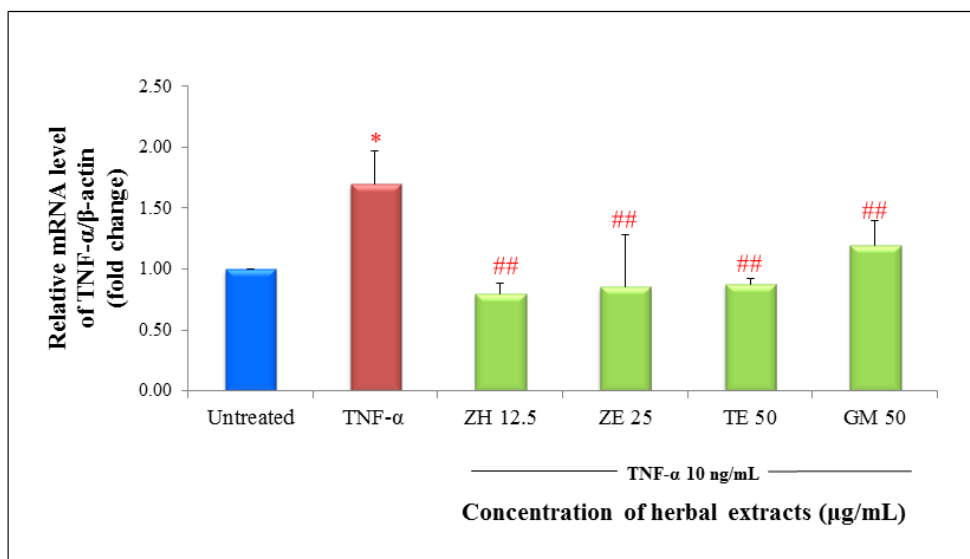


ภาพที่ 42 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IKK- β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่

$P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IKK- β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.0-1.5 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน IKK- β พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน IKK- β อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ IKK- β ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 42

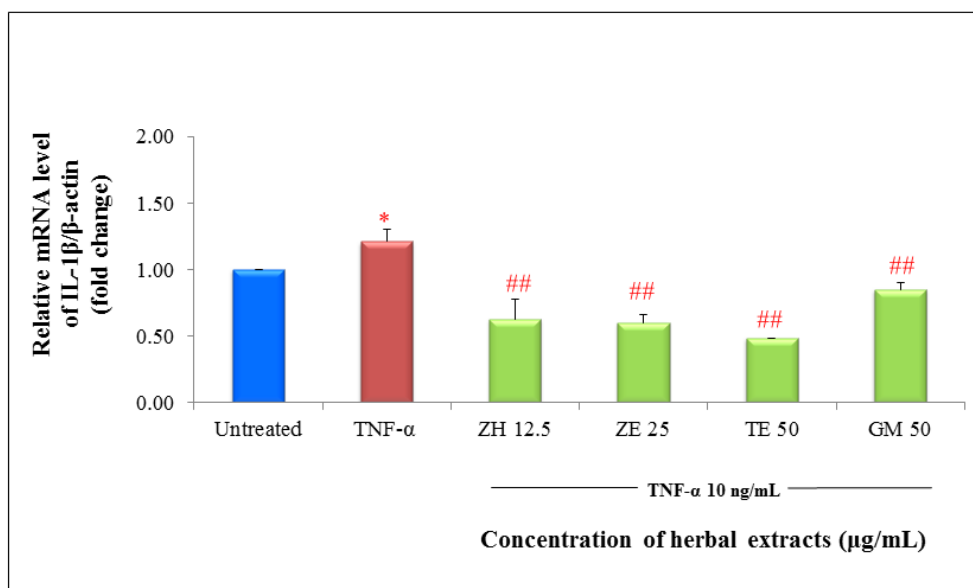
ผลการแสดงออกของยีน TNF- α



ภาพที่ 43 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน TNF- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 2.5-3.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของยีน TNF- α พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน TNF- α อย่างมีนัยสำคัญ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ลดลงน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 43

ผลการแสดงออกของยีน IL-1 β

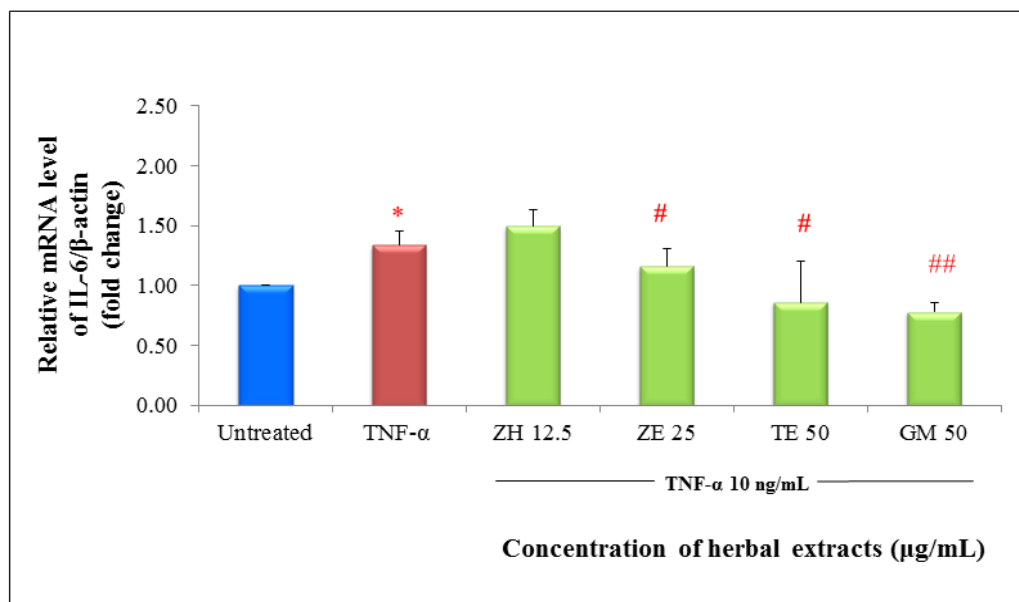


ภาพที่ 44 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IL-1 β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.0-1.5 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดของการแสดงออกของยีน IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ IL-1 β ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 44

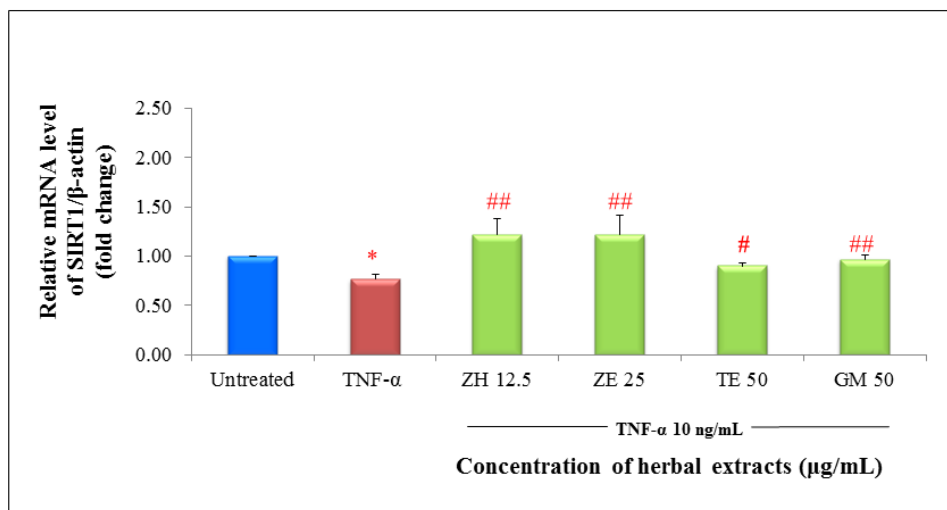
ผลการแสดงออกของยีน IL-6



ภาพที่ 45 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน IL-6 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1.5-2.0 เท่า) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของยีน IL-6 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมด ยกเว้นสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีน IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) มีการแสดงออกของ IL-6 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 45

ผลการแสดงออกของยีน SIRT1



ภาพที่ 46 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน SIRT1 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน SIRT1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการแสดงออกของยีน SIRT1 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน SIRT1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยเฮกเซน (ZH) มีการแสดงออกของ SIRT1 เพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 46

ตารางที่ 12 สรุปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่ออัตราการแสดงออกของยีน NF- κ B, ยีนเป้าหมายของ NF- κ B และ SIRT1 ในเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี Real-time PCR

Genes	Protective effect				Therapeutic effect			
	ZH	ZE	TE	GM	ZH	ZE	TE	GM
NF- κ B1 (p50) ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
NF- κ B2 (p52) ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
RelA (p65) ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
RelB ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IKB- α ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IKK- β ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
TNF- α ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-1 β ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-6 ↑	~	↓	↓	↓	~	↓	↓	↓
SIRT1 ↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

↑ = เพิ่มขึ้น

↓ = ลดลง

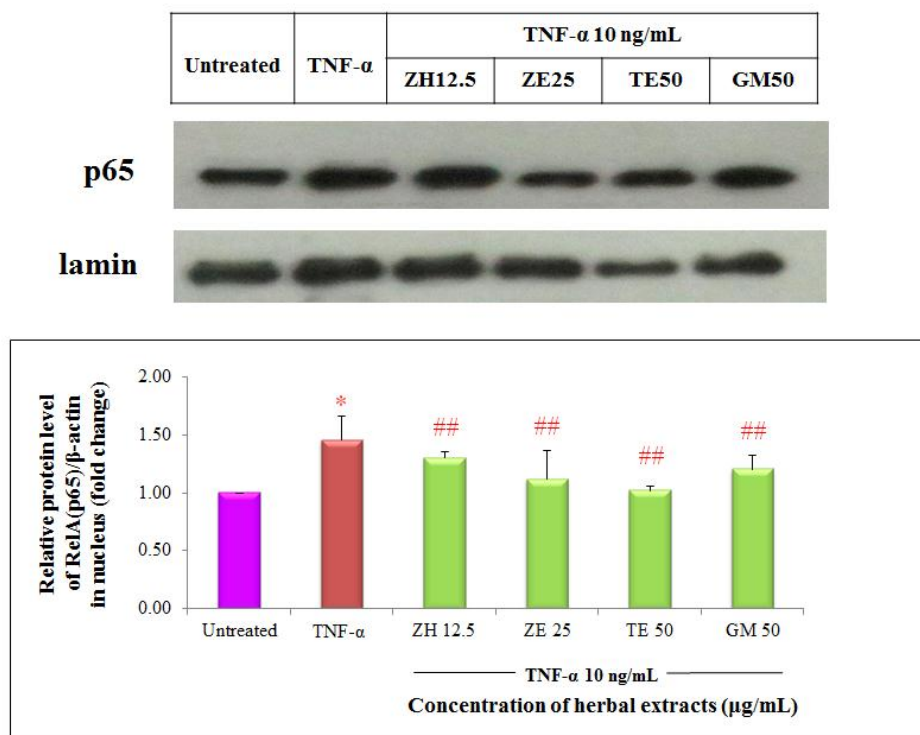
~ = ไม่เปลี่ยนแปลง

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ไบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ RelA (p65) ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี Western blot

