

ฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นต่อการต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้ง การหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ

สุภาพร ขำจันทร์ ชลธิชา ทะนันไชย

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

Received: February 19, 2020

Revised: June 24, 2020

Accepted: July 9, 2020

บทคัดย่อ

กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis* L.) จัดเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถพบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาในการรักษาและบรรเทาอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่างแพร่หลาย เช่น โรคหืด มะเร็ง และเบาหวาน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ในการบรรเทาอาการอักเสบที่เกิดขึ้นดังกล่าวของกำแพงเจ็ดชั้นนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของกำแพงเจ็ดชั้นผ่านการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยทำการสกัดสารจากเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น จากนั้นทดสอบความเป็นพิษและความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจด้วยวิธี trypan blue exclusion และ Griess reaction assay ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า สารในกำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดออกมาด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ อีกทั้งสารสกัดกำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในทุกๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$) สามารถยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ดังกล่าวของกำแพงเจ็ดชั้นอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: กำแพงเจ็ดชั้น การอักเสบ ไนตริกออกไซด์ เซลล์แมคโครฟาจ

ผู้สนับสนุนผลงาน:

สุภาพร ขำจันทร์

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

19 หมู่ 2 ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

อีเมล: supaporn.kh@up.ac.th

Anti-inflammatory activity of *Salacia chinensis* L. extracts through the inhibition of nitric oxide secretion by macrophages

Supaporn Khamchun, Chonticha tananchai

Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao

Abstract

Salacia chinensis L. is extensively used as a traditional herbal medicine in Thailand for the severity alleviation of several diseases involved with inflammation such as asthma, cancer and diabetes mellitus. Nevertheless, the underlying mechanisms in this inflammatory effect of *Salacia chinensis* L. are still unclear. In the present study, we thus aimed to evaluate the capacity of *Salacia chinensis* L. for an inhibition of inflammatory process via nitric oxide secretion from RAW264.7 macrophage cell line induced by lipopolysaccharide. The extracts of *Salacia chinensis* L. with methanol and distilled water were determined cytotoxicity and the reduction of nitric oxide secretion by trypan blue exclusion and Griess reaction assay, respectively. The results demonstrated that both of *Salacia chinensis* L. extracts were not toxic to macrophage cell line. Furthermore, all concentrations of these extracts (100, 200 and 400 µg/mL) significantly diminish macrophage cell line for the secretion of nitric oxide in a dose dependence manner ($p<0.05$). Our findings implied that the extracts of *Salacia chinensis* L. had an inhibitory capacity of inflammation through nitric oxide secretion. The active compounds of *Salacia chinensis* L. in this effect may be further investigated.

Keywords: *Salacia chinensis* L., inflammation, nitric oxide, macrophages

Corresponding Author:

Supaporn Khamchun

Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao
19 Moo 2, Mae Ka Sub-district, Mueang Phayao District, Phayao Province 56000, Thailand.

E-mail: supaporn.kh@up.ac.th

บทนำ

พืชสมุนไพรเป็นสิ่งที่อยู่คู่คนไทยมานาน และมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคตั้งแต่ครั้งโบราณ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อการแพทย์แผนปัจจุบันเริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น สรรพคุณและคุณค่าของสมุนไพรอันเป็นสิ่งที่เรียกได้ว่าเป็นภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมายาวนานก็เริ่มถูกบดบังและทอดทิ้งไปในที่สุด เช่นเดียวกับพืชสมุนไพรที่ชื่อว่า “ก้ามพะเจ็ดขึ้น (*Salacia chinensis* L.)” ซึ่งพบว่ามีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย ได้แก่ เมื่อต้มน้ำใช้ดื่มเพื่อแก้อาการปวดเมื่อย ลดอาการเจ็บปวด รวมถึงสามารถใช้รักษาโรคหืด มะเร็ง และเบาหวานได้¹⁻³ นอกจากนี้ ก้ามพะเจ็ดขึ้นยังจัดเป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปตามป่าเบญจพรรณและป่าละเมาะในทุกภาคของประเทศไทย^{1,2} ปัจจุบันพบว่าก้ามพะเจ็ดขึ้นมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการใกล้สูญพันธุ์ ดังนั้น หากสามารถศึกษาวิจัยสรรพคุณทางยาของพืชสมุนไพรก้ามพะเจ็ดขึ้นด้วยหลักฐานทางวิทยาศาสตร์จนเป็นที่ประจักษ์ ก็จะช่วยทำให้เกิดการสร้างมูลค่าของพืชสมุนไพร เกิดการต่อยอดภูมิปัญญาและส่งเสริมให้เกิดความตระหนักในการอนุรักษ์พันธุ์พืชก้ามพะเจ็ดขึ้นให้คงอยู่ต่อไป โดยพบว่าสรรพคุณทางยาของก้ามพะเจ็ดขึ้นล้วนมีความเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ ที่มีกลไกสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบของร่างกาย รวมถึงการศึกษาที่ผ่านมาที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากก้ามพะเจ็ดขึ้น มีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบอีกด้วย^{1,4-7}

