พัชรวรรณ สิทธิศาสตร์ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และไซโตไคน์ต้านการอักเสบโดยสารสกัดจากฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.) (ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE ACTIVITY BY EXTRACTS FROM HOAN-NGOC (*PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES) RADLK.) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์, 169 หน้า.

สารสกัดจากใบฮว่านง็อกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสารพฤกษเคมี ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและค้นหาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ [1] สารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อกด้วยเอทานอล 95% (95EE-FLP) [2] สารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อกด้วยเอทานอล 80% (80EE-FLP) [3] สารสกัดจากใบตากแห้งของฮว่านง็อกด้วยเอทานอล 80% (80EE-DLP) [4] สารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อกสกัดซ้ำด้วยน้ำ (WE-FLP) และ [5] สารสกัดจากใบตากแห้งของฮว่านง็อกสกัดซ้ำด้วยน้ำ (WE-DLP) ผลการทดลองพบว่า ทุกสารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อกมีปริมาณสารฟินอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดจากใบตากแห้ง ในทำนองเดียวกัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสดเมื่อประเมินโดยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าสูงกว่าสารสกัดจากใบตากแห้งเช่นกัน ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species, ROSs) ภายในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อถูกชักนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชั่นโดย *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH) เมื่อติดตามโดยใช้ DCFH-DA probe ที่ให้สารเรืองแสง ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP ยังสามารถแสดงคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบ ในระดับความเข้มข้นที่ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ (50-250 μg/mL) 95EE-FLP และ WE-FLP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ และการสังเคราะห์โปรตีนของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์ RAW264.7 ด้วย 1 μg/mL LPS และ 25 U/mL IFN-γ สารสกัด 95EE-FLP ที่มีศักยภาพสูงสุดถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาผลต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดผ่านสารสื่อกลางที่มีความสำคัญยิ่งในกระบวนการอักเสบได้แก่ TNF-α และ IL-6 การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัด 95EE-FLP ยับยั้งทั้ง TNF-α และ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์แมคโครฟาจในช่องท้องของหนูเม้าส์ C57BL/6 เมื่อกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) โดยฤทธิ์การยับยั้งเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด นอกจากนั้น 95EE-FLP ยังยับยั้งทั้งการสังเคราะห์โปรตีนและการแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α และ IL-6 ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS การศึกษาในระดับอณูชีววิทยาพบว่า กลไกบางส่วนของการลดการสังเคราะห์โปรตีนและการแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α และ IL-6 โดย 95EE-FLP เกิดผ่านการยับยั้งการจับกันระหว่าง ทรานสคริบชั่นแฟคเตอร์ NF-κB กับ รหัสจำเพาะบน DNA ในโปรโมเตอร์ TNF-α ของหนู และการจับกันระหว่างทรานสคริบชั่นแฟคเตอร์ NF-κB C/EBP และ AP-1 กับรหัสจำเพาะบน DNA ของโปรโมเตอร์ IL-6 ของหนู นอกจากนั้น 95EE-FLP สามารถยับยั้งการกระตุ้นของ LPS ต่อโปรโมเตอร์ของ mIL-6 ที่ติดฉลากด้วยรีพอร์ตเตอร์ยีน ลูซิเฟอร์เรส (IL-6 promoter-reporter construct, pmIL-6.Luc(-231) luciferase

reporter) ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนดังกล่าว ทั้งนี้ฤทธิ์การยับยั้งของ 95EE-FLP เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นที่ใช้ โดยภาพรวมสารสกัดจากใบฮว่านง็อกมีศักยภาพควรค่าต่อการพัฒนาในอนาคตเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงป้องกัน หรือรักษาโรคต่าง ๆ อันมีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ และกระบวนการอักเสบ

สาขาวิชาชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

PATCHARAWAN SITTISART : ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE ACTIVITY BY EXTRACTS FROM HOAN-NGOC (*PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES) RADLK.). THESIS ADVISOR : ASST. PROF. BENJAMART CHITSOMBOON, Ph.D. 169 PP.

PHENOLIC/FLAVONOID/ANTIOXIDANT/CELL VIABILITY/ ANTI-INFLAMMATORY

Extracts of *Pseuderanthemum palatiferum* (PP) leaves have been demonstrated to possess antioxidant activities, but their anti-inflammatory effects have not yet been reported. The present study aimed to further investigate the phytochemicals and explore the antioxidant and anti-inflammatory activities of [1] 95% ethanol extract of fresh leaves of PP (95EE-FLP), [2] 80% ethanol extract of fresh leaves of PP (80EE-FLP), [3] 80% ethanol extract of dried leaves of PP (80EE-DLP), [4] water extract of fresh leaves of PP (WE-FLP), or [5] water extract of dried leaves of PP (WE-DLP). The results suggested that all fresh leaf extracts significantly exhibited higher phenolic and flavonoid contents than those of dried leaf extracts (p<0.001). Concordantly, the antioxidant activity, assessed by DPPH and FRAP assays, was also more prominent in fresh leaf extracts than that of dried leaf extracts. Both 95EE-FLP and WE-FLP could also effectively attenuate intracellular reactive oxygen species (ROSs) generation in tBuOOH-induced oxidative stress in macrophage RAW264.7 cells as monitored by using DCFH-DA fluorescent probe. Both 95EE-FLP and WE-FLP also possess anti-inflammatory properties. At non-cytotoxic concentrations (50-250 µg/mL), 95EE-FLP and WE-FLP effectively diminished the up regulation of nitric oxide and protein levels of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2) enzymes in 1 µg/mL LPS plus 25 U/mL IFN-γ-stimulated RAW264.7 cells. 95EE-FLP, the most potent extract, was selected for further investigation of its immune modulation on critical

proinflammatory cytokines, TNF-α and IL-6. The results showed that 95EE-FLP induced a dose-dependent suppression of LPS (100 ng/mL)-induced TNF-α and IL-6 secretion in mouse (C57BL/6) peritoneal macrophages. In addition, 95EE-FLP also suppressed LPS-induced TNF-α and IL-6 protein synthesis and mRNA expression in RAW264.7 cells. The study of the molecular mechanism of 95EE-FLP-mediated immune modulation of TNF-α and IL-6 revealed that the suppression in RAW264.7 cells was mediated, at least in part, through decreasing the binding activity of NF-κB to the response element in mTNF-α promoter and the binding activities of NF-κB, C/EBP and AP-1 in mIL-6 promoters. Furthermore, the LPS activation of pmIL-6.Luc(-231) promoter/luciferase reporter gene in transfected RAW264.7 cells was also suppressed by 95EE-FLP in a dose-dependent manner. Collectively, the extracts from PP leaves exhibit a high potential for future development to be exploited in prevention or treatment of diseases caused by over production of ROSs and inflammatory disorders.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biology Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____