เพื่อตรวจสอบกลไกการทำงานของตัวส่งสัญญาณ NF- κ B ผ่านการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ RelA (p65) และฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อกลไกการต้านการอักเสบผ่าน NF- κ B จึงเพาะเลี้ยงเซลล์ GT1-7 ลงในงานเพาะเลี้ยงเดี่ยวขนาด 60×15 mm หลุมละ 700,000 เซลล์ จากนั้นแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชนิดคือ 1) Protective effect ทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมุ่งได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของไบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2) Therapeutic effect กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมุ่งได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของไบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 วัดได้จากโปรตีนที่สกัดได้จากส่วนของนิวเคลียส ซึ่งจะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนกับ lamin และโปรตีนจากส่วนของไซโทพลาซึม จะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนกับ β -actin แล้วนำมาเปรียบเทียบเป็นจำนวนเท่าเทียบกับกลุ่มเซลล์ปกติที่ไม่ถูกทดสอบ (Untreated group) และกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α เป็น positive control

4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ไบรารังจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect

ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน p65 ในนิวเคลียส

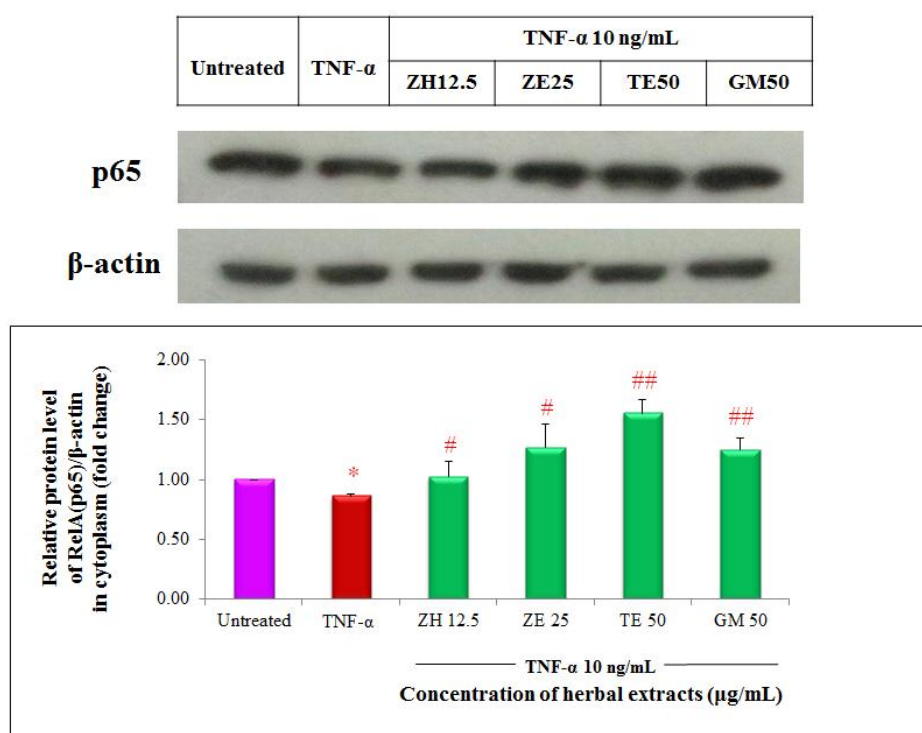


ภาพที่ 47 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในนิวเคลียสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของโปรตีนที่ถูก normalized กับ lamin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน p65 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ภายในนิวเคลียส เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group แสดงว่า เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของไบรารังจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการ

แสดงออกของโปรตีน p65 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ p65 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group แสดงว่า สารสกัดสมุนไพรทั้งหมดสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ได้ดังแสดงในภาพที่ 47

ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน p65 ในไซโทพลาซึม



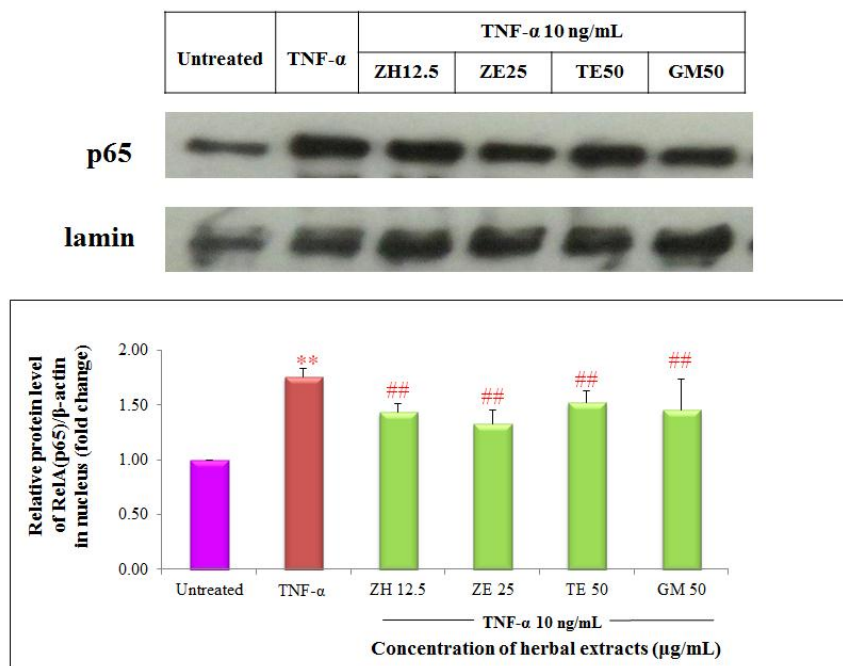
ภาพที่ 48 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในไซโทพลาซึมของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของโปรตีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{##} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน p65 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ภายในไซโทพลาซึม เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน p65 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) มีการแสดงออกของ p65 เพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดส่งผลให้โปรตีน p65 มีการสะสมอยู่บริเวณที่เป็นไซโทพลาซึม ดังแสดงในภาพที่ 48



4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect

ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน p65 ในนิวเคลียส

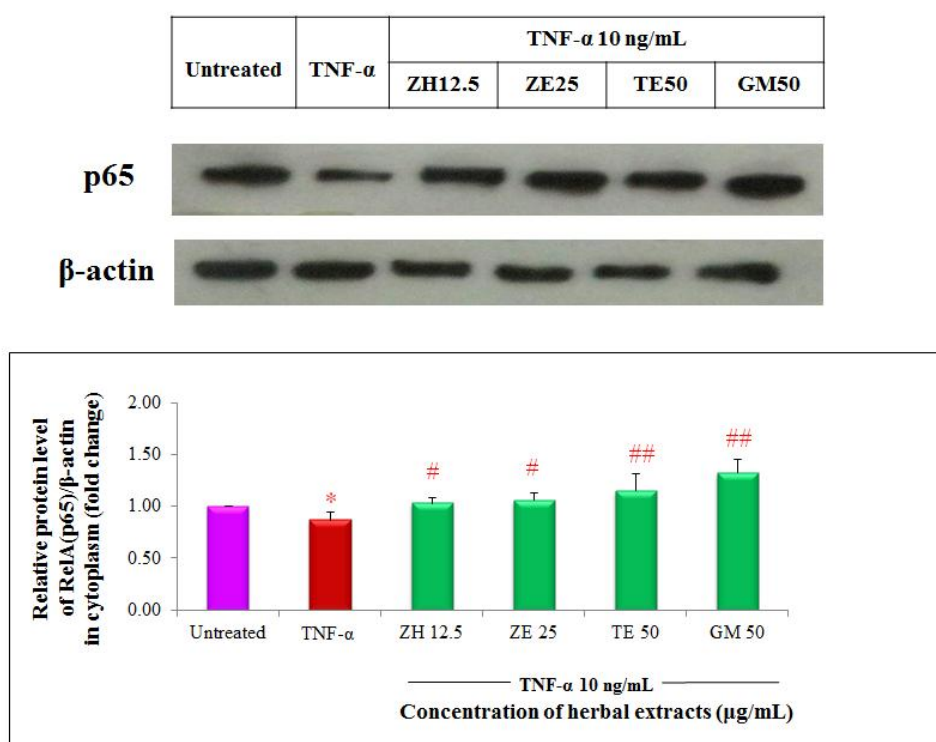


ภาพที่ 49 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในนิวเคลียสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของโปรตีนที่ถูก normalized กับ lamin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน p65 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ภายในนิวเคลียส เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group แสดงว่า เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 เพิ่มขึ้น และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน p65 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัด

หายาบของไฟลด์ด้วยเอทานอล (ZE) และสารสกัดหายาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) มีการแสดงออกของ p65 ลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ดังแสดงในภาพที่ 49

ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน p65 ในไซโทพลาซึม



ภาพที่ 50 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหายาบของสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 ในไซโทพลาซึมของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (mean \pm SD) ของการแสดงออกของโปรตีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^\# < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน p65 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ภายในไซโทพลาซึม เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการแสดงออกของโปรตีน p65 พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน p65 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) มีการแสดงออกของ p65 เพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดส่งผลให้โปรตีน p65 มีการสะสมอยู่บริเวณที่เป็นไซโทพลาซึม ดังแสดงในภาพที่ 50



ตารางที่ 13 สรุปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ในเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี Western blot

Protein fraction	Protective effect				Therapeutic effect			
	ZH	ZE	TE	GM	ZH	ZE	TE	GM
Nuclear ↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Cytoplasmic ↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑



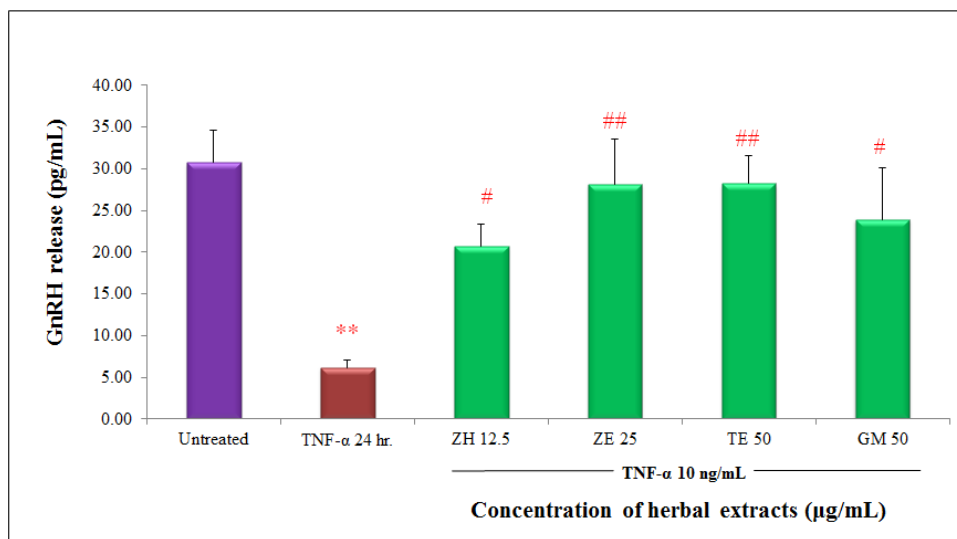
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ไบรารจืดและไบัวานมหากาฬ ต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี ELISA

เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของภาวะการอักเสบอันเนื่องมาจากการทำงานของ NF-KB และ ปริมาณการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน และฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในขณะที่มีการอักเสบเกิดขึ้น จึงเพาะเลี้ยงเซลล์ GT1-7 ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 12 หลุมๆละ 200,000 เซลล์ จากนั้นแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชนิดคือ

1) Protective effect ทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 µg/mL, สารสกัดหยาบของไบรารจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และสารสกัดหยาบของไบัวานมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) Therapeutic effect กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 µg/mL, สารสกัดหยาบของไบรารจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และสารสกัดหยาบของไบัวานมหากาฬด้วยตัวทำละลายเอทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL กับเซลล์ GT1-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของ GnRH (pg/mL) ที่หลั่งออกมาคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาเปรียบเทียบเป็นจำนวนเท่าเทียบกับกลุ่มเซลล์ปกติที่ไม่ถูกทดสอบ (Untreated group) และกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α เป็น positive control

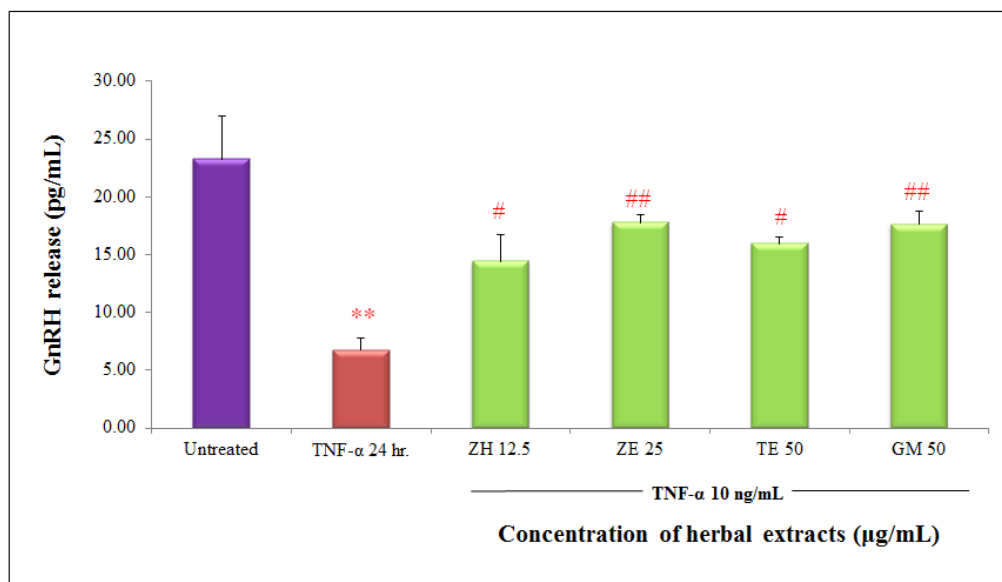
4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ไบรางจืดและไบัวนมหากาฬ ต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect



ภาพที่ 51 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการหลั่งของ GnRH จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Protective effect แสดงค่าเป็นความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมนที่หลั่งออกมา (mean \pm SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ GnRH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ GT1-7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, สารสกัดหยาบของไบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบของไบัวนมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อการหลั่งของ GnRH พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ GnRH ที่หลั่งออกมาอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยเอทานอล (ZE) และสารสกัดหยาบของไบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) มีการหลั่งของ GnRH เพิ่มมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 51

4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ในเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect



ภาพที่ 52 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรต่อการหลั่งของ GnRH จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 แบบ Therapeutic effect แสดงค่าเป็นความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมนที่หลั่งออกมา (mean ± SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ Untreated group และ $P^{\#} < 0.05$, $P^{\#\#} < 0.01$ เมื่อเทียบกับ TNF- α -treated group

จากผลการกระตุ้นเซลล์ GT1-7 ด้วย TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ GnRH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ GT1-7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated group และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (ZH) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ZE) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$, สารสกัดหยาบของใบรางจืดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (TE) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการหลั่งของ GnRH พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งหมดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ GnRH ที่หลั่งออกมาอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของเหง้าไพลด้วยเอทานอล (ZE) และสารสกัดหยาบของใบว่านมหากาฬด้วยตัวทำละลายเมทานอล (GM) มีการหลั่งของ GnRH เพิ่มมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่ม TNF- α -treated group ดังแสดงในภาพที่ 52

ตารางที่ 14 สรุปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเหง้าไพล, ใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ต่อการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ในเซลล์ GT1-7 ด้วยวิธี ELISA

GnRH level	Protective effect				Therapeutic effect			
	ZH	ZE	TE	GM	ZH	ZE	TE	GM
↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

Aging หรือ ความชรา เป็นกระบวนการเสื่อมลงของร่างกายอันเนื่องมาจากความบกพร่องของการทำงานของเซลล์ เนื้อเยื่อ ตลอดจนอวัยวะต่างๆ โดยมีปัจจัยทั้งภายในและภายนอกในการเร่งกระบวนการเกิดความชราให้เร็วยิ่งขึ้น เช่น ความผิดปกติในระดับพันธุกรรม, มลพิษที่ได้รับและการสะสมของสารพิษ, ภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสม, การตอบสนองต่อความเครียด, จุลชีพ และโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม เป็นต้น โดยสาเหตุของการเกิดความชราในแต่ละคนย่อมมีความแตกต่างกัน ซึ่งต้องใช้หลายทฤษฎีในการอธิบายกลไกการเกิดความชรา และบางทฤษฎีมีความเชื่อมโยงกัน เช่น ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน, ทฤษฎีสารอนุมูลอิสระ และทฤษฎีระบบต่อมไร้ท่อ เป็นต้น (3) จากการศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี 2013 พบความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการเกิดความชราและภาวะการอักเสบอันเนื่องมาจากการทำงานของ NF-KB ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งของโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH) ที่ลดลงภายในสมองส่วนไฮโปทาลามัส (4) ดังนั้นการยับยั้งกลไกการเกิดความชรา จึงต้องเน้นไปที่กระบวนการต้านการอักเสบผ่าน NF-KB signaling pathway รวมทั้งการเพิ่มปริมาณการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ได้ด้วย ซึ่งการคัดเลือกเลือกสมุนไพรไทยมาใช้ในการศึกษาถือเป็นทางเลือกหนึ่ง ซึ่งผู้วิจัยสนใจสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ใพล (*Zingiber montanum* (Koenig)), รวงจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl) และว่านมหากาฬ (*Gynura pseudochina* DC. Var. *hispida* Thwaites) เนื่องจากในปัจจุบันการศึกษาศมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้ในแง่ของกระบวนการต้านอักเสบในระดับชีวเคมีและโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ NF-KB signaling pathway ยังไม่เป็นที่แพร่หลายและมีรายงานวิจัยที่พบน้อยมาก โดยสมุนไพรมีรายงานว่ามีการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ NF-KB มีเพียงว่านมหากาฬเท่านั้น แต่รายงานการวิจัยที่พบไม่ได้ศึกษาในระบบประสาทที่มีความซับซ้อนโดยตรง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาผลของสารสกัดหยาบของสมุนไพรรวมทั้ง 3 ชนิดต่อการต้านกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดความชราผ่านการทำงานของ NF-KB และการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7

สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดถูกเก็บที่สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพฯ จังหวัดระยอง ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 โดยเลือกเก็บส่วนที่เป็นเหง้าไหล, ใบรางจืด และใบว่านมหากาฬ เนื่องจากทั้ง 3 ส่วนนี้ของสมุนไพรมีรายงานการวิจัยว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ซึ่งฤดูการเก็บเกี่ยวของสมุนไพรแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เหง้าไหลนั้นมีการแนะนำให้เก็บในช่วงปลายฤดูร้อน และต้นไหลควรมีอายุ 2-3 ปีขึ้นไป ซึ่งตอนต่อไปเก็บนั้นต้นไหลมีการเจริญเติบโตเต็มที่ แต่การเก็บในช่วงเดือนกรกฎาคมนี้ เป็นช่วงต้นฤดูฝน อาจมีผลต่อสารที่จะสกัดได้ สำหรับการเก็บใบรางจืดและใบว่านมหากาฬนั้นสามารถเก็บได้ตลอดฤดูกาลแต่สมุนไพรควรโตเต็มที่เพื่อให้ได้ใบที่มีขนาดใหญ่ (122, 123) ซึ่งต้นรางจืดและว่านมหากาฬในช่วงที่ไปเก็บนั้นสมบูรณ์และโตเต็มที่แล้ว ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชสมุนไพรชนิดเดียวกัน แต่บางครั้งปริมาณสารที่สกัดได้จากสมุนไพรในแต่ละครั้งอาจจะไม่เท่ากัน เนื่องจากช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวสมุนไพร ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณสารที่จะสกัดได้แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลต่อปริมาณสารในสมุนไพรเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น ลักษณะดินในบริเวณที่มีการเพาะปลูกสมุนไพร, สภาพดินฟ้าอากาศและสิ่งแวดล้อมในช่วงที่สมุนไพรมีการเจริญเติบโต, ช่วงอายุของสมุนไพรในระหว่างที่เก็บเกี่ยว, เทคนิคการดูแลและบำรุงรักษา และวิธีการเก็บเกี่ยว เป็นต้น ดังนั้นการเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ด้วย เนื่องจากถ้าเก็บเกี่ยวสมุนไพรไม่ถูกวิธีหรือเก็บเกี่ยวในช่วงที่ไม่ใช่ฤดูเก็บเกี่ยวอาจทำให้ได้ปริมาณสารสกัดจากสมุนไพรน้อยเกินไป ส่งผลสำคัญต่อการศึกษาวิจัยต่อไป ขั้นตอนต่อไปที่มีผลสำคัญต่อชนิดและปริมาณสารสกัดจากสมุนไพรคือ การเลือกวิธีการสกัดและตัวทำละลาย โดยปัจจุบันวิธีการสกัดสมุนไพรที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธี Maceration เป็นวิธีการสกัดสมุนไพรที่ต้องหมักสมุนไพรไว้กับตัวทำละลาย เขย่าและบ่มทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน และต้องสกัดซ้ำ 2-3 ครั้ง โดยสารจะไม่โดนความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายเป็นจำนวนมาก อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extraction) โดยการให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายที่อยู่ใน flask จนทำให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวผ่านลงมาใน trimble ที่มีผงสมุนไพรบรรจุอยู่ สารที่สกัดได้จะไหลกลับลงมาใน flask พร้อมตัวทำละลาย เป็นเช่นนี้จนสีของตัวทำละลายใส จึงถือว่าเสร็จสมบูรณ์ วิธีนี้อาจมีข้อเสียคือ สารสกัดบางชนิดอาจสูญเสียไปพร้อมกับความร้อน จากการวิจัยวิธีการสกัดสมุนไพรในไหล, รางจืด และว่านมหากาฬ พบว่ามีการสกัดทั้งวิธี Maceration (10, 124) และวิธี Soxhlet extraction (107, 125) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิค Soxhlet extraction และการเลือกใช้ตัวทำละลายนั้น อ้างอิงจากผลการวิจัยที่ผ่านมาซึ่งระบุว่า สารสกัดของเหง้าไหลด้วยเฮกเซน, สารสกัดของใบรางจืดด้วยเฮกเซนและเอทานอล และสารสกัดของใบว่านมหากาฬด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ ดังนั้นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร ได้แก่ เฮกเซน (ไม่มีขี้), เอทานอลและเมทานอล (มีขี้สูง) หลังจากทำให้สารสกัดที่ได้เข้มข้นขึ้นด้วย rotatory evaporator แล้ววัดปริมาณ %yield (ปริมาณที่สกัดได้) พบว่า การสกัดใบว่านมหากาฬ

