

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทอง ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7

ภาณุรัฐ เดชะยนต์*, ปฐมพงษ์ เผือกลี, จิตพิสุทธิ์ จันทร์ทองอ่อน, อรกมล จำปา, ธนา จักรเมธา,
กิตรวี จิรรัตน์สถิต

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

* ผู้รับผิดชอบบทความ: Nuzz@hotmail.com

บทคัดย่อ

ตำรับยามหานิลแห่งทอง ได้รับการบรรจุในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 ตามตำราของการแพทย์แผนไทย ยาตำรับนี้มีสรรพคุณรักษาอาการไข้ แก้อ่อนในกระหายน้ำและอัสสุกใส อย่างไรก็ตามพบว่าในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ประเมินประสิทธิผลของตำรับยามหานิลแห่งทอง ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทอง โดยทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ interleukin 6 (IL-6) ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า สารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการหลั่ง TNF- α และ IL-6 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 33.09 ± 0.22 และ $17.20 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สรุปได้ว่าเมื่อทดสอบในเซลล์ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงจากแมคโครฟาจในหนู สารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองมีฤทธิ์ด้านการหลั่งสารสื่อที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงให้ข้อมูลเบื้องต้นที่ช่วยสนับสนุนการใช้ตำรับยามหานิลแห่งทองในการรักษาอาการไข้ หรือ อาการร้อนในกระหายน้ำ ซึ่งแพทย์แผนไทยมีการใช้ยาตำรับนี้มายาวนาน แต่อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง และตามด้วยการวิจัยในระดับคลินิกต่อไป เพื่อสร้างความมั่นใจแก่บุคลากรทางการแพทย์ในการตัดสินใจสั่งจ่ายตำรับยานี้แก่ผู้ป่วย

คำสำคัญ: ตำรับยามหานิลแห่งทอง, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ, ทีเอ็นเอฟ-แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-6

Anti-inflammatory Effect of *Ya-Mahanintangtong* Remedy Extract in RAW 264.7 Cell Line

Bhanuz Dechayont*, Pathompong Phuaklee, Jitpisute Chunthorng-Orn, Onkamon Jampa, Thana Juckmeta, Kitrawee Jiraratsatit

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

*Corresponding author: Nuzz@hotmail.com

Abstract

Ya-Mahanintangtong is a Thai herbal remedy listed in the National List of Essential Medicine 2018. According to Thai traditional medicine, this drug recipe possesses anti-infective effects and is used for the treatment of fever, pharyngitis and chickenpox. However, up till now there has been no scientific report regarding the efficacy and safety of *Ya-Mahanintangtong* remedy itself. Therefore, the objective of this study was to assess the anti-inflammatory effect of *Ya-Mahanintangtong* remedy. Thus, proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) production were analyzed using ELISA. The result obtained indicated that the ethanolic extract exhibited higher inhibitory activity TNF- α than IL-6 with IC₅₀ values of 33.09 ± 0.22 and 17.20 ± 0.65 $\mu\text{g/mL}$, respectively. This work demonstrated the anti-inflammatory effect of *Ya-Mahanintangtong* remedy *in vitro* which preliminarily support the use of this Thai folk medicine as an antipyretic and anti-inflammatory agent. However, additional evidence on its safety and efficacy is required. Both preclinical and clinical studies are necessary to ensure the use of this recipe clinically.

Key words: *Mahanintangtong* remedy extracts, anti-inflammatory, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6)

บทนำและวัตถุประสงค์

ไข้ (Fever หรือ Pyrexia) เป็นอาการที่ร่างกายมีอุณหภูมิที่สูงขึ้นกว่าปกติ เกิดจากการสูญเสียความสมดุลภายในร่างกาย จากการตอบสนองเมื่อมีการติดเชื้อโรคหรือมีการเจ็บป่วยจากสาเหตุบางประการ ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย โดยไข้จะเกิดชั่วคราวเฉพาะในช่วงเกิดโรคหรือมีการเจ็บป่วย ในการวินิจฉัยว่าเป็นไข้หรือมีอาการไข้ที่แน่นอนคือ การวัดอุณหภูมิร่างกายด้วยปรอทวัดไข้ทางปากได้สูงกว่า 37.8°C ถือว่ามีไข้¹⁾ โดยสาเหตุของการเกิดไข้สามารถเกิดจากทั้งโรคติดเชื้อและโรคไม่