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนของร่างกาย เกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ภายในร่างกายต่อสิ่งกระตุ้นหรือสารที่มีอันตราย ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดเล็กๆ ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือดรั่วเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ดังนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาวจึงเคลื่อนเข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบ เกิดกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม มีการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อย

เซลล์ใกล้เคียง อาการที่ปรากฏ คือ ปวด บวม แดง และร้อน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดทำให้เกิดอาการบวม การไหลของเลือดในหลอดเลือดฝอยเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้บริเวณนั้นแดงและร้อน โดยอาการเหล่านี้เป็นผลมาจากสารตัวกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) เป็นต้น โดยที่สารไนตริกออกไซด์ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิล (neutrophil) และ แมคโครฟาจ (macrophage) เป็นต้น จากการกระตุ้นของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งในสภาวะปกติไนตริกออกไซด์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านการอักเสบ แต่ในสภาวะที่ร่างกายผิดปกติ จะทำให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้น มีผลชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัวในระบบไหลเวียนโลหิต เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการปวดบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ⁸⁻¹⁰

การศึกษาเกี่ยวกับสารตัวกลางการอักเสบในกระบวนการอักเสบที่สำคัญชี้ให้เห็นว่า การยับยั้งการทำงานของสารตัวกลางการอักเสบดังกล่าวนี้จะ เป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาอาการอักเสบได้ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้ พบว่าได้มีการนำมาใช้เป็นหนึ่งในกลุ่มการออกฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันส่วนใหญ่ทั้งยาในกลุ่ม steroid และ nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) อย่างไรก็ตาม ยาดังกล่าวมักมีฤทธิ์ข้างเคียง และผลอันไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งจะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และเวียนศีรษะ¹¹⁻¹⁴ ส่วนยาที่มีผลข้างเคียงต่ำมักมีราคาแพง ประชาชนที่มีรายได้น้อยจึงไม่สามารถซื้อหามาใช้ได้ ดังนั้น การนำสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบมาพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาและบรรเทาอาการอักเสบในโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจาก

พืชสมุนไพรพื้นบ้านสามารถหาอุปทานได้ง่ายและมีราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบัน

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่ากำแพงเจ็ดชั้นเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพ สามารถที่จะต่อยอดพัฒนาไปเป็นยาสมุนไพรทางเลือกได้ แต่ทั้งนี้ในปัจจุบันมีรายงานการวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์ที่รับรองเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ด้านอักเสบของสารสกัดกำแพงเจ็ดชั้นที่น้อย ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดกำแพงเจ็ดชั้นเพื่อยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และเพื่อให้มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือ ซึ่งถ้าหากสามารถพัฒนาพืชสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นจนเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้ ก็จะเป็นการสนับสนุนและส่งเสริมการนำพืชสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นไปใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน และเป็นการสร้างเสริมรายได้ให้กับชุมชนอีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นในการยับยั้งกระบวนการอักเสบผ่านการลดการหลั่งสาร ไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ

วิธีการศึกษา

1. การสกัดสารจากเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้น

นำเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นมาล้าง ผึ่งลมให้แห้ง และบดให้ละเอียด แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 50-60°C จากนั้นซึ่งผงเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่แห้งแล้วจำนวน 100 g สกัดด้วยเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 500 ml ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำน้ำสกัดมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 400×g นาน 10 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นนำกากที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดต่อด้วยอีทิล อะซิเตท (ethyl acetate) ปริมาตร 500 mL และทำเช่นเดียวกันในขั้นตอนการสกัดสารด้วยเฮกเซนทุกประการ แล้วนำกากที่ได้จากการสกัดด้วย อีทิล อะซิเตท มาสกัดต่อด้วยเมทานอล (methanol) ปริมาตร 500 mL และ

ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนการสกัดสารด้วยเฮกเซนและอีทิล อะซิเตท ทุกประการ โดยหลังจากนำน้ำสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลไปปั่นที่ความเร็ว 400×g นาน 10 นาที ให้ดูดส่วนใสส่วนบนมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator และ lyophilizer ตามลำดับ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ผงของสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล จากนั้นนำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอลมาสกัดต่อด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 500 mL และทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนการสกัดสารด้วยเมทานอลทุกประการ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ผงของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำผงของสารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นมาละลายด้วย phosphate buffer saline (PBS) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg/mL และกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในสารสกัด แล้วทำการเก็บสารสกัดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW

264.7 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO₂ incubator ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin G ความเข้มข้น 60 U/mL of และ streptomycin ความเข้มข้น 60 µg/mL

3. การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วย

วิธี trypan blue exclusion method เติมน้ำเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10⁴ cells/well ปริมาตร 50 µL ลงใน 96-well plate tissue culture จากนั้นเติมน้ำสารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้น 800 µg/mL ปริมาตร 50 µL ต่อหลุมทดสอบ เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 400 µg/mL แล้วนำไปบ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา

ดูดเซลล์จากแต่ละหลุมมาผสมกับ 0.4% trypan blue แล้วนับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี (เซลล์ที่มีชีวิต) และเซลล์ที่ติดสี (เซลล์ตาย) โดยใช้ hemocytometer จากนั้นคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% viability) จากสูตร

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

4. การกระตุ้นเซลล์ด้วย lipopolysaccharide (LPS) นำเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ความเข้มข้น 5×10^3 cells/well ปริมาตร 50 μL มาเติมลงใน 96-well plate tissue culture และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 70-80% จากนั้นเติมสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นลงในแต่ละหลุมของ 96-well tissue culture plate ในปริมาตร 50 μL เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ยกเว้นหลุมที่เป็น vehicle control ให้เติม phosphate buffer saline (PBS) ลงไปแทน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วเติมไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 50 μL ลงในทุกหลุมทดสอบ ยกเว้นหลุมที่เป็น cell control ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS-DMEM ลงไปแทน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทดสอบมาเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ต่อไป

5. การตรวจวัดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Griess reaction assay เติมน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมควบคุม (cell และ vehicle control)

สารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 50 μL ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate flat bottom ยกเว้นหลุมที่เป็น blank ให้เติม reagent diluent ปริมาตร 200 μL ลงไปแทน จากนั้นเติม reagent diluent, Griess reagent I, Griess reagent II ที่มากับชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Cayman Chem, Mi, USA) ปริมาตรอย่างละ 50 μL ตามลำดับ ลงในทุกหลุม ยกเว้นหลุมที่เป็น blank แล้วผสมให้เข้ากัน โดยเคาะด้านข้างของ plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำค่า OD ที่ได้ ไปเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานไนตริกไดออกไซด์ (NO_2) ที่มากับชุดน้ำยาในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของไนตริกไดออกไซด์ ซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่ต้องการตรวจวัด

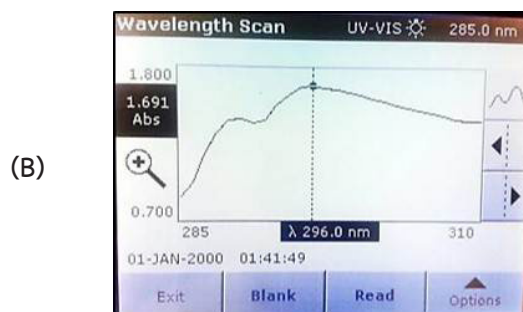
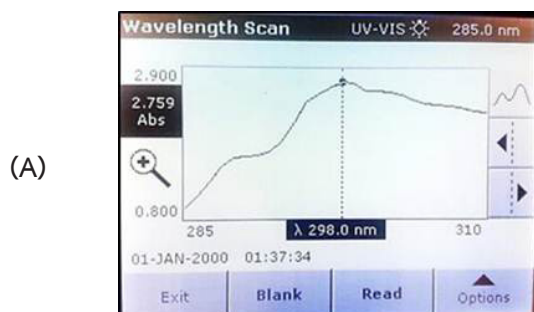
6. การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลทุกการทดสอบได้มาจากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และแสดงค่าของข้อมูลดังกล่าวในรูป mean $\pm$ SEM โดยการเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่ม อาศัยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test ส่วนการเปรียบเทียบที่มากกว่า 2 กลุ่ม อาศัยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) ซึ่งกำหนดค่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

1. ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่สกัดได้จากเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้น หลังจากทำการสกัดสารจากเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น เติรมีสารสกัดดังกล่าวให้มีความเข้มข้น 2 mg/mL และกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ก็นำสารสกัดดังกล่าวทั้งก่อนและหลังกรองไป scan หาค่าความยาวคลื่นที่สาร

สามารถดูดกลืนแสงได้สูงที่สุด ($\lambda_{\max}$) ก่อน แล้วจึงวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 298 และ 296 nm ตามลำดับ ดังรูปที่ 1A และ B เมื่อคำนวณความเข้มข้นของสาร

ที่สกัดออกมาได้จากเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นหลังกรองเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดก่อนกรอง (2 mg/mL) ด้วยความยาวคลื่นดังกล่าว พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 1.87 และ 1.88 mg/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 1



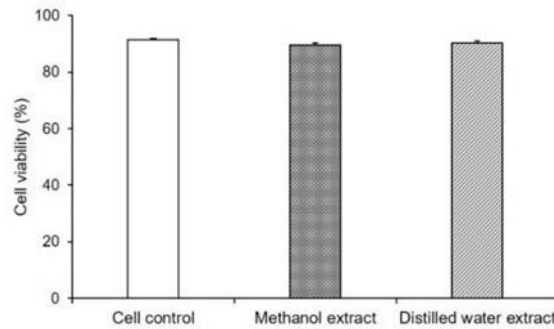
รูปที่ 1 $\lambda_{\max}$ ของสารที่สกัดได้จากเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้น เมื่อสกัดด้วยเมทานอล (A) และน้ำกลั่น (B)

ตารางที่ 1 ค่า $\lambda_{\max}$ OD และความเข้มข้นของสารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น

สารสกัดกำแพงเจ็ดชั้น	$\lambda_{\max}$	OD	ความเข้มข้น
methanol	298 nm	2.576	1.87 mg/mL
distilled water	296 nm	1.587	1.88 mg/mL

2. ผลของสารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 จะทำการทดสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion method โดยพิจารณาจากร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 (% cell viability) หลังจากบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในความเข้มข้นสุดท้าย

ที่สูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ (400 $\mu\text{g/mL}$) ผลการทดสอบ พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่บ่มร่วมกับสารสกัดจากเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับร้อยละ 89.57 ± 0.69 และ 90.22 ± 0.67 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ไม่บ่มร่วมกับสารสกัด (cell control) โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 91.36 ± 0.42 ดังรูปที่ 2



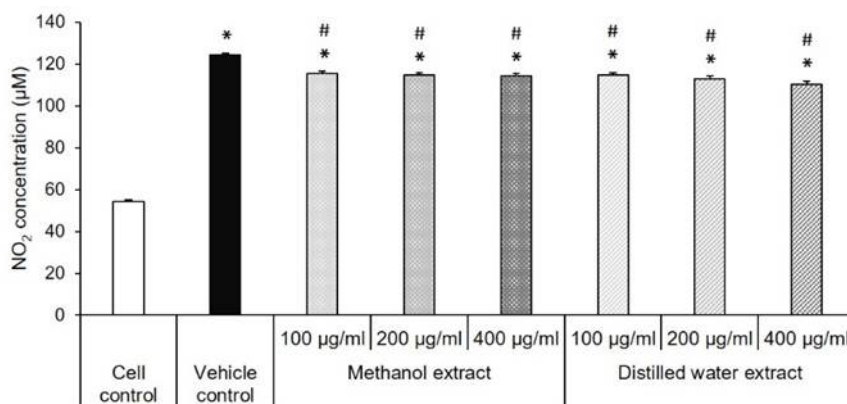
รูปที่ 2 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ในสภาวะ cell control และสภาวะที่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น ซึ่งข้อมูลในแต่ละสภาวะการทดสอบ แสดงอยู่ในรูปของ mean±SEM ที่ได้มาจากการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3. ผลของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นต่อการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นต่อการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะทำการทดสอบด้วยวิธี Griess reaction assay โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของการตรวจวัดปริมาณของไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) ที่แสดงถึงความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์หลังจากเทียบค่า OD ที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานแล้ว พบว่าความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (cell control) และความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่เติมสารสกัด (vehicle control) มีค่าเท่ากับ 54.34 ± 0.69 และ 124.30 ± 0.92 μM ตามลำดับ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน vehicle control มีค่าแตกต่างกับ cell control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3 ในขณะที่ความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง

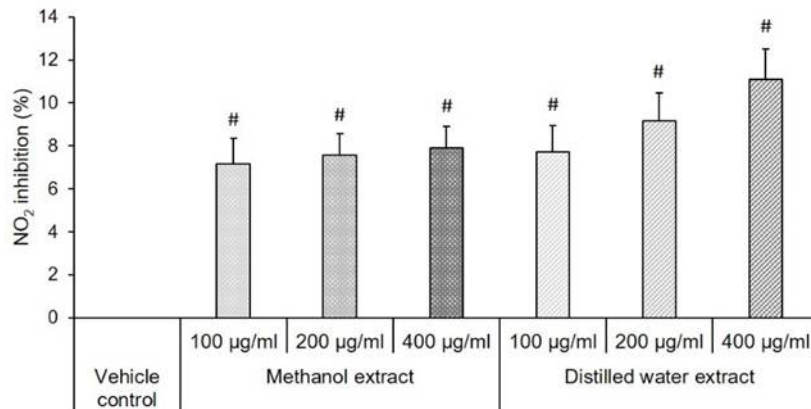
แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติมสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลในความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับ 115.39 ± 1.19 , 114.90 ± 1.03 และ 114.47 ± 1.02 μM ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติมสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยน้ำกลั่นในความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับ 114.73 ± 1.27 , 112.92 ± 1.33 และ 110.50 ± 1.41 μM ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติมสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นในทุกๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$) พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน vehicle control และ cell control อีกทั้งยังไม่พบความแตกต่างในปริมาณของสารไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ระหว่างที่มีการเติมสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในระดับความเข้มข้นเดียวกันอีกด้วย ดังรูปที่ 3

เมื่อนำค่าความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ในแต่ละสภาวะดังกล่าวมาคำนวณร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น ในการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 กับ vehicle control ผลการศึกษาพบว่า ร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลในความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับร้อยละ 7.17 ± 1.17 , 7.57 ± 1.02 และ 7.91 ± 1.00 ตามลำดับ ร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยน้ำกลั่นในความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับร้อยละ 7.70 ± 1.25 , 9.16 ± 1.31 และ 11.10 ± 1.39 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร

สกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในทุกๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$) มีร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 มากกว่า vehicle control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และร้อยละการยับยั้งดังกล่าวขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้น กล่าวคือ สารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/mL}$ พบร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่ความเข้มข้น 200 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ อีกทั้งสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในระดับความเข้มข้นเดียวกันยังพบร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ไม่แตกต่างกันอีกด้วย ดังรูปที่ 4



รูปที่ 3 ค่าความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์ (μM) ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ในสภาวะต่างๆ ซึ่งประกอบไปด้วยสภาวะ cell control, vehicle control การเติมสารสกัดสมุนไพรเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในความเข้มข้น 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลในแต่ละสภาวะการทดสอบ แสดงอยู่ในรูปของ mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และสัญลักษณ์ * แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell control และ # แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control



รูปที่ 4 ร้อยละการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะ vehicle control การเติมสารสกัดสมุนไพรเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลในแต่ละสภาวะการทดสอบ แสดงอยู่ในรูปของ mean±SEM ที่ได้มาจากการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และสัญลักษณ์ # แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control