ด้วยเมทานอล ได้ปริมาณสารที่สกัดได้มากที่สุด (12.72%) ส่วนการสกัดใบรางจืดและใบว่านมหากาฬ ด้วยเฮกเซน ได้ปริมาณสารน้อยที่สุด (0.61% และ 0.68% ตามลำดับ) และการสกัดใบรางจืดและใบว่านมหากาฬด้วยเอทานอล ได้ปริมาณสารที่ใกล้เคียงกัน (ประมาณ 8.42% และ 8.35% ตามลำดับ) จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาละลายใน DMSO และทำเป็น stock ความเข้มข้น 100 mg/mL นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เซลล์โมเดลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทชนิด GnRH-expressing hypothalamic neuron เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิดนี้ใช้เทคนิค genetically targeting tumorigenesis ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ ทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (cell differentiation) ตามแต่ละชนิดของเซลล์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยใช้ไวรัสชนิด Simian Virus 40 large T-antigen oncogene ใส่เข้าไปในตำแหน่งของ GnRH promoter ของ transgenic mice กลายเป็นเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด immortalized GT-1 ชนิด heterogenous cell ต่อมาเกิดการโคลนและพัฒนาเป็นเซลล์ชนิด GT1-1, GT1-3 และ GT1-7 ซึ่งเป็น homogenous cell จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด GnRH-expressing ที่ดีที่สุดได้แก่ Gn11 และ GT1-7 โดยสาเหตุที่เลือก GT1-7 มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากว่า เซลล์ GT1-7 มีการแสดงออกของ cell marker ที่พบในเซลล์ประสาท มีการแสดงออกของโครงสร้างเซลล์ประสาทที่จะพัฒนาไปสร้างฮอร์โมนได้ โดยมีการแสดงออกเหมือน GnRH neuron ที่โตเต็มที่แล้วและมีการแสดงออกกระตุ้นของฮอร์โมน GnRH ในระดับที่สูง เมื่อเทียบกับเซลล์ Gn11 และเซลล์ชนิดอื่นๆ (102) รวมทั้งมีรูปแบบการหลั่งของฮอร์โมน GnRH แบบ pulsatile อีกด้วย ที่สำคัญคือ จากการศึกษาของ Zhang และคณะ มีการใช้เซลล์ GT1-7 ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของ NF- κ B และการหลั่งของฮอร์โมน GnRH อีกด้วย นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า เซลล์ GT1-7 ถูกนำมาใช้ในการศึกษาอีกหลายด้านที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ประสาทของสมองส่วนไฮโปทาลามัส และการควบคุมฮอร์โมน GnRH เช่น การศึกษาเกี่ยวกับผลของ Kisspeptin-10 ต่อการหลั่งของฮอร์โมน GnRH (126), ผลของ IGF-1 ต่อภาวะ oxidative stress ที่เกี่ยวข้องกับ NF- κ B (127) และภาวะ insulin resistance ที่เหนี่ยวนำด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (96) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาในเซลล์ GT1-7 ยังมีข้อจำกัดอยู่ เนื่องจากเป็นเซลล์ประสาทที่สร้างมาจากหนูและการแสดงออกของ neuronal marker ที่มีในเซลล์ชนิดนี้อาจจะมีความแตกต่างกับเซลล์ประสาทของมนุษย์ที่มีความซับซ้อนมากกว่า

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 โดยใช้เทคนิค MTT assay เป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้มากที่สุด เป็นการวัดอัตราการรอดของเซลล์ (cell viability) โดยใช้หลักการวัดกระบวนการ metabolism ของเซลล์และแปรผันตรงกับ

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์อีกด้วย ส่วนใหญ่เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial reductase ของไมโทคอนเดรีย นอกจาก MTT assay แล้ว ยังมีอีกหลายวิธีที่ใช้หลักการนี้ เช่น MTS และ XTT assay เป็นต้น โดยสาร mtt หรือ xtt จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ mitochondrial reductase กลายเป็นตะกอนสีม่วงของ formazan ซึ่งตะกอนสีที่เกิดขึ้นนี้จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต อย่างไรก็ตาม MTT assay นี้ยังมีข้อเสียคือ จำเป็นต้องมีการละลายตะกอนสีก่อนที่จะนำมาวัด ทำให้มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง และเซลล์ที่ถูกนำมาวัดไม่สามารถนำไปทำอย่างอื่นได้อีก เนื่องจากว่าในการวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการอักเสบของเซลล์ ในกลุ่มควบคุมบวก (positive control) เซลล์จึงต้องมีการกระตุ้นด้วย TNF- α ความเข้มข้น 10 ng/mL (อ้างอิงจากการวิจัยที่ผ่านมาซึ่งมีการศึกษากระบวนการอักเสบในเซลล์ GT1-7 (96)) ส่วนใหญ่ความเข้มข้นของ TNF- α ที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบคือ 10 ng/mL อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ TNF- α ที่ใช้อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยอีกหลายอย่างเช่น ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง, เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ เป็นต้น ดังนั้นในการวัดความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 นอกจากจะวัดอัตราการรอดของเซลล์ในเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรเพียงอย่างเดียวแล้ว (กลุ่มที่ 1: Herb only) ยังต้องวัดอัตราการรอดของเซลล์ในเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรก่อนแล้วกระตุ้นด้วย TNF- α (กลุ่มที่ 2: Protective effect) และในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ก่อนแล้วทดสอบกับสารสกัดสมุนไพร (กลุ่มที่ 3: Therapeutic effect) เวลาที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรกับเซลล์คือ 24 ชั่วโมงและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น TNF- α กับเซลล์ แบ่งเป็น 3 และ 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดของเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มที่เวลา 3 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่จะเลือกมาใช้ในการทดสอบต่อไป พิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่มากกว่า 80% พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดของเหง้าไพลด้วยเฮกเซน (ZH), สารสกัดของเหง้าไพลด้วยเอทานอล (ZE), สารสกัดของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) และสารสกัดของใบว่านมหากาฬด้วยเมทานอล (GM) ได้แก่ 12.5, 25, 50 และ 50 μ g/mL ตามลำดับ สำหรับสารสกัดของใบรางจืดและใบว่านมหากาฬด้วยเฮกเซนนั้น เมื่อดูจาก %yield ที่ได้ตอนสกัดสมุนไพรทำให้ทราบว่าอาจจะไม่มีสารที่ไม่มีขี้หรือมีสารที่ไม่มีขี้แต่น้อยมากออกมาในสารที่สกัดได้จากใบรางจืดและใบว่านมหากาฬเมื่อสกัดด้วยเฮกเซน ซึ่งสอดคล้องกับผลของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้ประมาณ 70% เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากใบรางจืดและใบว่านมหากาฬด้วยเฮกเซน ดังนั้นจึงไม่นำสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้มาศึกษา

เป็นที่ทราบกันดีว่า NF- κ B เป็น transcription factor ที่มีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการทางชีววิทยาภายในร่างกาย เช่น กระบวนการอักเสบ, การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ในระหว่างที่เกิดกระบวนการความชรา รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับความชรานั้น มีความเกี่ยวข้องกับ

กระบวนการอักเสบโดยตรวจพบระดับของไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเพิ่มสูงขึ้น เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 เป็นต้น ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้ล้วนเป็นยีนเป้าหมายของ NF-KB จากการศึกษาที่ผ่านมาสอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการอักเสบกับระดับไซโตไคน์ที่สูงขึ้น ในระหว่างที่เกิดความผิดปกติของโรคที่เกี่ยวข้องกับความชรา เช่น ในกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุแก่ที่เป็นโรคความจำเสื่อมและหลอดเลือดแข็งตัว ตรวจพบการไหลเวียนของระดับ TNF- α ที่สูงขึ้นในระบบหมุนเวียนเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่อายุน้อย (30, 31) ระดับ TNF- α และ IL-6 ยังสูงขึ้นในกลุ่มตัวอย่างชราที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (128) และในสมองส่วนไฮโปทาลามัสของหนูแก่ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ยังพบการแสดงออกของ IL-1 β และ IL-6 เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย (129) ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ZH, ZE, TE และ GM ที่ความเข้มข้นได้แก่ 12.5, 25, 50 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับแล้ว จึงนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบผ่าน NF-KB โดยวัดการแสดงออกของยีนในตระกูล NF-KB และยีนเป้าหมายของ NF-KB รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการความชรา ด้วยเทคนิค Real-time PCR (quantitative) ซึ่งสามารถบอกปริมาณการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของการแสดงออกของยีนได้จากการคำนวณค่า Ct ของแต่ละยีนเทียบกับยีน house keeping ได้แก่ β -actin นำไปวิเคราะห์ผลต่อไปได้ และยังสามารถติดตามผลการเกิดปฏิกิริยาได้ตั้งแต่เริ่มต้นจนจบปฏิกิริยา ไม่ต้อง run gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบขนาดและปริมาณการแสดงออกของยีน ถ้ายีนมีการแสดงออกที่เปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยก็สามารถคำนวณออกมาเป็นค่าที่แน่นอนได้ ส่วนวิธี Conventional PCR นั้น ถ้ายีนมีการแสดงออกที่เปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุมแล้ว วิธีนี้อาจจะไม่สามารถแสดงถึงความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในแต่ละตัวอย่างได้ เนื่องจากเป็นการวัดแบบ qualitative เท่านั้น จึงเป็นสาเหตุที่เลือกใช้เทคนิค Real-time PCR จากผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการอักเสบผ่านการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีนในตระกูล NF-KB ได้แก่ NF- $\text{KB}1$ (เพิ่มขึ้น 1.5-2.0 เท่า), NF- $\text{KB}2$ (เพิ่มขึ้น 1.5-2.0 เท่า), RelA (p65) (เพิ่มขึ้น 1.5-2.0 เท่า) และ RelB (เพิ่มขึ้น 2.0-2.5 เท่า) ยีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของ NF-KB ได้แก่ IKB- α (เพิ่มขึ้น 3.5-4.0 เท่า) และ IKK- β (เพิ่มขึ้น 1.0-1.5 เท่า) ยีนเป้าหมายของ NF-KB ได้แก่ TNF- α (เพิ่มขึ้น 2.5-3.0 เท่า), IL-1 β (เพิ่มขึ้น 1.5-2.0 เท่า) และ IL-6 (เพิ่มขึ้น 1.5-2.0 เท่า) รวมทั้งลดการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความชราและมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการแสดงออกของ p65 ได้แก่ SIRT1 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ untreated group ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่า TNF- α สามารถกระตุ้นการอักเสบโดยกระตุ้นการแสดงออกระดับยีนของ IKB- α และการแสดงออกระดับโปรตีนของ phosphorylated IKB- α ในเซลล์ GT1-7 แต่มีความขัดแย้งกับผลของการแสดงออกของ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยพบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์