ติดเชื้อ²⁾ เมื่อร่างกายตอบสนองต่อสาเหตุการเกิดไข้ เช่น การติดเชื้อ แบคทีเรีย ไวรัส การได้รับการบาดเจ็บ การอักเสบ จะทำให้ leukocytes ผลิตสารต่างๆ ออกมา ได้แก่ IL-1, TNF- α และ IL-6 ซึ่ง cytokines เหล่านี้จะทำให้ hypothalamus ผลิต cyclooxygenase เปลี่ยน arachidonic acid ไปเป็น prostaglandins E₂ (PGE₂) โดยที่ PGE₂ มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจาก PGE₂ จะผลิต neurotransmitters คือ cAMP เพื่อปรับ set-point ของอุณหภูมิของร่างกายให้สูงขึ้น ร่างกายก็จะตอบสนองโดยพยายามเพิ่มอุณหภูมิและเพิ่มความร้อนจากการเพิ่มอัตราการเผา

ผลาญของเซลล์และการสิ้นของกล้ามเนื้อและลดการระบายความร้อนออกจากร่างกายโดยการตีตัวของหลอดเลือดใต้ผิวหนัง ทำให้อุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นจนมีค่าเท่ากับที่ตั้งไว้ใหม่ จึงเกิดอาการไข้ขึ้น^[3-4]

ตามตำราการแพทย์แผนไทยมีการใช้ตำรับยamahanihanghong เป็นยาขับปัสสาวะในรูปแบบยาเม็ด ยาแคปซูล และยาผง เป็นตำรับยาช่วยแก้ไข้กาฬ หัด อีสุกอีใส แก้วร้อนในกระหายน้ำ ซึ่งได้ระบุส่วนประกอบของตำรับคือ เนื้อในเมล็ดสะบ้ามอญ (ส้ม) หวายตะค้า (ส้ม) เมล็ดมะกอก (ส้ม) ลูกมะคำดีควาย (ส้ม) ถ่านไม้สัก แก่นจันทร์แดง แก่นจันทร์เทศ ใบพิมเสน ใบย่านาง หมักหอม เบี้ยจั่นคั่ว ยาตำรับนี้ได้รับการบรรจุในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561^[5] จากสรรพคุณยาทางการแพทย์แผนไทย พบว่าสมุนไพรส่วนใหญ่ในตำรับมีฤทธิ์แก้ไข้พิษตัวร้อน แก้พิษไข้กาฬ ได้แก่ เนื้อในเมล็ดสะบ้ามอญ (ส้ม) หวายตะค้า (ส้ม) ถ่านไม้สัก แก่นจันทร์แดง แก่นจันทร์เทศ ใบพิมเสน ใบญานาง หมักหอม มะคำดีควาย (ส้ม) และยังพบว่ามีสมุนไพรอีกสองชนิดที่มีฤทธิ์แก้ร้อนในกระหายน้ำ คือ มะคำดีควาย (ส้ม) และเมล็ดมะกอก (ส้ม)^[6] และจากรายงานการวิจัยของสมุนไพรบางชนิดในตำรับ พบว่า ย่านาง [*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels] แก่นจันทร์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) ไม้สัก (*Tectona grandis* L.f) และ พิมเสนต้น [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์^[7-10] และสารประกอบของจันทร์เทศมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้อีกด้วย^[11-12] แต่จากการทบทวนวรรณกรรมของตำรับยamahanihanghongจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบและประเมินหาตัวยาหลักในตำรับที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้าน

การอักเสบของสารสกัดตำรับmahanihanghong

ระเบียบวิธีศึกษา

การเตรียมสารสกัดตำรับmahanihanghong

การเตรียมสารสกัดด้วยการหมักกับ 95% เอทานอล

นอล

นำสมุนไพรในตำรับยamahanihanghong มาล้างตามสูตรตำรับในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 (ได้น้ำหนักรวมของตำรับเท่ากับ 400 กรัม) จากนั้นนำส่วนประกอบทั้งหมดไปทำการบดหยาบ แล้วนำมากลั่นด้วย 95% เอทานอล จำนวน 1,200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการคนบ่อย ๆ ในระหว่างที่หมัก เมื่อครบเวลานำสมุนไพรที่หมักมากรองออกด้วยกระดาษกรอง Whatman filter paper No.1 เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ และนำสมุนไพรที่กรองออก (บนกระดาษกรอง) ไปทำการหมักต่ออีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งสามครั้งมารวมกัน แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย เครื่อง Rotary evaporator ซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดเพื่อคำนวณ %yield แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารสกัดด้วยการต้มกับน้ำ