อภิปรายผล

การสกัดสารสมุนไพรเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่นำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า เมทานอลและน้ำกลั่นสามารถสกัดสารออกมาจากสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นได้มากที่สุด^{7,15,16} และการศึกษาครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นสามารถสกัดสารต่างๆ ที่อยู่ในเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ซึ่งภายหลังจากการสกัดสารดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบหาความยาวคลื่นของสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λ_{max}) โดยพบว่า สารสกัดเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 298 และ 296 nm ตามลำดับ (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) ซึ่งค่าความยาวคลื่นทั้งสองนี้พบอยู่ในช่วงค่าความยาวคลื่นที่สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สามารถดูดกลืนแสงได้สูงที่สุด เช่น ค่าการดูดกลืน

แสงสูงสุดของกรดแกลลิก (gallic acid) สารคูมาริน (coumarin) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) พบอยู่ที่ความยาวคลื่น 271, 280 304 nm ตามลำดับ เป็นต้น¹⁷ นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังพบว่าเป็นส่วนประกอบหลักที่พบอยู่ในส่วนต่างๆ ของสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นรวมถึงส่วนที่เป็นเนื้อไม้^{7,15,16} จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่ทำหน้าที่หลักในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมโครฟาจในการศึกษาครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของภูมิประเทศและภูมิอากาศย่อมสามารถส่งผลให้พืชในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ เพื่อเป็นการตรวจสอบหาส่วนประกอบและสารที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์หลักในเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้น ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรประจำถิ่นที่พบในประเทศไทย อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์ส่วนประกอบที่พบในเนื้อไม้กำแพงเจ็ดชั้นและแยกส่วนประกอบหลักดังกล่าวมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมโครฟาจต่อไป

การสกัดสารจากเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นด้วย เมทานอลและน้ำกลั่นในการศึกษาค้างนี้ คณะผู้วิจัย ได้นำสารสกัดดังกล่าวมาทำการทดสอบความเป็นพิษ ต่อเซลล์แมคโครฟาจก่อนที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ ผลการ ศึกษาพบว่า สารจากเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วย เมทานอลและน้ำกลั่นทุกความเข้มข้น (100, 200 และ 400 µg/mL) มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ มากกว่าร้อยละ 80 และไม่พบความแตกต่างของ ร้อยละการมีชีวิตระหว่างเซลล์ที่มีการเติมสารสกัด เนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นกับไม่มีการเติมสารสกัดเนื้อไม้ ก่าแพงเจ็ดชั้น (cell control) (รูปที่ 2) แสดงให้เห็น ว่า สารที่สกัดออกมาจากเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นด้วย เมทานอลและน้ำกลั่นในการศึกษาค้างนี้ไม่ส่งผลต่อ ความเป็นพิษของเซลล์ ซึ่งทำให้ไม่มีการตายของเซลล์ เพิ่มขึ้น หลังจากนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้นำสารสกัด ดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์ในการลดการอักเสบที่เกิดขึ้น จากการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นสารพิษ (toxin) ชนิดหนึ่ง ที่มีอยู่ในเซลล์เชื้อโรคต่างๆ โดยเฉพาะแบคทีเรีย แกรมลบ¹⁸⁻²¹ โดยทำการตรวจวัดปริมาณการหลั่งสาร ที่อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ของไนตริกออกไซด์ คือ ไนโตรเจน ไดออกไซด์ ทั้งนี้เนื่องจากไนตริกออกไซด์เป็นสารที่ ไม่คงตัวมีค่าครึ่งชีวิตในหน่วยวินาทีเท่านั้น ดังนั้น การตรวจวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์จึงนิยม ตรวจวัดในรูปของไนโตรเจนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสาร ที่มีความคงตัวมากกว่า และปริมาณของไนโตรเจน ไดออกไซด์ที่ตรวจวัดได้ก็แปรผันตรงกับปริมาณของ ไนตริกออกไซด์²²⁻²⁴ ซึ่งในการวัดประสิทธิภาพการ กระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้มีการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ ของ LPS นั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณ การหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL (vehicle control) และไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (cell control) พบว่า ปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่หลั่ง ออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจใน vehicle control

มีค่ามากกว่าใน cell control อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ LPS ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ (10 µg/mL) มีความสามารถ เพียงพอในการกระตุ้นการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ ออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจจนสามารถตรวจวัดได้

เมื่อร่างกายของมนุษย์ได้รับเชื้อโรคหรือสิ่ง แปรกลปลอมต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันจะทำหน้าที่ใน การตอบสนองเพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรคหรือ สิ่งแปรกลปลอมเหล่านั้นออกไป ซึ่งหนึ่งในกระบวนการ ตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว คือ กระบวนการอักเสบ ซึ่งเป็นกระบวนการทำหน้าที่ของ เซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะเซลล์แมคโครฟาจ²⁵⁻²⁷ ในการกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปรกลปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ ร่างกายผ่านการสร้างและหลั่งสารที่ชักนำให้เกิดการ อักเสบขึ้น อย่างไรก็ตาม หากร่างกายมีการกระตุ้น ให้เกิดการอักเสบที่มากเกินไปและเรื้อรัง จะส่งผล ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายเกิดการถูกทำลายจาก สารที่ชักนำให้เกิดการอักเสบเหล่านั้น ส่งผลให้เกิด โรคต่างๆ ตามมาได้ เช่น โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) หรือโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) เป็นต้น²⁸⁻³⁰ โดยพบว่าไนตริกออกไซด์เป็นสารชักนำ ให้เกิดการอักเสบชนิดหนึ่งที่สร้างขึ้นมาจากการ ตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นโดย เอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ในการเปลี่ยน กรดอะมิโน L-arginine, NADPH และออกซิเจน ให้กลายเป็น L-citrulline และไนตริกออกไซด์ ตามลำดับ^{31,32} นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณการสร้าง และหลั่งไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปมีความสัมพันธ์ กับการเกิดโรคต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในหลายๆ อวัยวะทั้งหัวใจ ปอด และไต เป็นต้น³³⁻³⁵ ดังนั้น ประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างหรือหลั่งสาร ไนตริกออกไซด์จึงถือเป็นกลไกหนึ่งที่สามารถลด กระบวนการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคต่างๆ ดังกล่าวนี้ได้ โดยในการศึกษาค้างนี้พบว่าสารสกัด เนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น

ทุกๆ ความเข้มข้นในการศึกษาครั้งนี้ (100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$) สามารถยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามระดับความเข้มข้นของสารสกัด (รูปที่ 3 และ 4) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดรวมที่สกัดออกมาได้จากเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถพบได้ทั่วไปในทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีความสามารถในการต้านกระบวนการอักเสบผ่านการลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรก่าแพงเจ็ดชั้นดังกล่าวอาจจะต้องนำมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการอักเสบของยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันที่มีฤทธิ์ในการลดระดับสารไนตริกออกไซด์ เช่น dexamethasone, naproxen เป็นต้น³⁶⁻³⁸ ซึ่งจากการรายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการต้านการอักเสบผ่านการลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันชนิด NSAIDs เช่น naproxen (0.1-100 μM) และ flurbiprofen (1-100 μM) มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ประมาณร้อยละ 10-20 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาดังกล่าว^{39,40} ดังนั้น จึงจะเห็นได้ว่าการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นทั้งที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นในการศึกษานี้มีฤทธิ์น้อยกว่าฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันที่อาจจะไม่มีความแตกต่างกันนัก (รูปที่ 4) แต่อย่างไรก็ตาม อาจจะต้องมีการเปรียบเทียบในฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่หน่วยความเข้มข้นเดียวกันกับยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันเพิ่มเติม ทั้งนี้เพื่อการประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรก่าแพงเจ็ดชั้นในการลดการอักเสบทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพงและส่งผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยเป็นจำนวนมากในอนาคต

สรุปผล

สารสกัดเนื้อไม้สมุนไพรก่าแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ และสามารถลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS ได้ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นทั้งที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นสามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของเซลล์แมคโครฟาจในการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของร่างกายได้

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้ทำการทดสอบเฉพาะฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นต่อเซลล์แมคโครฟาจในหลอดทดลอง (*in vitro*) เท่านั้น ดังนั้น เพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการอักเสบของร่างกาย อาจจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยการกระตุ้นให้สัตว์ดังกล่าวเกิดอาการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่อไป อีกทั้งการศึกษานี้ทราบเพียงฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อการยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์เท่านั้น ยังไม่สามารถระบุได้ถึงกลไกในการหลั่งสารดังกล่าวได้ จึงอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

2. สารในเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นกับยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบัน อาจจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมในอนาคต ทั้งนี้ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสารสกัดเนื้อไม้ก่าแพงเจ็ดชั้นเป็นยาสมุนไพรต้านการอักเสบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแหล่งทุนงบประมาณรายได้ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับการ

สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย และสาขาวิชา
เทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
พะเยา สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือที่
จำเป็นต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 2004;90:33-8.
2. Poonthananiwatkul B, Lim RH, Howard RL, et al. Traditional medicine use by cancer patients in Thailand. *J Ethnopharmacol* 2015;168:100-7.
3. Morikawa T, Akaki J, Ninomiya K, et al. Salacinol and related analogs: new leads for type 2 diabetes therapeutic candidates from the Thai traditional natural medicine *Salacia chinensis*. *Nutrients* 2015;7:1480-93.
4. Singh RG, Rathore SS, Kumar R, et al. Nephroprotective role of *salacia chinensis* in diabetic CKD patients: a pilot study. *Indian J Med Sci* 2010;64:378-84.
5. Sellamuthu PS, Arulselvan P, Muniappan BP, et al. Mangiferin from *Salacia chinensis* prevents oxidative stress and protects pancreatic beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 2013;16:719-27.
6. Shirakawa J, Arakawa S, Tagawa T, et al. *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats. *Food Funct* 2016;7:2508-15.
7. Ghadage DM, Kshirsagar PR, Pai SR, et al. Extraction efficiency, phytochemical profiles and antioxidative properties of different parts of Saptarangi (*Salacia chinensis* L.) - An important underutilized plant. *Biochem Biophys Rep* 2017;12:79-90.
8. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1397-406.
9. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:469-87.
10. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:471-9.
11. Vonkeman HE, van de Laar MA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:294-312.
12. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World J Gastroenterol* 2010;16:5651-61.
13. Day RO, Graham GG. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *BMJ* 2013;346:f3195.
14. Sostres C, Gargallo CJ, Lanas A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Res Ther* 2013;15 Suppl 3:S3.

15. Ngo T, Scarlett CJ, Bowyer MC, et al. Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from the Root of *Salacia chinensis* L. J Food Quality 2017.
16. Chavan JJ, Jagtap UB, Gaikwad NB, et al. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of Saptarangi (*Salacia chinensis* L.) fruit pulp. Plant Biochem Biot 2013;22:409-13.
17. Zhang A, Wan L, Wu C, et al. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection. Molecules 2013;18:14241-57.
18. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. J Endotoxin Res 2001;7:431-8.
19. Kierner AK, Muller C, Vollmar AM. Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF- α production by α -lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages. Immunol Cell Biol 2002;80:550-7.
20. Lin HY, Juan SH, Shen SC, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW 264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. Biochem Pharmacol 2003;66:1821-32.
21. Oh GS, Pae HO, Lee BS, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Free Radic Biol Med 2006;41:106-19.
22. Colliver BB, Stephenson T. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. Biotechnol Adv 2000;18:219-32.
23. Wink DA, Miranda KM, Espey MG, et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. Antioxid Redox Signal 2001;3:203-13.
24. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. Biol Chem 2004;385:1-10.
25. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005;4:281-6.
26. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. Semin Liver Dis 2010;30:245-57.
27. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. Int Immunol 2018;30:511-28.
28. Shrivastava AK, Pandey A. Inflammation and rheumatoid arthritis. J Physiol Biochem 2013;69:335-47.

29. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, et al. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep* 2013;13:435-44.
30. Wu MY, Li CJ, Hou MF, et al. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2017;18(10).
31. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75:639-53.
32. Robinson MA, Baumgardner JE, Otto CM. Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 2011;51:1952-65.
33. van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res* 2000;1:67-72.
34. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 2002;61:855-61.
35. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 2004;363:1365-7.
36. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* 2001;44:437-50.
37. Keeble JE, Moore PK. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol* 2002;137:295-310.
38. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* 2007;42:3-27.
39. Hinz B, Brune K, Rau T, et al. Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Pharmaceutical research* 2001;18:151-6.
40. Amoroso A, Fresu LG, Dalli J, et al. Characterization of the anti-inflammatory properties of NCX 429, a dual-acting compound releasing nitric oxide and naproxen. *Life sciences* 2015;126:28-36.