

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดินอี-2 ของสารสกัดจากยางโมก (*Wrightia pubescens*) ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู ที่ถูกกระตุ้นด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์

จุฑารัตน์ จิตติมนิ*, กาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์

Received: September 27, 2012

Revised & Accepted: January 4, 2013

บทคัดย่อ

ยางโมก (*Wrightia pubescens*) ถูกใช้บรรเทาอาการอักเสบและอาการปวดตามรายงานภูมิปัญญาท้องถิ่น อย่างไรก็ตามกลไกในการบรรเทาอาการดังกล่าวยังไม่มีข้อมูลชัดเจน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ สารสกัดจากยางโมกในยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดินอี 2 (PGE_2) และ ไซโคลออกซีจีเนส 2 (COX-2) ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) โดยทดสอบด้วยสารสกัดจากยางโมกที่ความเข้มข้นต่างๆ (10, 25, และ 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ตรวจวัดระดับของ PGE_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนโปรตีนที่สกัดจากเซลล์จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ด้วยวิธี Western Blot analysis จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของ PGE_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมกทุกกลุ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว ($P < 0.05$) ในขณะที่แสดงออกของโปรตีน COX-2 ลดลงเฉพาะในเซลล์กลุ่มที่เติม LPS พร้อมกับสารสกัดจากยางโมก 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เท่านั้น ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยางโมกสามารถยับยั้งการสร้าง PGE_2 และระดับการแสดงออกของโปรตีน COX-2 จากเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูได้ ซึ่งอาจนำไปสู่กลไกการลดการอักเสบและปวดได้

คำสำคัญ: โมก, พรอสตาแกลนดินอี 2, ไซโคลออกซีจีเนส 2

Inhibition of prostaglandin E₂ by substances derived from *Wrightia pubescens* latex in LPS-activated RAW 264.7 mouse macrophages

Jutharat Jittimaneer*, Pawana Panomket, Surasak Wanrum

Abstract

Wrightia pubescens latex has been used as an anti-inflammatory and antinociceptive drug in traditional medicine. However, the mechanism involved in inflammation and pain of this plant is still unclear. Therefore, this study aimed to determine the inhibitory activity of substances derived from *Wrightia pubescens* latex (SWL) on prostaglandin E₂ (PGE₂) production and cyclooxygenase 2 (COX-2) expression in LPS-activated RAW 264.7 mouse macrophages. Various concentrations of SWL (10, 25, and 100 mg/mL) were used to treat LPS-activated RAW 264.7 mouse macrophages. PGE₂ level in cell culture supernatant was measured, while the protein extracted from cells was used to determine COX-2 expression by Western Blot analysis. The concentrations of PGE₂ in cell supernatant of most SWL treated groups were significantly reduced compared with LPS alone ($P < 0.05$), whereas COX-2 expression was reduced only in 100 mg/mL of SWL treated group. These results indicated the inhibitory activity of SWL on PGE₂ production and COX-2 protein expression in RAW 264.7 mouse macrophages which may lead to play a role in the reduction of inflammation and pain.

Keywords: *Wrightia pubescens*, PGE₂, COX-2

บทนำ

โมกเป็นพืชที่นิยมปลูกกันทั่วไป เนื่องจากดอกมีกลิ่นหอมและเป็นไม้มงคล นอกจากนี้มีรายงานภูมิปัญญาท้องถิ่นว่ายางโมก (*Wrightia pubescens*) มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดฟัน⁽¹⁾ และรายงานผลการวิจัยพบว่าเปลือกลำต้นโมกชนิด *Wrightia tinctoria* มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด (antinociception) ใช้ในการรักษาอาการปวดท้อง⁽²⁾ นอกจากนี้ในอินเดียยังมีรายงานการใช้สารสกัดจากเปลือกลำต้นและเปลือกรากของ *Wrightia tomentosa* ในการรักษาพิษแมลงป่อง⁽³⁾ การศึกษาต้นโมกชนิด *W. tinctoria* ในหนูพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวด⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเภสัชวิทยาของโมกที่แน่ชัด

สารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบและการปวด มีหลากหลายกลุ่ม PGE_2 เป็นชนิดหนึ่งในกลุ่มของ prostanoid ที่พบมากในร่างกายมนุษย์ และเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในร่างกายหลายประการ เช่น บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท ความดันโลหิต (vascular hypertension) การทำงานของไต และมีบทบาทสำคัญกระบวนการอักเสบและการปวด⁽⁵⁾ การสังเคราะห์ PGE_2 อาศัยเอนไซม์ที่สำคัญคือ COX โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ COX-2⁽⁶⁾ ซึ่งจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นในเซลล์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น ในเซลล์ แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะพบว่า COX-2 และ PGE_2 สูงขึ้นมากเป็นต้น⁽⁷⁾

ส่วนต่างๆของพืชในสกุล *Wrightia* เช่น เมล็ดและยางของ *W. tinctoria* ถูกใช้รักษาอาการบิด (dysentary) และท้องร่วง⁽⁸⁾ สารสกัดจากใบของโมกมัน (*W. tomentosa*) มีฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูทดลอง⁽⁹⁾ ยางและเมล็ดของโมก (*W. pubescens*) มีรายงานว่าถูกใช้รักษาอาการบิดซึ่งเป็นกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นของลำไส้^(10,11) และจากผลการวิจัยสารสกัดจากเปลือกลำต้นของ *W. tinctoria* สามารถลดปริมาตรสารน้ำในลำไส้ของหนูซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยสาร PGE_2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดของ *W. tinctoria* มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ PGE_2 ได้⁽¹²⁾ การยับยั้งการหลั่ง PGE_2 ถือว่าเป็นกลยุทธ์ในการต่อต้านการอักเสบ ตัวอย่างเช่น ยาแอสไพริน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX ทำให้ระดับ PGE_2 ลดลงและส่งผลให้ลดอาการอักเสบได้⁽¹³⁾ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง PGE_2 และ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลการทดลองที่ได้จะมี

โยชน์ในการช่วยอธิบายกลไกการลดการอักเสบและอาการปวดของยางโมกได้

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดจากยางโมก (SWL)

ตัวอย่างยางโมก (*W. pubescens*) จากจังหวัดขอนแก่น มีการระบุชนิดของโมกก่อนการเก็บตัวอย่าง โดยอาศัยข้อมูลจากหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย⁽¹⁴⁾ รวมทั้งเก็บตัวอย่างแห้งไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสตัวอย่างโมกคือ *Wrightia pubescens* J. Jitimanee 2 (KKU20827)

ยางโมกเก็บจากบริเวณลำต้นของพืช และนำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างทันที โดยเติม absolute ethanol ลงไป (อัตราส่วนยางโมกต่อ absolute ethanol คือ 1:1) เพื่อแยกส่วนที่ละลายในแอลกอฮอล์ออกจากส่วนอื่นๆ โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนแอลกอฮอล์ไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมที่อาจปนเปื้อน และทำให้แห้งโดยที่อุณหภูมิต่ำ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

2. สารเคมี

สารเคมีใช้ในการวิจัย ได้แก่ DMEM (Gibco® Invitrogen, USA), Fetal bovine serum (FBS) standard quality และ penicillin/streptomycin 100x (Pacific science Co., Ltd.), COX-2 (murine) polyclonal antiserum, Goat anti-rabbit IgG HRP, และ NS-398 (Cayman chemical, USA), XTT reagent และ LPS (*E. coli* 0111:B4) (Sigma, USA), PGE_2 parameter assay kit (R&D systems Inc., USA), Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) และ Pico stable peroxide solution และ Pico luminal/enhancer solution (Pierce biotechnology, USA)

3. การเตรียมเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู

นำเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10 % FBS, Penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่มี CO_2 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้เซลล์จำนวนตามที่ต้องการ

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยางโมกต่อเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู

นำเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู มาเลี้ยงในเพลทขนาด 96 หลุม (1×10^5 เซลล์/หลุม) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมี 10 % FBS, Penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่มี CO_2 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็นชนิด serum-free DMEM จากนั้นละลายสารสกัดจากยางโมกแห้งด้วย RPMI และเติมลงในเพลทที่เลี้ยงเซลล์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1, 10, 25, และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ไว้นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบหาอัตราการมีชีวิตของเซลล์ (viability test) โดยเติม XTT cell viability reagent นาน 4 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง PGE_2 ของเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจ ของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

นำเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู มาเลี้ยงในเพลทขนาด 24 หลุม (1×10^6 เซลล์/หลุม) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมี 10 % FBS, Penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่มี CO_2 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็นชนิด serum-free DMEM ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง PGE_2 โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 10 กลุ่ม โดยเติมสารต่างๆ เช่น LPS เพื่อกระตุ้นการสร้าง PGE_2 และเติมสารสกัดจากยางโมก (SWL) หรือเติม NS-398 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง PGE_2 และใช้เป็น positive control ของการทดลอง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เซลล์ปกติ เติมนเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์
- กลุ่มที่ 2 เติมน LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 3 เติมน LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ NS-398 10 ไมโครโมลาร์
- กลุ่มที่ 4, 5 และ 6 เติมน LPS กลุ่มละ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับสารสกัดจากยางโมก ความเข้มข้น 10, 25 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
- กลุ่มที่ 7 เติมน LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน

1 ชั่วโมง จากนั้นเติม NS-398 10 ไมโครโมลาร์

- กลุ่มที่ 8, 9 และ 10 เติมน LPS กลุ่มละ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดจากยางโมก ความเข้มข้น 10, 25 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปตรวจวัดความเข้มข้นของ PGE_2 โดยอาศัยชุดตรวจ PGE_2 parameter assay (R&D systems Inc., USA) ซึ่งอาศัยหลักการของเทคนิค enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง COX-2 ของเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

นำเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู มาเลี้ยงในเพลทขนาด 6 หลุม (2×10^6 เซลล์ต่อหลุม) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมี 10 % FBS, Penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่มี CO_2 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็นชนิด serum-free DMEM ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง COX-2 โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มปกติ เติมนเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์
 - กลุ่มที่ 2 เติมน LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - กลุ่มที่ 3 เติมน LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากยางโมก ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - กลุ่มที่ 4 เติมน LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากยางโมก ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - กลุ่มที่ 5 เติมน LPS และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากยางโมก ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง นำเซลล์แมคโครฟาจไปสกัดโปรตีนและตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนที่ได้โดยอาศัย Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) จากนั้นนำโปรตีนตัวอย่าง (10 ไมโครกรัม/ตัวอย่าง) ไปแยกโดยอาศัย 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และทำการถ่ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ตรวจหาโปรตีน COX-2 โดยอาศัย COX-2 (murine) polyclonal antiserum (Cayman chemical, USA) ซึ่งจับด้วย Goat anti-rabbit

IgG HRP (Cayman chemical, USA) จากนั้นเติม Pico stable peroxide solution และ Pico luminal/enhancer solution (Pierce biotechnology, USA) เมื่อปรากฏแถบเรืองแสงเกิดขึ้นบนไนโตรเซลลูโลส จึงนำไปประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

7. วิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าสถิติพื้นฐานได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบสมมติฐานโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way Analysis of Variance) กำหนดความเชื่อมั่นทางสถิติที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ผลการศึกษา

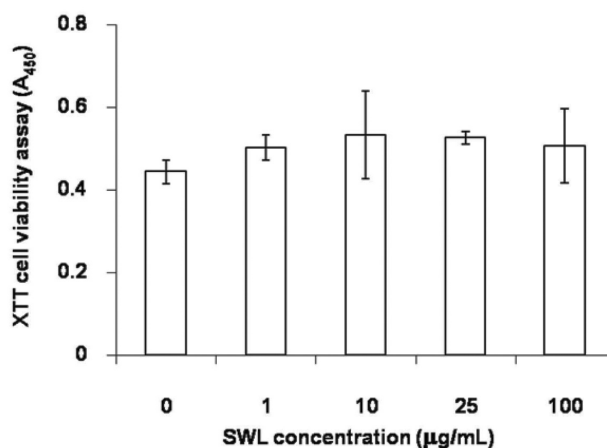
1.ฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง PGE_2 ของเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

หลังจากทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยางโมกต่อเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู และพบว่าสารสกัดจากยางโมก (SWL) (ความเข้มข้น 1, 10, 25, และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อจำนวนและการมีชีวิตของเซลล์ ทดสอบโดยอาศัย XTT cell viability assay และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงซึ่งแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (รูปที่ 1) ดังนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการสร้าง PGE_2 ของเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดสอบ มาตรวจวัดความเข้มข้นของ PGE_2 ด้วยชุดตรวจ PGE_2 parameter assay (R&D systems Inc., USA) พบว่า กลุ่มที่ทดสอบโดยเติมสารสกัดจากยางโมกพร้อมกับการเติม LPS ทุกกลุ่มมีความเข้มข้นของ PGE_2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้น LPS อย่างเดียว โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากยางโมกความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลดลง 72.1 % เมื่อเทียบกับกลุ่มกระตุ้น LPS อย่างเดียว (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง PGE_2 ของสารสกัดจากยางโมกยังต่ำกว่า NS-398 ซึ่งเป็นสารมีบทบาทในการยับยั้งเอนไซม์ COX ส่วน

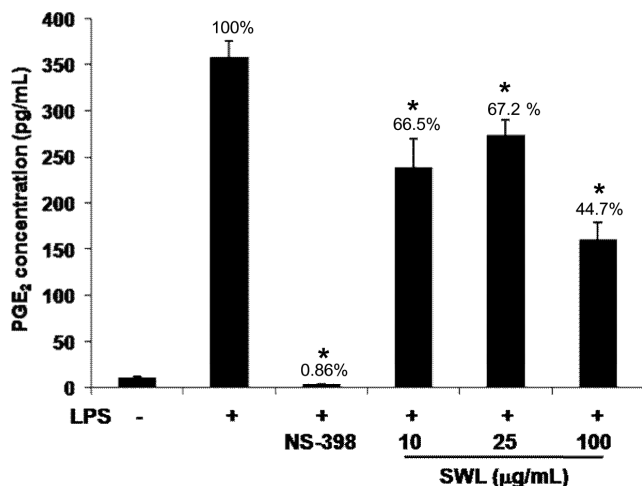
กลุ่มที่ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกโดยเติมลงไปหลังจากการเติม LPS 1 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากยางโมกที่เติมลงไปหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS 1 ชั่วโมง สามารถลดความเข้มข้นของ PGE_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้น LPS อย่างเดียว (รูปที่ 3) ซึ่งผลการทดลองคล้ายคลึงกับที่กลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดจากยางโมกพร้อมกับ LPS

2. ฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกในการยับยั้งการแสดงออก COX-2 ของเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

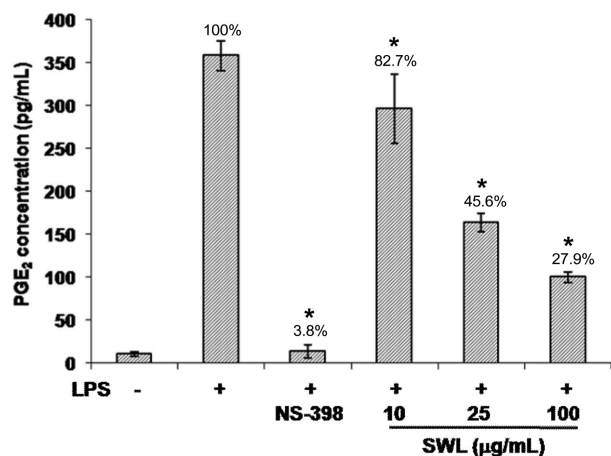
เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์แมคโครฟาจกลุ่มต่างๆ มาตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ COX-2 โดยวิธี western blotting analysis พบว่า กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากยางโมกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับกลุ่ม LPS อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถแยกความแตกต่างในการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากยางโมกความเข้มข้น 10 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่ม LPS ได้ (รูปที่ 4)