นำตำรับยamahanihanghong น้ำหนัก 200 กรัม มาเติมน้ำลงไป 3 เท่าของปริมาณสมุนไพร ทำการต้มเป็นเวลา 15 นาที กรองและเก็บสารสกัดไว้ ทำการต้มสมุนไพรที่กรองออกซ้ำอีก 2 รอบ แล้วนำสารสกัดที่ได้ทั้งสามครั้งมารวมกัน เคี่ยวจนเหลือน้ำเพียง 1 ส่วน (จากน้ำ 3 ส่วน) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman filter paper No.1 แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze dry ซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดเพื่อคำนวณ %yield แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์แมคโครฟาจในหนู (เซลล์ RAW 264.7) เพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS และ 1 มิลลิโมลาร์ sodium pyruvate (Gibco, สหรัฐอเมริกา) บ่มเพาะเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และทำการ sub-culture ทุก ๆ 3 วัน

การกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบ

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน 96 well-plate (cell มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/well) ด้วยอาหารเลี้ยง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) โดยบ่มเซลล์ในตู้บ่มเพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม LPS (lipopolysaccharide) 100 µg/mL ที่อยู่ใน DMEM ลงไปหลุมละ 100 µL เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ DMEM จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรจำนวน 100 µL ในหลุมของ sample และ blank of sample

การทดสอบฤทธิ์ด้านการหลั่งสาร tumor necrosis factor-α (TNF-α) ด้วยวิธี ELISA

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF-α โดยใช้หลักการ Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยทำการติด mouse TNF-α monoclonal antibody บน 96 well plate เติม supernatant ที่ต้องการทำการทดสอบ จากนั้น

เติม detection-antibody แล้วล้างด้วย wash buffer 300 µL/well ทั้งหมด 5 รอบ ก่อนใส่ detection-antibody 100 µL/well แล้วทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย wash buffer 300 µL/well ทั้งหมด 5 รอบ ก่อนใส่ Poly-HRP-Streptavidin 100 µL/well แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย wash buffer 300 µL/well ทั้งหมด 5 รอบ ก่อนใส่ TMB-Solution 100 µL/well แล้วทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติม Stop solution ปริมาณ 50 µL/well นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm และ 630 nm

การคำนวณ % inhibition of TNF-α production มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = (A-C)-(B-D) / (A-C) \times 100$$

โดยที่ A-D : TNF-α concentration (pg/mL)

A : LPS (+), sample (-)

B : LPS (+), sample (+)

C : LPS (-), sample (-)

D : LPS (-), sample (+)

การทดสอบฤทธิ์ด้านการหลั่งสาร Interleukin-6 (IL-6) ด้วยวิธี ELISA

ด้วยหลักการวิธี Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยติด human IL-6 specific monoclonal antibody บน 96-well plate เติม supernatant ที่ทดสอบ จากนั้นเติม detection-antibody แล้วล้างด้วย wash buffer 300 µL/well ทั้งหมด 5 รอบ ก่อนใส่ detection-antibody 100 µL/well แล้วทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม Poly-HRP-Streptavidin แล้วล้าง

ด้วย wash buffer 300 μL /well ทั้งหมด 5 รอบ ก่อนใส่ Poly-HRP-Streptavidin 100 μL /well แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม substrate solution และล้างด้วย wash buffer 300 μL /well ทั้งหมด 5 รอบ ก่อนใส่ TMB-Solution 100 μL /well แล้วทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการหยุดปฏิกิริยา ด้วย Stop solution ปริมาณ 50 μL /well สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm และ 630 nm

การคำนวณ % inhibition of IL-6 production มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = (A-C)-(B-D) / (A-C) \times 100$$

โดยที่ A-D : IL-6 concentration (pg/mL)

A : LPS (+), sample (-)

B : LPS (+), sample (+)

C : LPS (-), sample (-)

D : LPS (-), sample (+)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ใช้วิธี MTT assay โดยอาศัยเอนไซม์ภายใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิตรีดิวส์ MTT สารสีเหลืองเป็นผลึก formazan สีม่วง โดยหลังจากทำการทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ RAW 264.7 ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 μL , 5 mg/mL) ในแต่ละ wells แล้วบ่มต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จาก

นั้น ดูดสารละลายทิ้งไปแล้วเติม DMSO 100 μL เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistic analysis)

ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง แสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาร้อยละการยับยั้งการอักเสบและคำนวณค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและร้อยละในการยับยั้งการอักเสบ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 5

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$

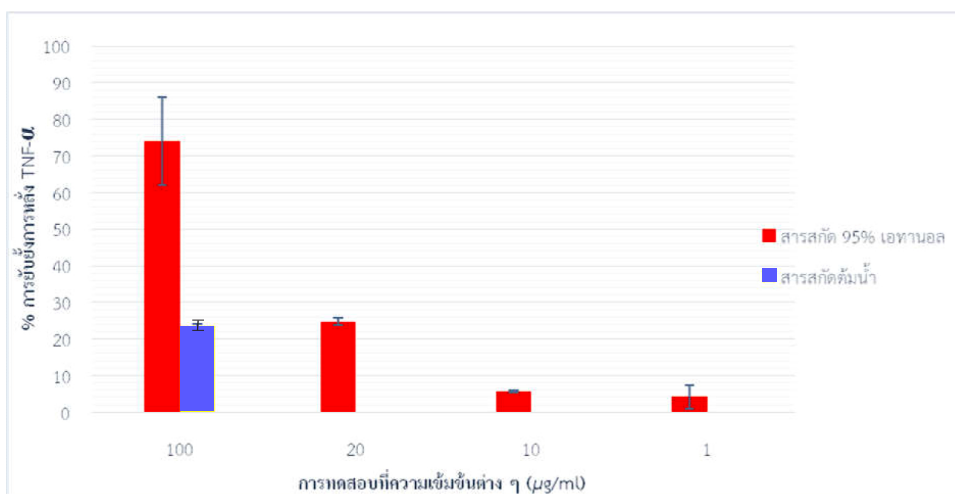
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ ของสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองที่สกัดด้วย 95%เอทานอลและการต้มกับน้ำ พบว่า การสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองด้วยเอทานอลได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยการต้มกับน้ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $33.09 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ ของสารสกัดดังกล่าวสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด (ภาพที่ 1)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6

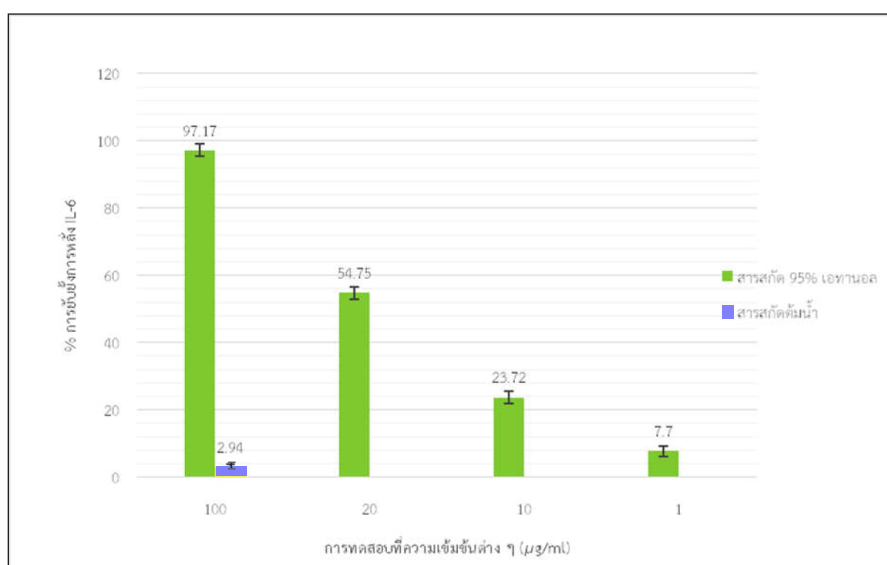
ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6 พบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอลเช่นเดียวกันที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6 ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการต้มกับ

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC_{50} $\mu g/mL$ ในการยับยั้งการหลั่ง $TNF-\alpha$ และ IL-6 ของสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองด้วยวิธีการหมักด้วย 95% เอทานอล และการต้มน้ำ