ด้วย TNF- α ที่ 6 และ 24 ชั่วโมง การแสดงออกของ TNF- α และ IL-1 β ไม่เพิ่มสูงขึ้น แต่มีการแสดงออกของ IL-6 เพิ่มสูงขึ้น (96) แต่จากผลการวิจัยของผู้วิจัยพบว่า มีการแสดงออกของ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเซลล์ GT1-7 ถูกกระตุ้นตั้งแต่วันที่ 3 ชั่วโมง จากผลการวิจัยที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น จำนวนเซลล์ GT1-7 ตั้งต้นที่ใช้, ปริมาณ RNA ที่สกัดได้ และเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ของ TNF- α เป็นต้น และในเซลล์ประสาทในสมองส่วนไฮโปทาลามัส การทำงานของ IKK- β และ NF- κ B เพิ่มสูงขึ้นจากการกระตุ้นของ TNF- α ที่ถูกสร้างออกมาจากเซลล์ microglia ที่อยู่บริเวณเดียวกันอันเนื่องมาจากถูกกระตุ้นด้วยการทำงานของ NF- κ B เช่นเดียวกัน แสดงถึงกระบวนการกระตุ้นข้ามเซลล์ (crosstalk) ระหว่างเซลล์ microglia และเซลล์ประสาทของสมองส่วนไฮโปทาลามัส และในหนูแก่ยังพบระดับการแสดงออกของ TNF- α เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่มีอายุปานกลางอีกด้วย (4) เมื่อทดสอบสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α (Protective effect) และหลังจากที่กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α (Therapeutic effect) พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ZH, ZE, TE และ GM ที่ความเข้มข้นได้แก่ 12.5, 25, 50 และ 50 μ g/mL ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถลดการแสดงออกของยีนในตระกูล NF- κ B, ยีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของ NF- κ B, ยีนเป้าหมายของ NF- κ B (ยกเว้น ZH ที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ IL-6) และเพิ่มการแสดงออกของ SIRT1 อย่างมีนัยสำคัญได้ โดยการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ SIRT1 อาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยที่ผ่านมาของ SIRT1 ว่า เมื่อมีการกระตุ้นการแสดงออกของ SIRT1 จะส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ได้ (130-132) เพื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการต้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพรผ่านการทำงานของ NF- κ B จากการตรวจสอบการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ RelA (p65) แต่เดิมทดสอบด้วยวิธี Confocal microscope ปรากฏว่าไม่สามารถเห็นการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้อย่างชัดเจน อาจเกิดจากเมื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α ใน cell model ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสในปริมาณที่ไม่มากพอที่จะทำให้เห็นด้วยเทคนิคนี้ อีกทั้งจากการทบทวนการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7 ยังไม่พบการใช้เทคนิค confocal microscope ในการตรวจสอบการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเทคนิคนี้ไม่เหมาะสมกับเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้เทคนิค Western blot analysis โดยสกัดแยกโปรตีนของเซลล์ GT1-7 ออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนของไซโทพลาซึมและส่วนของนิวเคลียส แล้ววัดปริมาณโปรตีน p65 ใน 2 ส่วนนี้แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน จากผลการทดลองพบว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุมบวกทำให้เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 ซึ่ง normalize กับ lamin มีการแสดงออกของโปรตีน p65 สูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated group ในโปรตีนส่วนที่เป็นนิวเคลียส ส่วนโปรตีนส่วนที่

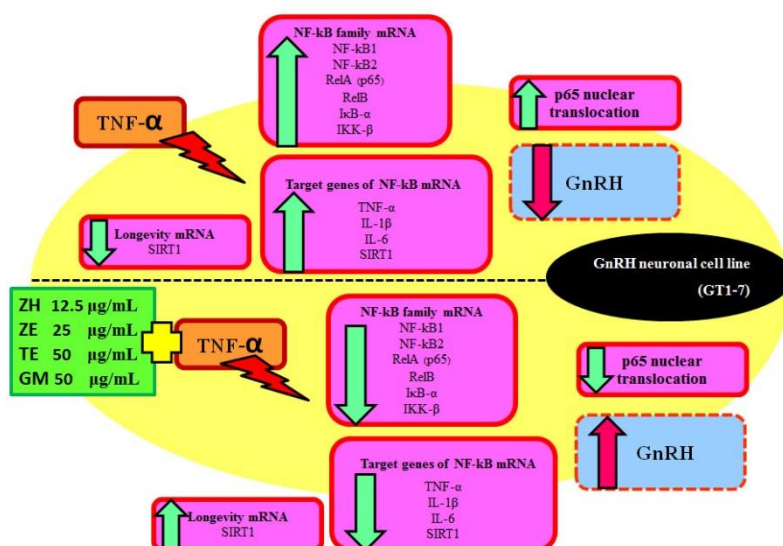
เป็นไซโทพลาซึม ในกลุ่มควบคุมบวก ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน p65 ลดลง ซึ่ง normalize กับ β -actin (อ้างอิงจากการทดสอบ real-time PCR) เมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated group ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยที่ผ่านมา (96) เมื่อทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α (Protective effect) และหลังจากที่กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α (Therapeutic effect) พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ZH, ZE, TE และ GM ที่ความเข้มข้นได้แก่ 12.5, 25, 50 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการต้านการอักเสบของ NF- KB โดยสามารถลดการเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้องอกได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดสอบการแสดงผลของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ NF- KB ที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว

จากการศึกษาที่ผ่านมา รวมทั้งผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นของผู้วิจัยสามารถบ่งชี้ได้ว่ากระบวนการอักเสบภายในเซลล์ GT1-7 อันเนื่องมาจากการทำงานของ NF- KB ที่เพิ่มสูงขึ้น เกิดจากการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ TNF- α ที่ถูกผลิตขึ้นมาในระหว่างที่เกิดกระบวนการความชรา นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมา ยังพบว่า เมื่อกระตุ้นการทำงานของ IKK- β และ NF- KB ในเซลล์ GT1-7 ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของระบบฮอร์โมนในต่อมไร้ท่อผ่านการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ที่ลดน้อยลง และการหลั่งของฮอร์โมน GnRH เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ IKK- β และ NF- KB อีกทั้งเมื่อมีการให้ฮอร์โมน GnRH เข้าไปในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ตำแหน่ง 3rd ventricle ในหนูแก่ และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดความชรา พบว่าฮอร์โมน GnRH สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ขึ้นมา ในระหว่างที่เกิดกระบวนการความชรา (4) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของผู้วิจัย จากการวัดระดับการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ GT1-7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจวัดระดับการหลั่งของฮอร์โมน GnRH (4, 126) โดยพบว่า ปริมาณการหลั่งของฮอร์โมนลดน้อยลงเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α และเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ZH, ZE, TE และ GM ที่ความเข้มข้นได้แก่ 12.5, 25, 50 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ทั้งก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α (Protective effect) และหลังจากที่กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α (Therapeutic effect) จากผลการทดลองในครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการอักเสบที่ผ่านกลไก NF- KB และปริมาณการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ได้ เนื่องจากปริมาณการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ที่ลดน้อยลงนี้ อาจมีสาเหตุมาจากกลไกการทำงานของโมเลกุลตัวอื่นที่ไม่ใช่ NF- KB ก็ได้ ดังนั้นควรเพิ่มการทดลองด้วยการทดสอบฤทธิ์ของ NF- KB inhibitor ต่อการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ในสถานะเดียวกันด้วย เพื่อให้แน่ใจว่า การหลั่งของฮอร์โมน GnRH ที่ลดน้อยลงเป็นผลมาจากกระบวนการอักเสบที่ผ่าน TNF- α -induced NF- KB signaling pathway นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยง

เซลล์เพื่อตรวจสอบปริมาณของฮอร์โมน GnRH ยังมีปัญหาที่เจอคือปริมาณฮอร์โมน GnRH ที่วัดได้มีปริมาณค่อนข้างน้อยและไม่คงที่ อาจเป็นเพราะว่า GnRH เป็นฮอร์โมนชนิดเปปไทด์ ซึ่งมีขนาดเล็กและสลายได้ง่าย อีกทั้งปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อรูปแบบการหลั่งของฮอร์โมนที่เป็นแบบ pulsatile (เพิ่มลดเป็นจังหวะ) ดังนั้นขั้นตอนการเก็บน้ำเลี้ยงจึงมีความสำคัญมากและเพื่อป้องกันการรบกวนของฮอร์โมนชนิดอื่น เช่น steroid hormones จึงมีการใช้ Charcoal stripped FBS แทน FBS ปกติด้วย และจากผลการศึกษานี้ยังมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Watanobe และคณะ ซึ่งพบว่า TNF- α สามารถกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำของ LPS ต่อการยับยั้งการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ได้ (133) อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการเกิดความชราและปริมาณการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและมีความขัดแย้งกันอยู่บ้าง เพราะบางการศึกษาพบว่าการศึกษาใน *in vitro* TNF- α ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ใน hypothalamic explants ของหนูเพศผู้ และ proestrus ของหนูเพศเมีย แต่การศึกษาใน *in vivo* พบว่า TNF- α สามารถยับยั้งการหลั่งของฮอร์โมน LH ในหนูตัวผู้ที่มีลักษณะ dispersed anterior pituitaries และ gonadectomized (ถูกตัดต่อมเพศออก) (6, 134) และกระบวนการสังเคราะห์ GnRH ขึ้นมาใหม่และการหลั่งของฮอร์โมน GnRH จากส่วน neuroterminals ของ GnRH เป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน โดยกระบวนการเกิดความชราและฮอร์โมน oestrogen อาจมีผลต่อการหลั่งของ GnRH แต่ไม่มีผลต่อกระบวนการสร้างระดับยีนของ GnRH (5) ความแตกต่างของผลการศึกษาที่ผ่านมานี้ อาจเกิดจากความแตกต่างในการใช้โมเดลในการศึกษา เช่น ชนิดของเซลล์ที่ใช้, ชนิดและช่วงอายุของสัตว์ทดลอง รวมทั้งตำแหน่งของเนื้อเยื่อ อวัยวะจากสัตว์ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษา เป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบผ่านการแสดงออกของยีนในตระกูล NF- κ B ได้แก่ NF- κ B1, NF- κ B2, RelA (p65) และ RelB ยีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของ NF- κ B ได้แก่ I κ B- α และ IKK- β ยีนเป้าหมายของ NF- κ B ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 รวมทั้งลดการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความสุขและมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการแสดงออกของ p65 ได้แก่ SIRT1 อีกทั้งยังเพิ่มการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 และลดระดับการหลั่งของฮอร์โมน GnRH อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาดของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ZH, ZE, TE และ GM ที่ความเข้มข้นได้แก่ 12.5, 25, 50 และ 50 μ g/mL ตามลำดับ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอักเสบผ่านการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NF- κ B ลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 และสามารถเพิ่มระดับการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ได้ และจากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่า สารสกัดหยาดของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีที่สุด ได้แก่ สารสกัดหยาดของใบรางจืดด้วยเอทานอล (TE) ดังนั้นสารสกัดหยาดของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถนำไปศึกษาต่อยอดเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาสมุนไพร ใช้ในการป้องกันและรักษากระบวนการเกิดความชราและโรคที่เกิดจากความชราอันเนื่องมาจากกระบวนการอักเสบ



ภาพที่ 53 สรุปผลการวิจัยทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้

5.3 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

การศึกษาในครั้งต่อไป เพื่อเป็นการต่อยอดการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดจากสมุนไพرتั้ง 3 ชนิด ควรสกัดแยกสารสกัดหยาบให้เป็นสารบริสุทธิ์ เพื่อจะได้ทราบว่าสารชนิดใดในสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบมากที่สุด รวมทั้งหาว่ายาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B มาใช้ในการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ของสารสกัดสมุนไพรร และควรเพิ่มการศึกษาด้านกลไกการอักเสบที่เป็น down-stream ของ NF- κ B signaling pathway ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง GT1-7



รายการอ้างอิง

1. Situation of the Thai Elderly (Population situations). [13 March 2016]; Available from: <http://fopdev.or.th/en/situation-of-the-thai-elderly-population-situations/>.
2. Public Health and Aging: Trends in Aging --- United States and Worldwide. [14 March 2016]; Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5206a2.htm>.
3. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*. 2010;1(2):72-4.
4. Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211-6. Epub 2013/05/03.
5. Gore AC, Oung T, Woller MJ. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. *Journal of neuroendocrinology*. 2002;14(4):300-9. Epub 2002/04/20.
6. Russell SH, Small CJ, Stanley SA, Franks S, Ghatei MA, Bloom SR. The in vitro role of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the hypothalamic-pituitary gonadal axis. *Journal of neuroendocrinology*. 2001;13(3):296-301. Epub 2001/02/24.
7. Jeenapongsa R, Yoovathaworn K, Sriwatanakul KM, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Journal of ethnopharmacology*. 2003;87(2-3):143-8. Epub 2003/07/16.
8. Panthong A, Kanjanapothi D, Niwatananant W, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V. Anti-inflammatory activity of compound D {(E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-ol} isolated from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 1997;4(3):207-12. Epub 1997/09/01.
9. Chan EWC, Eng SY, Tan YP, Wong ZC. Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Thunbergia laurifolia*: A Review. *Pharmacognosy Journal*. 2011;3(24):1-6.

10. Siriwatanametanon N, Fiebich BL, Efferth T, Prieto JM, Heinrich M. Traditionally used Thai medicinal plants: in vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;130(2):196-207. Epub 2010/05/04.
11. Harman D. Free Radical Theory of Aging: An Update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1067(1):10-21.
12. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(11):7124-8. Epub 1981/11/01.
13. Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer letters*. 2006;236(1):13-23. Epub 2005/06/28.
14. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5271):70-4. Epub 1996/07/05.
15. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and disease*. 2010;1(2):72-4. Epub 2010/12/07.
16. ทฤษฎีความชรา. 2011 [cited 2013 25 September]; Available from: <http://www.nutramedica.co.th/health-knowledge-th/health-tips-th/1629/1629>.
17. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and disease*. 2010;1(2):147-57. Epub 2010/10/01.
18. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing research reviews*. 2009;8(1):18-30. Epub 2008/08/12.
19. Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical interventions in aging*. 2007;2(3):401-12. Epub 2007/11/30.
20. Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP. Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology*. 2007;42(9):845-51. Epub 2007/03/24.
21. Bjorksten J, Tenhu H. The crosslinking theory of aging — Added evidence. *Experimental Gerontology*. 1990;25(2):91-5.
22. Sastre J, Pallardo FV, Vina J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free radical biology & medicine*. 2003;35(1):1-8. Epub 2003/06/27.

23. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2005;2005(17):cp1.
24. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2002;2002(37):cp14.
25. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscopy Research and Technique*. 2002;59(4):264-72.
26. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The Inflammation Hypothesis of Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;928(1):327-35.
27. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(3-4):572-81. Epub 2006/05/09.
28. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):149-60. Epub 2007/12/29.
29. Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:861231. Epub 2014/06/27.
30. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 1999;54(7):M357-64. Epub 1999/08/26.
31. Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and atherosclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2000;121(2):255-60.
32. Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta neurologica Scandinavica*. 1999;100(1):34-41. Epub 1999/07/23.
33. Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, et al. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *The American journal of physiology*. 1998;275(2 Pt 1):E294-9. Epub 1998/08/04.

34. Roubenoff R, Harris TB, Abad LW, Wilson PW, Dallal GE, Dinarello CA. Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 1998;53(1):M20-6. Epub 1998/02/19.
35. Shaftel SS, Griffin WS, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of neuroinflammation*. 2008;5:7. Epub 2008/02/28.
36. Mrak RE, Griffin WS. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2001;22(6):903-8. Epub 2002/01/05.
37. Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, et al. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *Journal of neuroimmunology*. 2000;103(1):97-102. Epub 2000/02/16.
38. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-54. Epub 1995/08/15.
39. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(5):878-88.
40. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Amado JA, Olmos JM, Gonzalez-Macias J. Age-related differences in cytokine secretion. *Gerontology*. 1994;40(1):8-12. Epub 1994/01/01.
41. Cohen HJ, Pieper CF, Harris T, Rao KM, Currie MS. The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 1997;52(4):M201-8. Epub 1997/07/01.
42. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP. Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life sciences*. 1992;51(25):1953-6. Epub 1992/01/01.
43. Kwon H, Sung B, Kim J, Lee J, Kim N, Yoo M, et al. The effect of lipopolysaccharide on enhanced inflammatory process with age: Modulation of NF-**KB**. *AGE*. 2001;24(4):163-71.

44. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging and Disease*. 2011;2(6):449-65.
45. Kim H-J, Kim K-W, Yu B-P, Chung H-Y. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF- κ B activation and I κ B α degradation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(5):683-92.
46. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Jr., et al. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(24):15148-56. Epub 1998/06/17.
47. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;928:327-35. Epub 2002/01/25.
48. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscopy research and technique*. 2002;59(4):264-72. Epub 2002/11/09.
49. Jung KJ, Lee EK, Yu BP, Chung HY. Significance of protein tyrosine kinase/protein tyrosine phosphatase balance in the regulation of NF- κ B signaling in the inflammatory process and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(7):983-91.
50. Furuno T, Nakanishi M. Neurotrophic factors increase tumor necrosis factor- α -induced nuclear translocation of NF-kappaB in rat PC12 cells. *Neuroscience letters*. 2006;392(3):240-4. Epub 2005/10/26.
51. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF-kappaB in Aging and Disease. *Aging and disease*. 2011;2(6):449-65. Epub 2012/03/08.
52. Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Experimental Gerontology*. 2000;35(5):521-32.
53. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual review of immunology*. 1994;12:141-79. Epub 1994/01/01.

54. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*. 1996;14:649-83. Epub 1996/01/01.
55. Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock (Augusta, Ga)*. 2002;18(2):99-106. Epub 2002/08/09.
56. Sander M, Oxlund B, Jespersen A, Krasnik A, Mortensen EL, Westendorp RG, et al. The challenges of human population ageing. *Age and ageing*. 2015;44(2):185-7. Epub 2014/12/03.
57. Niederberger E, Geisslinger G. The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(10):3432-42. Epub 2008/06/19.
58. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*. 2006;25(51):6887-99. Epub 2006/10/31.
59. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Phytochemicals suppress nuclear factor-kappaB signaling: impact on health span and the aging process. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2012;15(1):23-8. Epub 2011/11/24.
60. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Phytochemicals suppress nuclear factor-kappaB signaling: impact on health span and the aging process. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2012;15(1).
61. Golan-Goldhirsh A, Gopas J. Plant derived inhibitors of NF-kappaB. *Phytochem Rev*. 2014;13(1):107-21.
62. Park SJ, Youn HS. Suppression of homodimerization of toll-like receptor 4 by isoliquiritigenin. *Phytochemistry*. 2010;71(14-15):1736-40. Epub 2010/08/13.
63. Hwang JT, Park OJ, Lee YK, Sung MJ, Hur HJ, Kim MS, et al. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *International journal of molecular medicine*. 2011;28(1):25-31. Epub 2011/04/07.
64. Yang J, Li Q, Zhou XD, Kolosov VP, Perelman JM. Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF-kappaB activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human

airway epithelial cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;351(1-2):29-40. Epub 2011/01/14.

65. Kim JA, Yang SY, Song SB, Kim YH. Effects of impressic acid from *Acanthopanax koreanum* on NF-kappaB and PPARgamma activities. *Archives of pharmacal research*. 2011;34(8):1347-51. Epub 2011/09/13.

66. Liu WH, Chang LS. Suppression of Akt/Foxp3-mediated miR-183 expression blocks Sp1-mediated ADAM17 expression and TNFalpha-mediated NFkappaB activation in piceatannol-treated human leukemia U937 cells. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(5):670-80. Epub 2012/06/19.

67. Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Leite DF, et al. beta-Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPARgamma pathway. *The American journal of pathology*. 2011;178(3):1153-66. Epub 2011/03/02.