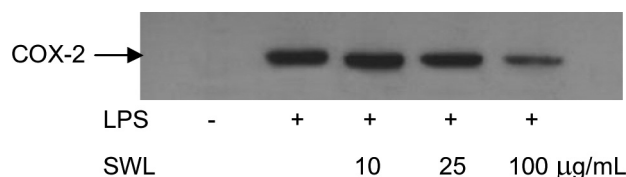
รูปที่ 1 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู หลังจากได้รับสารสกัดจากยางโมก (SWL) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 24 ชั่วโมง โดยอาศัย XTT cell viability assay kit



รูปที่ 2 ระดับของ PGE₂ จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมก (SWL) พร้อมกับการเติม LPS * หมายถึงกลุ่มนั้นๆ มีความเข้มข้นของ PGE₂ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม LPS



รูปที่ 3 ระดับของ PGE₂ จากอาหารเลี้ยงเซลล์ของกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมก (SWL) หลังจากเติม LPS 1 ชั่วโมง * หมายถึงกลุ่มนั้นๆ มีความเข้มข้นของ PGE₂ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม LPS



รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ตรวจวัดโดยวิธี western blotting analysis โดยใช้ปริมาณของโปรตีนเท่ากันทุกตัวอย่าง (10 ไมโครกรัม/ตัวอย่าง) ในขั้นตอนวิเคราะห์แยก โปรตีนด้วยวิธี electrophoresis SWL: สารสกัดจากยางโมก

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

PGE₂ เป็นโมเลกุลในกระบวนการอักเสบและการปวด⁽⁵⁾ เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย หรือร่างกายได้รับบาดเจ็บ การยับยั้งการหลั่ง PGE₂ ถือว่าเป็นกลยุทธ์ในการต่อต้านการอักเสบที่ถูกใช้มานานกว่า 100 ปี⁽¹³⁾ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกชนิด *W. pubescens* ในการยับยั้งการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนู การทดลองอาศัย LPS เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากยางโมกสามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยางโมก (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ในการยับยั้ง PGE₂ ของสารสกัดจากยางโมก ยังคงต่ำกว่า NS-398 ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง PGE₂⁽¹⁵⁾ ซึ่งยับยั้งการสร้าง PGE₂ ในเซลล์ RAW 264.7 แมคโครฟาจของหนูร้อยละ 95

ฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง PGE₂ ของสารสกัดจากยางโมก นอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดจากยางโมกแล้วยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาระหว่างการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และสารสกัดจากยางโมก เมื่อพิจารณาจากกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พร้อมกับการเติมสารสกัดจากยางโมก (รูปที่ 2) และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมกหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS นาน 1 ชั่วโมง (รูปที่ 3) โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าปริมาณของ PGE₂ ที่ตรวจวัดได้ในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมกหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS นาน 1 ชั่วโมง จะสูงกว่า เนื่องจากการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS นาน 1-2 ชั่วโมง จะทำให้เซลล์สร้าง PGE₂ ขึ้นมาในอัตราที่สูงมาก⁽⁷⁾ ถึงแม้จะมีการเติมสารสกัดจากยางโมกลงไปเพื่อยับยั้งการสร้าง PGE₂ แต่สารดังกล่าวไม่มีผลต่อ PGE₂ ที่สร้างขึ้นมาก่อนหน้า ดังนั้นปริมาณ PGE₂ ในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมกหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS นาน 1 ชั่วโมง จึงสูงกว่าในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมกไปพร้อมกับ LPS นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้าง PGE₂ พบว่า COX-2 มีปริมาณลดลงชัดเจนในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากยางโมกความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4)

ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยางโมกษนิ *W. pubescens* มีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ส่งผลให้เซลล์แมคโครฟาจสร้าง PGE₂ ลดลง ซึ่งมีการวิจัยว่าพืชในสกุล *Wrightia* นี้หลายชนิด เช่น *W. tinctoria* มีผลวิจัยในหนูพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวด⁽⁴⁾ สารสกัดจากใบของโมกมัน (*W. tomentosa*) ซึ่งทำให้หนูที่ถูกชักนำให้เกิดบวมมีอาการดีขึ้น⁽⁹⁾ และจากผลการวิจัยสารสกัด steroid alkaloid fraction จากเปลือกลำต้นของ *W. tinctoria* สามารถลดปริมาตรสารน้ำในลำไส้ของหนูซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยสาร PGE₂ แสดงให้เห็นว่า steroid alkaloid fraction ของ *W. tinctoria* มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ PGE₂ ได้⁽¹²⁾ ซึ่งการลดปริมาณ PGE₂ ถือเป็นวิธีการที่สำคัญประการหนึ่งในการลดกระบวนการอักเสบและอาการปวด อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสารสกัดจากยางโมกษนิ *W. pubescens* จะสามารถยับยั้งการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ได้ แต่ในกระบวนการอักเสบมีโมเลกุลสื่อกลางหลายชนิด เช่น histamin, bradykinin, nitric oxide เข้ามาเกี่ยวข้อง⁽⁶⁾ ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากยางโมกษนิ *W. pubescens* ที่มีต่อโมเลกุลเหล่านี้ในอนาคต จะมีประโยชน์ในการช่วยอธิบายกลไกการลดการอักเสบและลดอาการปวดได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีและศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือวิจัยและสถานที่วิจัย ขอขอบคุณ ดร. ช่อทิพย์ กัณทโชติ ซึ่งให้คำแนะนำในการเก็บตัวอย่างพืช โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

- Batugal PA, Kanniah J, Lee SY, Oliver JT. Medicinal plants research in asia, volume 1: The framework and project workplans. Malaysia: International plant genetic resources institute-Regional office of Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), 2004.
- Joshi MC, Patel MB, Mehtha PJ. Some folk medicines of drugs. Bull Med Ethnobot Res 1980; 1: 8-24.
- Hutt MJ, Houghton PJ. A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. J Ethnopharmacol 1998; 60: 97-110.
- Reddy YSR, Venkatesh S, Ravichandran T, Murugan V, Suresh B. Antinociceptive activity of *Wrightia tinctoria* bark. Fitoterapia 2002; 73: 421-3.
- Kobayashi T, Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002; 68-69: 557-73.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins, Cotran: Pathologic basis of disease. 7th ed. Pennsylvania, USA: Elsevier Saunders, 2006: 63-75.
- Glatt M, Kalin H, Wagner K, Brune K. Prostaglandin release from macrophages: an assay system for anti-inflammatory drugs in vitro. Agents and action 1977; 7: 321-26.
- Wagh VV, Jain AK, Kadel C. Ethnomedical plants used for curing dysentary and diarrhoea by tribals of Jhabua District (Madhya Pradesh). Indian J Nat Prod Resour 2011; 2: 256-60.
- David E, Elumalai K, Therasa SV, Thirumalai T. Evaluation of anti-inflammatory activity of the leaf extract of *Wrightia tomentosa* Roem & Schult. J Pharmacy Res 2010; 3: 208-9.
- Ba N, Thin NN. *Wrightia pubescens* R. Br. In: Lemmens RHMJ, Soerianegara I, Wong WC, ed. Plants Resources of South-East Asia No. 5(2): Timber trees; Minor commercial timbers. Leiden, Netherlands: Backhuys Publisher, 1995: 513-4.
- Wiert C. Medicinal plants of Asia and the Pacific. USA: Taylor & Francis group, 2006: 258-9.
- Bigoniya P, Rana AC. Antidiarrhea and antispasmodic activity of *Wrightia tinctoria* bark and its steroidal alkaloid fraction. Pharmacologyonline 2009; 3: 298-310.
- Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of aspirin. Thromb Res 2003; 110: 255-8.

14. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพฯ: สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 2544.
15. Meyer-Siegler K. COX-2 specific inhibitor, NS-398, increases macrophage migration inhibitory factor expression and induces neuroendocrine differentiation in C4-2b prostate cancer cells. *Mol Med* 2001; 7: 850–60.