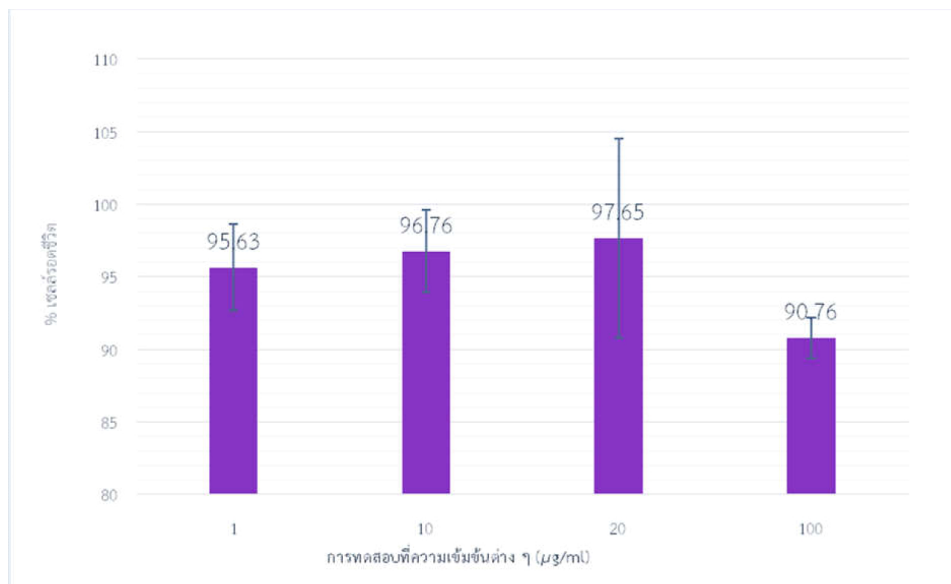
ตำรับยา	วิธีการสกัด	IC_{50} ($\mu g/mL$)	
		การยับยั้งการหลั่ง $TNF-\alpha$	การยับยั้งการหลั่ง IL-6
สารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทอง	สกัด 95%		
	เอทานอล	33.09 ± 0.22	17.20 ± 0.75
	สกัดต้มน้ำ	> 100	> 100



ภาพที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านการหลั่ง $TNF-\alpha$ ของสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ($N = 3$)



ภาพที่ 2 แสดงฤทธิ์ต้านการหลั่ง IL-6 ของสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ($N = 3$)



ภาพที่ 3 แสดงร้อยละของเซลล์ RAW 264.7 รอดชีวิตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี MTT (N = 3)

น้ำ เช่นเดียวกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.20 ± 0.65 $\mu\text{g/mL}$ (ตารางที่ 1) และพบว่าช่วงความเข้มข้น 1-100 $\mu\text{g/mL}$ มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้ระหว่างร้อยละ 7.70 - 97.17 (ภาพที่ 2)

ผลการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay ของสารสกัดตำรับยาห่านิลแห่งทอง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1, 20, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 และพบว่าไม่มีผลทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยพบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ มีร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) มากกว่าร้อยละ 70 (ภาพที่ 3)

อภิปรายผล

ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ และ IL-6 ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารสกัดตำรับยาห่านิลแห่งทองในการทดลองนี้ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับยาห่านิลแห่งทองสามารถยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ และ IL-6 ได้ดี จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของตำรับยาห่านิลแห่งทอง พบว่าสมุนไพรที่เป็นตัวหลักในตำรับยาห่านิลแห่งทอง เช่น เนื้อในเมล็ดสะบ้าอมฤ (ลุม), หวายตะค้า (ลุม), ถ่านไม้สัก, แก่นจันทน์แดง และใบพืชมเสน มีสรรพคุณเป็นยาแก้ไข้ตามตำราการแพทย์แผนไทย และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีงานวิจัยสนับสนุนฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวยาหลักดังกล่าว เช่น สารสกัดเอทานอลจากรากของต้นพืชมเสนสามารถยับยั้ง $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β และ IL-6 ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดการบวม (edema) ที่อุ้งเท้า^[13] และมีการศึกษาส่วนเนื้อดินของต้นพืชมเสนที่สกัดโดย

วิธี ultra sonicator พบว่า สามารถยับยั้ง TNF- α ใน human promonocytic cell line (U937 cell) และ human colon adenocarcinoma cell line (HT-29 cells) ได้ดี^[14] นอกจากนี้สารสกัดส่วนเปลือกของต้นลัก พบว่าสามารถยับยั้ง TNF- α ในเซลล์ RAW 264.7 และ Immortalized Mouse Spleen Dendritic Cells (SRDC) cells^[15] ได้ดี ในส่วนของสารสกัดจันทน์แดงพบว่า มีฤทธิ์แก้ไข้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี brewer's yeast induced fever^[16] ดังนั้นตำรับยามหานิลแห่งทองจึงน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบด้วยสรรพคุณจากตัวยาหลักในตำรับ