68. Zhang W, Li XJ, Zeng X, Shen DY, Liu CQ, Zhang HJ, et al. Activation of nuclear factor-kappaB pathway is responsible for tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of endothelin B2 receptor expression in vascular smooth muscle cells in vitro. *Toxicology letters*. 2012;209(2):107-12. Epub 2011/12/31.

69. Lee MY, Lee JA, Seo CS, Ha H, Lee H, Son JK, et al. Anti-inflammatory activity of *Angelica dahurica* ethanolic extract on RAW264.7 cells via upregulation of heme oxygenase-1. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2011;49(5):1047-55. Epub 2011/01/29.

70. Kumar A, Sharma SS. NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(2):360-5. Epub 2010/03/10.

71. Buhrmann C, Mobasher A, Busch F, Aldinger C, Stahlmann R, Montaseri A, et al. Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(32):28556-66. Epub 2011/06/15.

72. Park B, Sung B, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Triptolide, histone acetyltransferase inhibitor, suppresses growth and chemosensitizes leukemic cells

- through inhibition of gene expression regulated by TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-NIK-TAK1-IKK pathway. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(9):1134-44. Epub 2011/08/09.
73. Bae JW, Bae JS. Barrier protective effects of lycopene in human endothelial cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2011;60(8):751-8. Epub 2011/04/14.
74. Kim HG, Kim JY, Hwang YP, Lee KJ, Lee KY, Kim DH, et al. The coffee diterpene kahweol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;217(3):332-41. Epub 2006/11/14.
75. Ozer J, Eisner N, Ostrozhenkova E, Bacher A, Eisenreich W, Benharroch D, et al. Nuphar lutea thioalkaloids inhibit the nuclear factor kappaB pathway, potentiate apoptosis and are synergistic with cisplatin and etoposide. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(19):1860-8. Epub 2009/08/29.
76. Brody H. Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology*. 1955;102(2):511-6. Epub 1955/04/01.
77. Braak H, Braak E. Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with ageing and Alzheimer's disease. *Progress in brain research*. 1986;70:185-212. Epub 1986/01/01.
78. Coleman PD, Flood DG. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 1987;8(6):521-45. Epub 1987/11/01.
79. Roth GS. Age-related changes in specific glucocorticoid binding by steroid-responsive tissues of rats. *Endocrinology*. 1974;94(1):82-90. Epub 1974/01/01.
80. Roth GS. Reduced glucocorticoid binding site concentration in cortical neuronal perikarya from senescent rats. *Brain Research*. 1976;107(2):345-54.
81. Haji M, Kato KI, Nawata H, Ibayashi H. Age-related changes in the concentrations of cytosol receptors for sex steroid hormones in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Brain Res*. 1981;204(2):373-86. Epub 1980/01/21.
82. Tsitouras PD, Kowatch MA, Harman SM. Age-related alterations of isolated rat leydig cell function: gonadotropin receptors, adenosine 3',5'-monophosphate

response, and testosterone secretion. *Endocrinology*. 1979;105(6):1400-5. Epub 1979/12/01.

83. Little PJ, Adams ML, Cicero TJ. Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the developing male rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1992;263(3):1056-61. Epub 1992/12/01.

84. Bartke A. Growth hormone and aging: A challenging controversy. *Clinical Interventions in Aging*. 2008;3(4):659-65.

85. Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology*. 1980;107(6):1875-9. Epub 1980/12/01.

86. Kalimi M, Banerji A. Effect of age on the in vitro glucocorticoid-binding activity of rat adipocytes. *Mechanisms of ageing and development*. 1981;17(1):19-25. Epub 1981/09/01.

87. Steger RW, Peluso JJ, Bruni JF, Hafez ES, Meites J. Gonadotropin binding and testicular function in old rats. *Endokrinologie*. 1979;73(1):1-5. Epub 1979/02/01.

88. Sorrentino RN, Florini JR. Variations among individual mice in binding of growth hormone and insulin to membranes from animals of different ages. *Experimental aging research*. 1976;2(3):191-205. Epub 1976/05/01.

89. Roth GS, Hess GD. Changes in the mechanisms of hormone and neurotransmitter action during aging: current status of the role of receptor and post-receptor alterations. A review. *Mechanisms of ageing and development*. 1982;20(3):175-94. Epub 1982/11/01.

90. Mayer CM, Fick LJ, Gingerich S, Belsham DD. Hypothalamic cell lines to investigate neuroendocrine control mechanisms. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(3):405-23. Epub 2009/04/04.

91. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*. 1990;5(1):1-10. Epub 1990/07/01.

92. Dhillon SS, Kim GL, Belsham DD. Neuroendocrine Gene Regulation in Hypothalamic Cell Lines. *The Open Neuroendocrinology Journal*. 2010;3(3):6-15. Epub 2009/08/06.

93. Radovick S, Wray S, Lee E, Nicols DK, Nakayama Y, Weintraub BD, et al. Migratory arrest of gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(8):3402-6. Epub 1991/04/15.
94. Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, et al. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. 2006;147(2):816-26. Epub 2005/11/19.
95. Wolfe A, Ng Y, Divall SA, Singh SP, Radovick S. Development of an immortalised, post-pubertal gonadotrophin-releasing hormone neuronal cell line. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20(9):1029-37. Epub 2008/07/16.
96. Choi SJ, Kim F, Schwartz MW, Wisse BE. Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;298(6):E1122-30. Epub 2010/04/01.
97. Fallarero A, Loikkanen JJ, Mannisto PT, Castaneda O, Vidal A. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2003;10(1):39-47. Epub 2003/03/08.
98. Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211-6.
99. Gabuzda D, Yankner BA. Physiology: Inflammation links ageing to the brain. *Nature*. 2013;497(7448):197-8.
100. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine journal*. 2009;56(6):729-37. Epub 2009/07/18.
101. Min JY, Park MH, Lee JK, Kim HJ, Park YK. Gonadotropin-releasing hormone modulates immune system function via the nuclear factor-kappaB pathway in murine

- Raw264.7 macrophages. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(3):177-84. Epub 2009/02/28.
102. Kim HH. Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression. *Seminars in reproductive medicine*. 2007;25(5):313-25. Epub 2007/08/22.
103. Pongprayoon U, Tuchinda P, Claeson P, Sematong T, Reutrakul V, Soontornsaratune P. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part II: Hexane extractives. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 1997;3(4):323-6.
104. Jeenapongsa R, Yoovathaworn K, Sriwatanakul KM, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Journal of ethnopharmacology*. 2003;87(2-3):143-8.
105. Pongprayoon U, Soontornsaratune P, Jarikasem S, Sematong T, Wasuwat S, Claeson P. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part I: The essential oil. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 1997;3(4):319-22.
106. Panthong A, Kanjanapothi D, Niwatananant W, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V. Anti-inflammatory activity of compound D {(E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-ol} isolated from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 1997;4(3):207-12.
107. Visakha Aupaphong V, Dechatiwongse Na Ayudhya T, Koontongkaew S. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 by *Zingiber cassumunar* Roxb. constituents in human dental pulp cells. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013;7:2451-58.
108. Sukatta U, Rugthaworn P, Punjee P. Chemical Composition and Physical Properties of Oil from Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) Obtained by Hydro Distillation and Hexane Extraction. *Kasetsart*. 2009;43:212-7.
109. Palipoch S, Punsawad C, Suwannalert P. *Thunbergia laurifolia*, a new choice of natural antioxidant to prevent oxidative stress-related pathology: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013;7(12):698-701.

110. Wonkchalee O, Boonmars T, Aromdee C, Laummaunwai P, Khunkitti W, Vaeteewoottacharn K, et al. Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of *Thunbergia laurifolia* Linn. on experimental opisthorchiasis. *Parasitology research*. 2012;111(1):353-9. Epub 2012/02/14.
111. Tangpong J, Satarug S. Alleviation of lead poisoning in the brain with aqueous leaf extract of the *Thunbergia laurifolia* (Linn.). *Toxicology letters*. 2010;198(1):83-8. Epub 2010/05/15.
112. Aritajat S, Wutteerapol S, Saenphet K. Anti-diabetic effect of *Thunbergia laurifolia* Linn. aqueous extract. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2004;35 Suppl 2:53-8. Epub 2005/05/24.
113. Pramyothin P, Chirdchupunsare H, Rungsipipat A, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn extract in rats treated with ethanol: in vitro and in vivo studies. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;102(3):408-11. Epub 2005/08/09.
114. Phosri S, Mahakunakorn P, Srisodsai A. Anti-inflammatory effects of *Thunbergia laurifolia* leaf extract: The effects on the production of nitric oxide and prostaglandin E2 in macrophage cell line (RAW 264.7). 2010.
115. Kanchanapooma T, Kasaib R, Yamasakib K. Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia*. *Phytochemistry*. 2002:769-71.
116. Siriwatanametanon N, Heinrich M. The Thai medicinal plant *Gynura pseudochina* var. *hispida*: chemical composition and in vitro NF-kappaB inhibitory activity. *Natural product communications*. 2011;6(5):627-30. Epub 2011/05/28.
117. Liposits Z, Merchenthaler I, Wetsel WC, Reid JJ, Mellon PL, Weiner RI, et al. Morphological characterization of immortalized hypothalamic neurons synthesizing luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*. 1991;129(3):1575-83. Epub 1991/09/01.
118. Wetsel WC, Mellon PL, Weiner RI, Negro-Vilar A. Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 1991;129(3):1584-95. Epub 1991/09/01.
119. Wetsel WC, Valença MM, Merchenthaler I, Liposits Z, López FJ, Weiner RI, et al. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing

hormone-secreting neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(9):4149-53.

120. Whyte DB, Lawson MA, Belsham DD, Eraly SA, Bond CT, Adelman JP, et al. A neuron-specific enhancer targets expression of the gonadotropin-releasing hormone gene to hypothalamic neurosecretory neurons. Molecular Endocrinology. 1995;9(4):467-77.

121. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda MD2004.

122. ว่านมหากาฬ. [13 March 2016]; Available from: <http://puechkaset.com>.

123. วิธีการเก็บส่วนที่ใช่เป็นยา. [13 March 2016]; Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs1-4.htm.

124. Mahakunakorn P. Study on the anti-inflammatory mechanisms of Thunbergia laurifolia leaf extracts. 2010.

125. Limvuttegriyarat T, Poachanukoon O, Koontongkaew S, Na Ayudhya TD. Crude ethanolic extracts of Zingiber cassumunar ROXB. inhibit PMA-induced MUC2 and MUC5AC expression via ERK inhibition in human airway epithelial cells. Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand. 2014;32(4):328-36. Epub 2014/12/30.

126. Kelestimur H, Kacar E, Uzun A, Ozcan M, Kutlu S. Arg-Phe-amide-related peptides influence gonadotropin-releasing hormone neurons. Neural regeneration research. 2013;8(18):1714-20. Epub 2013/06/25.

127. Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, Behl C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. The Journal of biological chemistry. 1999;274(14):9828-35. Epub 1999/03/27.

128. Belmin J, Bernard C, Corman B, Merval R, Esposito B, Tedgui A. Increased production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by arterial wall of aged rats. The American journal of physiology. 1995;268(6 Pt 2):H2288-93. Epub 1995/06/01.

129. Son YS, Park HJ, Kwon OB, Jung SC, Shin HC, Lim S. Antipyretic effects of acupuncture on the lipopolysaccharide-induced fever and expression of interleukin-6

and interleukin-1 beta mRNAs in the hypothalamus of rats. *Neuroscience letters*. 2002;319(1):45-8. Epub 2002/01/30.

130. Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, et al. SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF-kappaB activity. *PloS one*. 2012;7(9):e46364. Epub 2012/10/03.

131. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cellular signalling*. 2013;25(10):1939-48. Epub 2013/06/19.

132. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*. 2004;23(12):2369-80. Epub 2004/05/21.

133. Watanobe H, Hayakawa Y. Hypothalamic interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats. *Endocrinology*. 2003;144(11):4868-75. Epub 2003/09/10.

134. Kalra PS, Edwards TG, Xu B, Jain M, Kalra SP. The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Domestic Animal Endocrinology*. 1998;15(5):321-32.



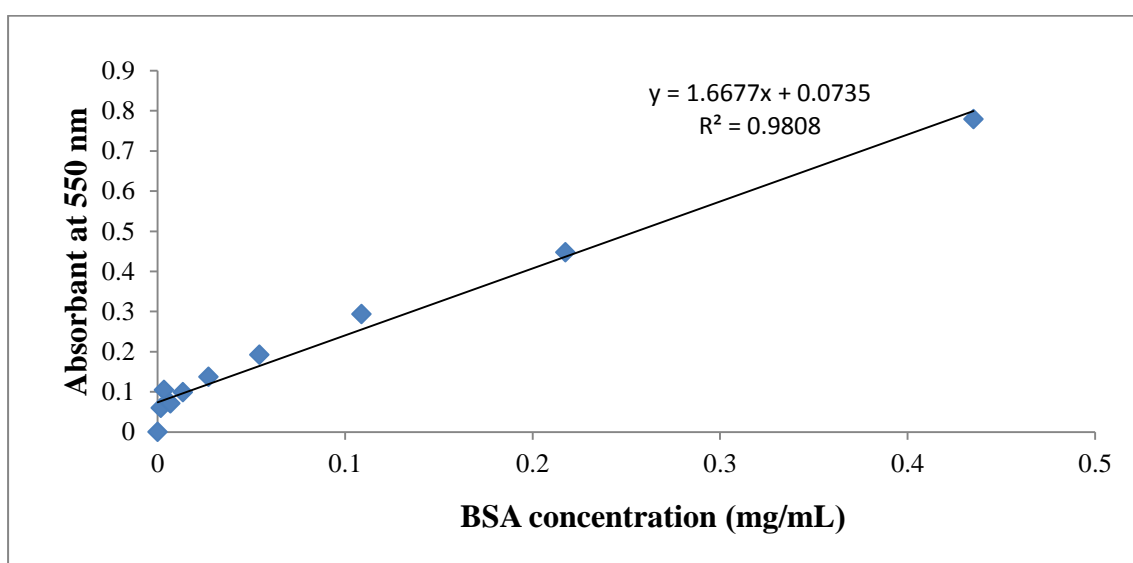
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

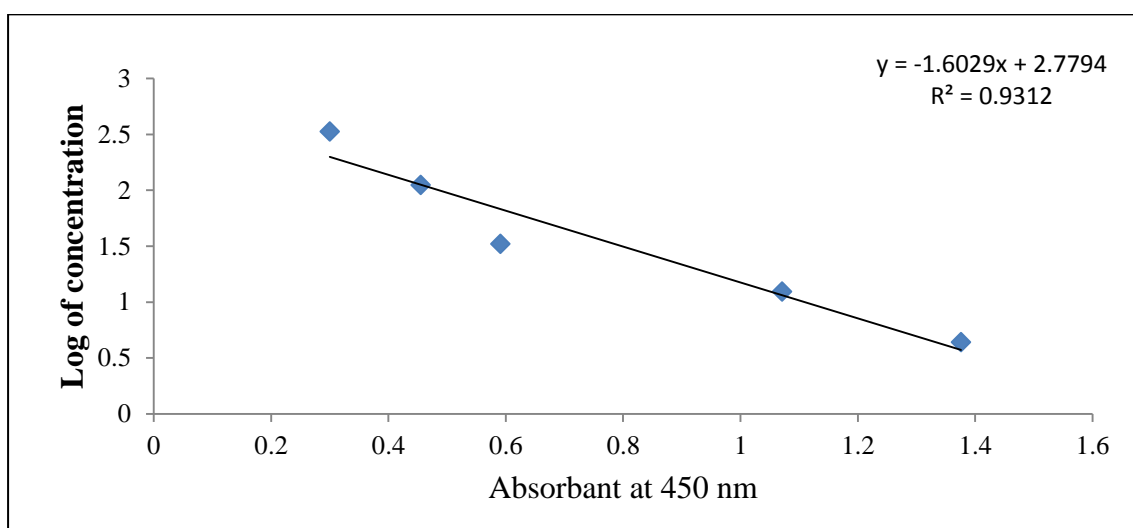
ภาคผนวก ก

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง GT1-7 ด้วยวิธี Bradford assay



2. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัดปริมาณการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ด้วยวิธี ELISA



ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

- อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

ปริมาตรรวม 100 mL เตรียมจาก DMEM ชนิด high glucose 90 mL รวมกับ FBS (ที่ถูkB่มแล้วที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที) 10 mL และยาปฏิชีวนะ Penicillin/Streptomycin 1 mL เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4°C

- 1X phosphate buffer saline pH 7.4

ปริมาตรรวม 1,000 mL เตรียมจากการเจือจาง 10X PBS โดยผสม 10X PBS ปริมาตร 100 mL และน้ำ Milli Q 900 mL นำไปอบฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

- MTT reagent

ปริมาตรรวม 50 mL โดยความเข้มข้นของน้ำยา MTT ที่ใช้คือ 5 mg/mL เตรียมจากการชั่งผง MTT 250 mg ละลายใน 1X PBS ปริมาตร 50 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

- TNF- α 10 ng/mL

เตรียมจาก stock TNF- α ความเข้มข้น 100 μ g/mL ที่ละลายในสารละลาย BSA

- Bradford solution

ปริมาตรรวม 50 mL เตรียมจาก stock น้ำยา Bradford 10 mL ผสมกับน้ำกลั่น 40 mL กรองผ่าน กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C พ้นจากแสง

- โปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin

ปริมาตรรวม 1 mL เตรียมโดยชั่ง BSA 1 mg ละลายในน้ำกลั่น 1 mL เตรียมเป็น stock โปรตีน มาตรฐานความเข้มข้น 1 mg/mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

- 10% Ammonium persulfate

ปริมาตรรวม 1 mL เตรียมโดยชั่ง ammonium persulfate 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น 1 mL (ควรใช้ ทันที)

- 1X Running buffer pH 8.75

ปริมาตรรวม 1 L เตรียมโดยชั่ง 25 mM Tris 3.03 g, 192 mM Glycine 14.42 g และ 0.1% SDS 1 g ละลายในน้ำ Milli Q 1 L เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ควรใช้เกิน 3 ครั้ง)

- 1X Transfer buffer pH 8.75

ปริมาตรรวม 1 L เตรียมโดยชั่ง 25 mM Tris 3.03 g และ 192 mM Glycine 14.42 g ละลายใน 100% methanol 200 mL ที่ละลายอยู่ในน้ำ Milli Q 800 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C (ไม่ควรใช้เกิน 3 ครั้ง)

- 1X TBS-T

ปริมาตรรวม 1 L เตรียมโดยชั่ง 20 mM TrisHCL (pH 7.5) 2.42 g, และ 150 mM NaCl 8.76 g ละลายในน้ำ Milli Q 1 L จากนั้นใส่ 1% Tween-20 1 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

- Blocking buffer

ปริมาตรรวม 20 mL เตรียมโดยชั่ง non-fat dry milk 1 g ละลายใน TBS-T 20 mL (ควรใช้ทันที)

- Developer และ Fixer working solution

ปริมาตรรวม 80 mL เตรียมโดยผสม stock น้ำยา Developer และ Fixer อย่างละ 15 mL ละลายในน้ำ Milli Q ปริมาตร 75 mL (ควรใช้ทันที)

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

คำย่อ	คำอธิบาย
GT1-7	Hypothalamic neuronal cell line (GnRH neuron)
MBH	mediobasal hypothalamus
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
SIRT1	Sirtuin1
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
FBS	Fetal Bovine Serum
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
RT	Reverse transcriptase
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DNase I	Deoxyribonuclease I

APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine Serum Albumin
ZH	สารสกัดจากเหง้าไพลด้วยเฮกเซน
ZE	สารสกัดจากเหง้าไพลด้วยเอทานอล
TH	สารสกัดจากใบรางจืดด้วยเฮกเซน
TE	สารสกัดจากใบรางจืดด้วยเอทานอล
GH	สารสกัดจากใบว่านมหากาฬด้วยเฮกเซน
GM	สารสกัดจากใบว่านมหากาฬด้วยเมทานอล

μg

ไมโครกรัม

ng

นาโนกรัม

μ

ไมครอน

mL

มิลลิลิตร

μL

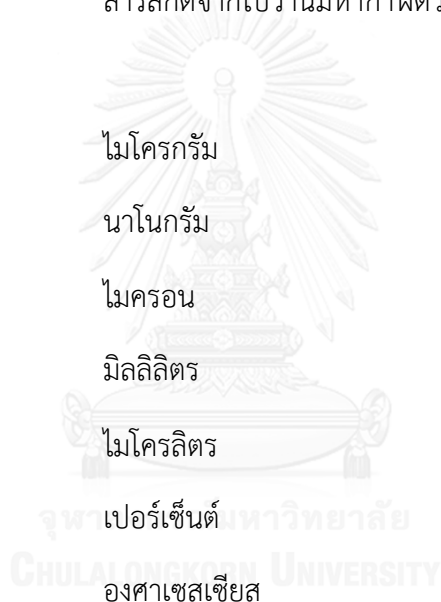
ไมโครลิตร

%

เปอร์เซ็นต์

$^{\circ}\text{C}$

องศาเซลเซียส



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสกวรัตน์ จันทรไพจิตร เกิดเมื่อวันที่ 6 มกราคม พ.ศ.2533 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขา เทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554 และเข้ารับ การศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณู ทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 ในขณะที่เข้ารับ การศึกษา ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนสำหรับผู้สมัครที่ไม่ผ่านการคัดเลือก ทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนการวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 25 ครั้งที่3/57 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