ข้อสรุป

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของตำรับยามหานิลแห่งทองด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกันในครั้งนี้นี้ พบว่าสารสกัดตำรับยามหานิลแห่งทองจากการหมักด้วย 95% เอทานอล แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดีกว่าและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในความเข้มข้นที่ทดสอบ ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการนำตำรับยามหานิลแห่งทองมาใช้ในการรักษาอาการไข้ ตัวร้อนหรือ อาการร้อนในกระหายน้ำ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับยามหานิลแห่งทองโดยละเอียดทั้งการศึกษาต่อในระดับระดับพรีคลินิก (ในสัตว์ทดลอง) และการศึกษาทางคลินิก เพื่อสร้างความมั่นใจแก่บุคลากรทางการแพทย์ในการสั่งจ่ายยาตำรับนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

References

1. Murtuza F, Farrier AJ, Venkatesan M, Smith R, Khan A, Uzoigwe CE, Chami G. Is there an association between body temperature and serum lactate levels in hip fracture patients?. The Annals of The Royal College of Surgeons of England. 2015;97(7):513-8.
2. Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'-a review. Journal of Infection and Public Health. 2011;4(3):108-24.
3. Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. Journal of Endotoxin Research. 2004;10(4):201-22.
4. Mendez M, LaPointe MC. PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. Hypertension. 2003;42(4):844-50.
5. Food and Drug Administration. Announcement of the National Drug System Development Committee on National Essential Drug List 2018 [Internet]. 2018 January 19 [cited 2019 May 30]; Food and Drug Administration: Available from: <http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/New/nlem2561.PDF>
6. Thai Traditional Medicine Development Foundation. Thai Traditional Pharmacy book. 1st edition. Bangkok: Phikanes Printing Center; 2005.
7. Prasitpuriprecha C, Damkhang A, Surintha P, Deelum W. Immunomodulating, antioxidant and antimicrobial activities of northeastern Thai edible plant and medicinal plant extracts. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;5(2):99-107.
8. Mahesh SK, Jayakumaran NA. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant potential of different extracts from leaf, bark and wood of *Tectona grandis*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. 2010;2(2):155-8.
9. Shafiei Z, Shuhairi NN, Md Fazly Shah Yap N, Sibungkil HCA, Latip J. Antibacterial activity of *Myristica fragrans* against oral pathogens. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;1-7.
10. Chakrapani P, Venkatesh K, Singh BCS, Jyothi BA, Kumar P, Amareshwari P, Rani AR. Phytochemical, pharmacological importance of Patchouli (*Pogostemon cablin*(Blanco) Benth) an aromatic medicinal plant. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2013;21(2):7-15.

11. Cao GY, Xu W, Yang XW, Gonzalez FJ, Li F. New neolignans from the seeds of *Myristica fragrans* that inhibit nitric oxide production. Food Chemistry. 2015;173:231-7.
12. Cuong TD, Hung TM, Na M, Ha DT, Kim JC, Lee D, Ryoo SW, Lee JH, Choi JS, Min BS. Inhibitory effect on NO production of phenolic compounds from *Myristica fragrans*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter. 2011;21(22):6884-7.
13. Li YC, Liang HC, Chen HM, Tan LR, Yi YY, Qin Z, Zhang WM, Wu DW, Li CW, Lin RF, Su ZR, Lai XP. Anti-*Candida albicans* activity and pharmacokinetics of pogostone isolated from *Pogostemonis Herba*. Phytomedicine. 2012;20(1):77-83.
14. Park SY, Neupane GP, Lee SO, Lee JS, Kim MY, Kim SY, Park BC, Park YJ, Kim JA. Protective effects of *Pogostemon cablin* Bentham water extract on inflammatory cytokine expression in TNBS-induced colitis in rats. Archives of Pharmacal Research. 2014;37(2):253-62.
15. Dègbè M, Debierre-Grockiego F, Têtê-Bénissan A, Dèbare H, Aklikokou K, Dimier-Poisson I, Gbeassor M. Extracts of *Tectona grandis* and *Vernonia amygdalina* have anti-Toxoplasma and pro-inflammatory properties *in vitro*. Parasite. 2018;25:1-8.
16. Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Bouking P. Antinociceptive and antipyretic activities of extracts and fractions from *Dracaena loureiri* in experimental animals. Songklanakarin Journal of Science and Technology (SJST). 2003;25(4):467-76.